



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

(11) PI 0315775-0 B1

(22) Data do Depósito: 23/10/2003

(45) Data de Concessão: 28/03/2017



(54) Título: POLINUCLEOTÍDEO DO EVENTO DE ALGODÃO TRANSGÊNICO RESISTENTE A INSETOS COT102, PROCESSOS DE DETECÇÃO DE MATERIAL VEGETAL DO REFERIDO EVENTO E KIT

(51) Int.Cl.: C12N 15/82; C12Q 1/68; C12N 15/11; A01H 1/00

(30) Prioridade Unionista: 29/10/2002 GB 02 25129.6

(73) Titular(es): SYNGENTA PARTICIPATIONS AG

(72) Inventor(es): DANIEL MURRAY ELLIS; DAVID VINCENT NEGROTTO; LIANG SHI; FRANK ARTHUR SHOTKOSKI; CARLA RANDALL THOMAS

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"POLINUCLEOTÍDEO DO EVENTO DE ALGODÃO TRANSGÊNICO RESISTENTE A INSETOS COT102, PROCESSOS DE DETECÇÃO DE MATERIAL VEGETAL DO REFERIDO EVENTO E KIT"**.

5 A presente invenção refere-se à engenharia genética de plantas e, em particular, a uma planta de algodão transgênica resistente a insetos. Esta também se refere a processos de detecção de material derivado da planta.

10 As pragas de plantas são um fator principal na perda de plantas de cultivo agrícola importantes no mundo. Aproximadamente \$ 8 bilhões são perdidos a cada ano nos USA por causa de infestações de plantas por pragas não-mamíferas incluindo insetos. Em adição às perdas nas plantas de cultivos no campo, as pragas de insetos são também um fardo para agricultores de vegetais e de plantas, para os produtores de flores ornamentais e para os jardineiros domésticos.

15 As pragas de insetos são principalmente controladas por aplicações intensas de pesticidas químicos, que são ativos através da inibição do crescimento dos insetos, da prevenção da alimentação ou da reprodução de insetos ou causam a morte. Um bom controle de pragas de insetos pode ser assim atingido, mas estes reagentes químicos também podem afetar outros insetos benéficos. Um outro problema que resulta do amplo uso de pesticidas químicos é o surgimento de variedades de insetos resistentes. Isto foi parcialmente diminuído por várias práticas de controle da resistência, mas há uma necessidade crescente de agentes alternativos para o controle de pragas. Os agentes de controles biológicos de pragas, tais como cepas de 20 *Bacillus thuringiensis* que expressam toxinas pesticidas como as δ -endotoxinas, têm sido também aplicados nas plantas de cultivo com resultados satisfatórios, oferecendo uma alternativa ou um complemento aos pesticidas químicos. Os genes que codificam algumas destas δ -endotoxinas foram isolados e sua expressão em hospedeiros heterólogos tem mostrado 25 fornecer uma outra ferramenta para o controle de pragas de insetos importantes economicamente. Em particular, a expressão de toxinas inseticidas tais como as δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* em plantas transgênicas, forneceu proteção eficiente contra pragas de insetos selecionadas e 30

plantas transgênicas que expressam tais toxinas foram comercializadas, permitindo que fazendeiros diminuíssem as aplicações de agentes químicos de controle de insetos.

Recentemente, foi identificada uma nova família de proteínas inseticidas produzidas por *Bacillus* sp. durante os estágios vegetativos de crescimento (proteínas inseticidas vegetativas (VIPs)). As Patentes U.S. Nºs 5.877.012, 6.107.279, e 6.137.033 descrevem genes da toxina *vip3A* isolados de espécies de *Bacillus*. As toxinas VIP3A possuem atividade inseticida contra um espectro amplo de insetos lepidópteros, mas não limitada à lagarta dos cereais do outono, *Spodoptera frugiperda*, lagarta negra, *Agrotis ipsilon*, broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* e menor broca do caule do milho, *Elasmopalpus lignosellus* e quando expressas nas plantas transgênicas, por exemplo, o algodão, conferem proteção na planta de danos causados pela alimentação de insetos.

A família do algodão, gênero *Gossypium*, um membro de Malvaceae, consiste de 39 espécies, das quais a *Gossypium hirsutum* e a espécie mais comumente cultivada. Três outras espécies também são cultivadas: *G. arboreum*, *G. barbadense* e *G. herbaceum*. Estas espécies cultivadas são cultivadas primariamente para os pêlos das sementes que são transformados em tecidos. O algodão é adequado como uma fibra têxtil porque os pêlos secos maduros se torcem de tal forma que filamentos fortes finos podem ser fiados partindo dos mesmos. Outros produtos, tais como o óleo da semente de algodão, torta e penugens da semente do algodão são subprodutos da produção de fibras.

Os danos nas plantas de cultivo de algodão por pragas de insetos ao longo de todo o mundo resultam em uma perda significativa no rendimento a cada ano. O controle eficiente destas pragas para minimizar a perda no rendimento é de grande importância econômica. Os exemplos de pragas de insetos do algodão incluem lagarta dos cereais da beterraba (*Spodoptera exigua*), Gorgulho do algodão (*Anthonomus grandis grandis*), mede-palmos do repolho (*Trichoplusia ni*), inseto de mancha das plantas (*Neurocolpus nubilus*), Afídeo do algodão (*Aphis gossypii*), Lagarta que ataca o algodoeiro

(*Helioverpa zea*), Lagartas (*Feltia subterranea*, *Peridroma saucia*, *Agrotis ipsilon*), Broca do milho europeu (*Ostrinia nubilalis*), Lagarta dos cereais do outono (*Spodoptera frugiperda*), tripse das plantas jovens partindo de semente (*Frankliniella* spp.), mede-palmos da soja (*Pseudoplusia includens*),
5 percevejos (*Nezara viridula*, *Acrosternum hilare*, *Euschistus servus*), inseto que tira o brilho das plantas (*Lygus lineolaris*), verme do broto do tabaco (*Heliothis virescens*) e moscas brancas (*Trialeurodes abutilonea*, *Bemisia tabaci*).

A transformação e a regeneração de plantas de algodão são
10 agora um procedimento bem estabelecido, tipicamente baseado na transferência de DNA estranho mediada por *Agrobacterium tumefaciens* para partes das plantas de algodão e na regeneração das ditas partes das plantas em cultura de tecidos em plantas de algodão transgênicas completamente férteis.

15 Existe uma necessidade de gerar uma planta de algodão que seja resistente a insetos de forma que a perda nos rendimentos através da danificação das plantas de cultivo de algodão pelas pragas de insetos seja reduzida. Uma planta de algodão resistente a insetos poderia reduzir a necessidade da aplicação de pesticidas químicos, que podem ser prejudiciais a
20 outros insetos benéficos ao ambiente.

Portanto, a presente invenção se refere a um evento de algodão transgênico resistente a insetos, denominado de COT102. Também se refere a métodos de detecção de material vegetal derivado do mesmo. O "evento COT102" no contexto deste pedido de patente se refere à planta de
25 algodão transgênica inseticida original descrita aqui. "Inseticida" como utilizado aqui, se refere a qualquer efeito inibidor sobre um inseto, incluindo, mas não limitado à alimentação reduzida, ao crescimento retardado, à fecundidade reduzida, à paralisia ou à morte. "Fecundidade" compreende todos os aspectos relacionados à reprodução tal como a capacidade reprodutiva, a frequência reprodutiva e o número de prole. É também abrangido por
30 esta invenção qualquer material vegetal derivado do evento COT102, incluindo sementes.

O evento COT102 exibe um novo genótipo que compreende dois cassetes de expressão. O primeiro cassete de expressão compreende um promotor adequado para a expressão em plantas ligado de forma operacional a um gene que codifica uma toxina inseticida VIP3A, útil no controle de um espectro amplo de pragas de insetos lepidópteros e um sinal de poliadenilação adequados. Os promotores adequados podem ser isolados, *inter alia*, de plantas. Vários promotores de plantas foram isolados e caracterizados incluindo promotores constitutivos, do tipo "liga-e-desliga" e/ou específicos aos tecidos. Os promotores adequados podem ser selecionados do grupo não limitante a seguir: CaMV35S, FMV35S, Ubiquitina, Act2, NOS, OCS, promotor do vírus de enrolamento da folha amarela *Gestrum*, Patatina, E9, "liga-e-desliga" *alcA/alcR*, "liga-e-desliga" GST, "liga-e-desliga" RMS, oleosina, Gelvin, subunidade pequena da ribulose bifsfosfato carboxilase - oxigenase, actina 7, promotor MR7 (milho), Gos 9 (arroz), promotores GOS2, MasOcs (ou superpromotor), promotor Rold (*Agrobacterium rhizogenes*), promotor SuperMAS e promotor *Suc2* (*Arabidopsis*). Em uma modalidade da presente invenção, o promotor é o promotor da Actina, Act2, de *Arabidopsis*. Elementos adicionais tais como seqüências intensificadoras também podem ser incorporadas no cassete de expressão com a finalidade de reforçar os níveis de expressão gênica, por exemplo, intensificadores da transcrição ou da tradução, tais como o ativador da transcrição do vírus cáustico do tabaco (TEV), o intensificador CaMV35S e o intensificador FMV35S. Alternativamente, pode ser desejável incluir uma seqüência de direcionamento, por exemplo, para direcionar o transporte da toxina VIP3A para um compartimento celular particular. Por exemplo, se for desejado fornecer a proteína do lado de fora da célula, então uma seqüência de direcionamento extracelular pode ser ligada ao polinucleotídeo que codifica a proteína VIP. Outros exemplos de direcionamento incluem o direcionamento para uma organela ou um compartimento intracelular específico, por exemplo, para o retículo endoplasmático utilizando uma seqüência de retenção 'KDEL'. Vários sinais de poliadenilação foram isolados e caracterizados. Os exemplos de sinais de poliadenilação adequados funcionais nas plantas incluem o proveniente do

gene da nopalina sintase (nos) de *Agrobacterium tumefaciens*, o proveniente do gene do inibidor II da proteinase e o proveniente do gene da alfa-tubulina (EP-A 652.286). Em uma modalidade da presente invenção, o sinal de poliadenuilação é aquele proveniente do gene nos de *Agrobacterium tumefaciens*.

5 De acordo com a invenção, o polinucleotídeo que codifica a proteína VIP3A também pode ter os códons otimizados ou alterados de outra maneira, por exemplo, transcrição uma vez que este é incorporado no material vegetal. Tal otimização de códons pode ser utilizada para alterar a estrutura secundária prevista do produto da transcrição de RNA produzido em
10 qualquer célula transformada ou para destruir os elementos de instabilidade crípticos de RNA presentes no produto da transcrição não alterado, aumentando assim a estabilidade e/ou a disponibilidade do produto da transcrição na célula transformada (Abler e Green (1996) *Plant Molecular Biology* (32) pp.63-78).

15 O segundo cassete compreende um gene, que quando expresso, pode ser utilizado como um marcador que pode ser selecionado. Vários marcadores que podem ser selecionados foram caracterizados, incluindo alguns que conferem tolerância a antibióticos e outros que conferem resistência a herbicidas. Os exemplos de genes marcadores que podem ser selecionados adequados incluem aqueles que conferem resistência à higromicina, à canamicina ou à gentamicina. Os marcadores que podem ser selecionados adicionais incluem genes que conferem resistência a herbicidas tais como os herbicidas baseados no glifosato ou resistência a toxinas tal como a eutipina. Também estão disponíveis outras formas de seleção tais como os
20 sistemas de seleção baseados em hormônios tal como o sistema Multi Auto Transformation (MAT) de Hiroyrasu Ebinuma e outros (1997) *PNAS Vol. 94* pp.2117-2121; os sistemas de seleção visual que utilizam a proteína de fluorescência verde conhecida, a β glucuronidase e qualquer outro sistema de seleção tal como o da manose isomerase (Positech[®]), da xilose isomerase e
25 da 2-desoxiglicose (2-DOG). Em uma modalidade da presente invenção, o gene marcador que pode ser selecionado é um que confere tolerância à higromicina. Os cassetes de expressão adicionais são opcionalmente compre-

endidos no evento COT102. Por exemplo, estes podem fornecer outras vantagens desejáveis tal como a resistência a herbicidas.

Os primeiro e segundo cassetes de expressão podem ser introduzidos na planta no mesmo ou em plasmídeos diferentes. Se os primeiro e segundo cassetes de expressão estiverem presentes no mesmo plasmídeo e forem introduzidos na planta através de um método de transformação mediado por *Agrobacterium*, podem estar presentes dentro das mesmas ou de regiões diferentes do T-DNA. Em uma modalidade da presente invenção, os primeiro e segundo cassetes de expressão estão presentes na mesma região do T-DNA.

De acordo com o primeiro aspecto da invenção, é fornecido um polinucleotídeo que compreende pelo menos 17 nucleotídeos contíguos da seqüência de 26 nucleotídeos da SEQ ID N^o: 1. Em uma modalidade, o dito polinucleotídeo compreende pelo menos 18 nucleotídeos da SEQ ID N^o: 1. Em uma modalidade adicional, o dito polinucleotídeo compreende pelo menos 20 nucleotídeos contíguos da SEQ ID N^o: 1. Ainda em uma modalidade adicional o dito polinucleotídeo compreende 22 nucleotídeos contíguos da SEQ ID N^o: 1. Ainda em uma modalidade adicional, o dito polinucleotídeo compreende pelo menos 24 nucleotídeos contíguos da SEQ ID N^o: 1. Ainda em uma modalidade adicional é fornecido um polinucleotídeo que compreende a seqüência da SEQ ID N^o: 1.

Em um aspecto adicional da invenção, é fornecido um polinucleotídeo que compreende pelo menos 17 nucleotídeos contíguos da seqüência de 26 nucleotídeos da SEQ ID N^o: 2. Em uma modalidade, o dito polinucleotídeo compreende pelo menos 18 nucleotídeos contíguos da SEQ ID N^o: 2. Em uma modalidade adicional o dito polinucleotídeo compreende pelo menos 20 nucleotídeos consecutivos da SEQ ID N^o: 2. Ainda em uma modalidade adicional, o dito polinucleotídeo compreende pelo menos 22 nucleotídeos contíguos da SEQ ID N^o: 2. Ainda em uma modalidade adicional, o dito polinucleotídeo compreende pelo menos 24 nucleotídeos consecutivos da SEQ ID N^o: 2. Ainda em uma modalidade adicional, é fornecido um polinucleotídeo que compreende a seqüência da SEQ ID N^o: 2.

Em um aspecto adicional da presente invenção é fornecido um polinucleotídeo como descrito anteriormente que compreende a seqüência da SEQ ID Nº: 7. Ainda em um aspecto adicional da presente invenção, é fornecido um polinucleotídeo como descrito anteriormente que compreende a seqüência da SEQ ID Nº: 21.

Em um outro aspecto da presente invenção é fornecida uma planta que compreende um polinucleotídeo que compreende pelo menos 17 nucleotídeos contíguos da SEQ ID Nº: 1 e/ou da SEQ ID Nº: 2. Em uma modalidade, a dita planta compreende pelo menos 18 nucleotídeos contíguos da SEQ ID Nº: 1 e/ou da SEQ ID Nº: 2. Em uma modalidade adicional, a dita planta compreende pelo menos 20 nucleotídeos contíguos da SEQ ID Nº: 1 e/ou da SEQ ID Nº: 2. Em uma modalidade adicional, a dita planta compreende pelo menos 22 nucleotídeos contíguos da SEQ ID Nº: 1 e/ou da SEQ ID Nº: 2. Ainda em uma modalidade adicional, a dita planta compreende pelo menos 24 nucleotídeos contíguos da SEQ ID Nº: 1 e/ou da SEQ ID Nº: 2. Ainda em uma modalidade adicional, a dita planta compreende a seqüência da SEQ ID Nº: 1 e/ou da SEQ ID Nº: 2. Ainda em uma modalidade adicional, a dita planta compreende adicionalmente a seqüência da SEQ ID Nº: 7. Em uma outra modalidade, a dita planta compreende a seqüência da SEQ ID Nº: 21. Em uma modalidade da presente invenção, a dita planta é uma planta de algodão. Em uma modalidade adicional, a dita planta é uma planta de algodão inseticida que é o evento COT102 ou uma planta derivada da mesma.

O versado na técnica está familiarizado com os métodos de transformação de plantas. Em particular, duas técnicas principais foram caracterizadas ao longo de uma faixa ampla de espécies de plantas: transformação por *Agrobacterium* e transformação através da transferência direta do DNA.

A transformação mediada por *Agrobacterium* é um método comumente utilizado para a transformação de plantas dicotiledôneas. O DNA estranho que será introduzido na planta é clonado em um vetor binário no meio das seqüências consenso das bordas esquerda e direita. Esta é a região do T-DNA. O vetor binário é transferido para uma célula de *Agrobac-*

terium, que é subsequente utilizada para infectar o tecido vegetal. A região do T-DNA do vetor que compreende o DNA estranho é inserida no genoma da planta. O cassete com o gene marcador e o cassete com o gene da característica podem estar presentes na mesma região do T-DNA, em 5 regiões diferentes do T-DNA no mesmo vetor ou ainda em regiões diferentes do T-DNA em vetores diferentes. Em uma modalidade da presente invenção, os cassetes estão presentes na mesma região do T-DNA.

Alternativamente, a transferência direta do DNA pode ser utilizada para introduzir o DNA diretamente em uma célula vegetal. Um método 10 adequado de transferência direta do DNA pode ser o bombardeio de células vegetais com um vetor que compreende o DNA para a inserção utilizando uma pistola de partículas (transformação por biolística mediada por partículas); um outro método estabelecido, 'filamentos', envolve o revestimento do DNA em fibras de carbureto de silício sobre as quais as células são empala- 15 das. Outros métodos para a transformação de células vegetais incluem a transformação de protoplastos (opcionalmente na presença de polietileno glicóis); o tratamento com ultra-som de tecidos, células ou protoplastos vegetais em um meio compreendendo o polinucleotídeo ou o vetor; a microin- serção do polinucleotídeo ou do vetor no material vegetal (opcionalmente 20 empregando a técnica de "fibras" de carbureto de silício), eletroporação e similares.

Após a transformação, as plantas transgênicas devem ser regeneradas partindo do tecido vegetal transformado e a progênie que possui o DNA estranho selecionada utilizando um marcador apropriado tal como a 25 resistência à higromicina. O versado na técnica está familiarizado com a composição de meios de regeneração adequados.

Uma planta deste aspecto da invenção, como descrito aqui, possui um efeito sobre insetos de uma ou mais espécies do grupo que compreende *Heliothis* sp., *Helicoverpa* sp. e *Spodoptera* sp. que podem infestá-la. 30 "Infestar" como utilizado aqui se refere ao ataque, à alimentação ou aos danos de qualquer forma por um ou mais insetos. Assim, por exemplo, a planta da presente invenção fornecerá um mecanismo de autodefesa contra a in-

5 festação por pragas de insetos tal como *Helicoverpa zea* (lagarta que ataca o algodoeiro). Como um resultado, um número reduzido de sprays inseticidas é necessário durante o cultivo da dita planta comparado com uma planta de algodão não transgênica da mesma variedade e a perda no rendimento através de pragas de insetos é mantida em um nível mínimo.

A presente invenção não está limitada por si só ao evento COT102, mas é adicionalmente estendida para incluir qualquer material vegetal derivado do mesmo, incluindo semente contanto que contenham pelo menos um dos polinucleotídeos da presente invenção. A presente invenção
10 inclui, mas não está limitada às plantas que são derivadas de cruzamentos de linhagens com o evento COT102 ou um derivado do mesmo através de métodos de cruzamento convencional ou outros. A invenção inclui ainda material vegetal derivado do evento COT102 que pode compreender seqüências de polinucleotídeos adicionais, modificadas ou menores compara-
15 do com o evento COT102 ou exibir outras características fenotípicas. Por exemplo, pode ser desejável transformar o material vegetal derivado do evento COT102 para gerar um novo evento que possui uma característica adicional, tal como um segundo gene de resistência a insetos. Este processo é conhecido como empilhamento de genes. O segundo gene de resistência
20 a insetos pode codificar, por exemplo, lectinas inseticidas, inibidores da protease inseticidas e proteínas inseticidas derivadas das espécies de *Bacillus thuringiensis*, *Xenorhabdus nematophilus* ou *Photorhabdus luminescens*.

Preferencialmente, o segundo gene de resistência a insetos codifica um gene Cry da bactéria *Bacillus thuringiensis*, cujo gene Cry produz
25 uma toxina com um modo de ação ou um sítio de ligação diferente no intestino do inseto à VIP para o controle de espécies de insetos diferentes.

A presente invenção fornece ainda material vegetal derivado do evento COT102 que possui uma característica adicional tal como resistência a herbicidas, resistência a nematóides ou resistência a fungos. Em uma mo-
30 dalidade, a dita característica adicional é a resistência a herbicidas. Em uma modalidade adicional, a dita característica de resistência a herbicidas fornece resistência a um herbicida que compreende o ácido glifosato ou um sal

aceito na agricultura do mesmo. Ainda em uma modalidade adicional, a dita característica a herbicidas é fornecida por um gene que codifica a EPSP sintase ou um mutante da mesma.

A presente invenção fornece ainda um método de controle de insetos que compreende o fornecimento do material vegetal derivado do evento COT102 em um local onde os ditos insetos se alimentam. A invenção fornece ainda adicionalmente um método de controle de insetos que compreende o fornecimento do material vegetal derivado do COT102 no local em que os ditos insetos se alimentam e a aplicação de outros reagentes agroquímicos ao dito material vegetal tais como herbicidas, fungicidas e outros compostos inseticidas incluindo outras proteínas inseticidas. Os exemplos de compostos inseticidas possíveis incluem lectinas inseticidas, inibidores de proteases inseticidas e proteínas inseticidas derivadas das espécies de *Bacillus thuringiensis*, *Xenorhabdus nematophilus* ou *Photorabdus luminescens*. Os exemplos de reagentes químicos possíveis incluem piretróides, carbamatos, imidacloprid, organocloros e macromoléculas tal como espinosad, abamectina ou emamectina.

De acordo ainda com um aspecto adicional da presente invenção, é fornecido um método de detecção de material vegetal derivado do evento transgênico COT102 que compreende a obtenção de uma amostra para análise; a extração do DNA da amostra; o fornecimento de um par de iniciadores planejados para se ligarem a um polinucleotídeo que compreende pelo menos 17 nucleotídeos contíguos da SEQ ID Nº: 1 e/ou da SEQ ID Nº: 2; a amplificação da região que fica entre os sítios em que os iniciadores se ligam; e a detecção da presença do produto da amplificação. Pares adequados para uso neste método de detecção podem ser planejados utilizando parâmetros bem-conhecidos pelos versados na técnica da biologia molecular agora que as SEQ ID Nºs: 1 e 2 ficaram disponíveis. Por exemplo, um ou ambos os iniciadores do par podem ser planejados para serem específicos ao vetor, específicos ao gene da característica, específicos ao promotor, específicos à seqüência da junção entre o DNA inserido e o DNA genômico e/ou específicos ao marcador. Em uma modalidade, a seqüência dos ditos

iniciadores é representada como a SEQ ID Nº: 3 e a SEQ ID Nº: 4.

Em uma modalidade da presente invenção, a região amplificada pelo dito método (o 'amplicon') possui entre 300 e 1000 pares de bases de comprimento. Em uma modalidade adicional, o amplicon possui entre 500 e
5 900 pares de base de comprimento. Ainda em uma modalidade adicional, o amplicon possui 800 pares de bases de comprimento. Em uma modalidade adicional, o amplicon é produzido utilizando o método anterior em associação com os iniciadores da seqüência da SEQ ID Nº: 3 e da SEQ ID Nº: 4 e possui 800 pares de bases de comprimento.

10 Os iniciadores alternativos que podem ser utilizados em combinação para detectar o evento COT102 incluem as SEQ ID Nºs: 18 e 19 que são específicas para o evento COT102 e produzem um amplicon de 962 pb, SEQ ID Nºs: 22 e 23 que são específicas para o gene VIP e produzem um amplicon de 556 pb ou as SEQ ID Nºs: 24 e 25 que são específicas para o
15 gene que confere resistência ao antibiótico higromicina e produzem um amplicon de 367 pb.

Há muitos métodos de amplificação que podem ser utilizados de acordo com este aspecto da invenção. O princípio básico, uma técnicas conhecida pelos versados na arte, é a reação em cadeia da polimerase (PCR).
20 O produto da amplificação de uma reação da PCR pode ser visualizado através da coloração com brometo de etídio e a excitação com luz UV, tipicamente após a separação em tamanhos utilizando a eletroforese em gel de agarose.

Uma modalidade da presente invenção emprega variações do
25 princípio da PCR tal como TaqMan[®]. Este envolve a marcação de pelo menos um dos iniciadores envolvidos no processo de amplificação com um corante fluorescente. Quando não ligado, o iniciador adota uma conformação tal que a fluorescência não pode ser detectada. Entretanto, quando o iniciador está ligado a um pedaço do DNA, a conformação muda e a fluorescência
30 pode ser detectada. Desta forma, o processo de amplificação pode ser monitorado em tempo real, a intensidade da fluorescência correspondendo diretamente ao nível de amplificação. Modalidades adicionais da presente invenção

venção incluem, mas não estão limitadas à RACE PCR.

Uma modalidade adicional da presente invenção envolve o uso da PCR multiplex para a distinção entre o material vegetal COT102 homozigoto e o material vegetal COT102 heterozigoto. Esta é conhecida pelos versados na técnica como o teste de zigosidade e envolve o uso de três iniciadores da PCR que se ligam a partes específicas do genoma do algodão e/ou do DNA inserido. Os iniciadores adequados para uso em tal teste de zigosidade são representados como as SEQ ID N^{os}: 18 até 20.

Em um outro aspecto da presente invenção é fornecido um método para a detecção de material vegetal derivado do evento COT102 que compreende a obtenção de uma amostra para análise; o fornecimento de uma sonda planejada para se ligar ao complemento de um polinucleotídeo que compreende pelo menos 17 nucleotídeos contíguos da SEQ ID N^o: 1 e/ou da SEQ ID N^o: 2 quando o dito polinucleotídeo possui filamento simples; a hibridização da dita sonda com a amostra; e a detecção do fato da sonda ter se hibridizado. Em uma modalidade, a dita sonda compreende a seqüência da SEQ ID N^o: 1 e/ou da SEQ ID N^o: 2. Em uma modalidade da presente invenção é fornecido um método para a detecção de material vegetal derivado do evento COT102 utilizando uma sonda selecionada do grupo que compreende as SEQ ID N^o: 5, a SEQ ID N^o: 6 e a SEQ ID N^o: 7. Em uma modalidade, a dita sonda compreende a SEQ ID N^o: 5. Em uma modalidade adicional, a dita sonda consiste da SEQ ID N^o: 5. A sonda pode ser, por exemplo, um produto da PCR ou um fragmento da digestão de restrição. Em uma modalidade adicional, a sonda como descrito aqui pode ser marcada com uma marcação fluorescente, radioativa, enzimática ou outra adequada para possibilitar que a hibridização possa ser detectada. O versado na técnica saberá agora como planejar sondas adequadas, agora que possui a vantagem da presente divulgação.

Em uma modalidade adicional da presente invenção, é fornecido um método de hibridização de uma sonda à amostra sob condições rigorosas e de detecção do fato da sonda ter se hibridizado. As condições de hibridização rigorosas são bem-conhecidas pelo versado na técnica e com-

preendem, por exemplo: a hibridização a uma temperatura de aproximadamente 65°C em uma solução contendo 6 x SSC, 0,01% de SDS e 0,25% de leite em pó desnatado, seguida pela lavagem na mesma temperatura em uma solução contendo 0,2 x SSC e 0,1% de SDS.

5 As técnicas adequadas para a detecção do material vegetal derivado do evento COT102 com base no princípio de hibridização incluem, mas não estão limitadas aos "Southern Blots", aos "Northern Blots" e à hibridização *in-situ*. O versado na técnica está familiarizado com técnicas tais como estas.

10 Tipicamente, estes envolvem a incubação de uma sonda com uma amostra, a lavagem para a remoção da sonda não ligada e a detecção do fato da sonda ter se hibridizado. O dito método de detecção é dependente do tipo de marcação ligada à sonda - por exemplo, uma sonda marcada radioativamente pode ser detectada através da exposição a e do desenvolvimento do filme de raios-X. Alternativamente, uma sonda marcada enzimaticamente pode ser detectada através da conversão de um substrato para efetuar uma alteração de cor.

Em um aspecto adicional da invenção, é fornecido um método para a detecção do material vegetal derivado do evento COT102 que compreende a obtenção de uma amostra para análise; o fornecimento de um anticorpo planejado para se ligar a uma proteína VIP contida dentro de uma planta que compreende pelo menos 17 nucleotídeos contíguos da SEQ ID Nº: 1 e/ou da SEQ ID Nº: 2; a incubação do dito anticorpo com a amostra; e a detecção do fato do anticorpo ter se ligado. Em uma modalidade da presente invenção, a dita proteína VIP compreende a seqüência da SEQ ID Nº: 8.

Os métodos adequados para a detecção do material vegetal derivado do evento COT102 baseados na dita ligação de anticorpos incluem, mas não estão limitados a "Western Blots", a Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (Ensaio Imunoabsorvente Ligado à Enzima - ELISA) e à espectrometria de massa SELDI. O versado na técnica está familiarizado a estas técnicas imunológicas. As etapas típicas incluem a incubação de uma

amostra com um anticorpo que se liga à proteína VIP, a lavagem para a remoção de anticorpo não ligado e a detecção do fato do anticorpo ter se ligado. Muitos de tais métodos de detecção se baseiam em reações enzimáticas - por exemplo, o anticorpo pode estar ligado com uma enzima tal como a peroxidase da raiz forte e na aplicação de um substrato adequado, é detectada uma modificação da cor. Tais anticorpos podem ser monoclonais ou policlonais.

Em um outro aspecto da invenção, é fornecido um método para a detecção do material vegetal derivado do evento COT102 que compreende a obtenção de uma amostra para análise; a produção de um extrato de proteínas da amostra; o fornecimento de tiras de teste planejadas para detectar a presença de uma proteína VIP presente dentro de uma amostra; a incubação das tiras de teste com a amostra; e a detecção do fato da proteína VIP estar presente. Em uma modalidade da presente invenção, a dita proteína VIP compreende a seqüência da SEQ ID N^o: 8.

Um método alternativo de detecção com base em anticorpos para COT102 utiliza varetas ou tiras de teste. As etapas típicas incluem a incubação de uma tira de teste com uma amostra e a observação da presença ou da ausência de bandas coloridas na tira de teste. As bandas coloridas são indicativas da presença de uma proteína na amostra. Tais testes com varetas ou com tiras de teste são específicos às proteínas e podem ser utilizados para o teste rápido de amostras no campo.

Em um aspecto adicional da presente invenção, é fornecido um método para a detecção de material vegetal derivado do evento COT102 que compreende a obtenção de uma amostra para análise; submeter um ou mais insetos da espécie *Spodoptera frugiperda* (susceptível à VIP3A) à amostra; submeter um ou mais insetos da espécie *Ostrinia nubilalis* (não susceptível à VIP3A) à amostra como um controle; a detecção do fato da amostra ter um efeito inseticida sobre os insetos de cada uma das espécies; e a comparação dos resultados com um perfil de ensaio biológico autêntico com o COT102. Os resultados são comparados contra um perfil de ensaio biológico com o COT102 autêntico que é produzido utilizando insetos na

mesma condição que foram submetidos à mesma dose e tipo de material vegetal do COT102 e em que o efeito inseticida é detectado no mesmo período de tempo após submeter os insetos à amostra de COT102. *Spodoptera frugiperda* é um controle positivo para o COT102 uma vez que é susceptível a uma dose adequada da VIP3A, enquanto que *Ostrinia nubilalis* é um controle negativo para COT102 uma vez que não é susceptível a uma dose adequada da VIP3A.

Em uma modalidade da invenção, o método de detecção do material vegetal derivado do evento COT102 inclui, mas não está limitado aos ensaios biológicos de alimentação com folhas em que uma folha ou outra parte adequada da planta do evento COT102 ou qualquer material vegetal derivado do evento COT102, é infestado com uma ou mais pragas de insetos. A detecção pode ser feita através da avaliação dos danos na folha ou na parte vegetal após períodos de tempo ajustados, da avaliação da mortalidade ou de um outro efeito inseticida sobre os insetos. As partes vegetais alternativas que podem ser utilizadas para tais ensaios biológicos incluem cápsulas e quadrados. Tais ensaios biológicos podem ser realizados no campo ou na estufa e podem ser submetidos à infestação natural ou artificial de insetos.

Em um outro aspecto da invenção, é fornecido um kit de partes que compreendem um meio para a detecção da presença em uma amostra de material vegetal derivado do evento COT102. Preferencialmente, o dito kit de partes compreende um meio para a detecção da presença em uma amostra de um polinucleotídeo que compreende pelo menos 17 nucleotídeos contíguos da seqüência da SEQ ID Nº: 1 e/ou da SEQ ID Nº: 2 ou uma proteína codificada por um polinucleotídeo como descrito anteriormente ou uma proteína VIP. Em uma modalidade da presente invenção, o dito kit de partes pode compreender a tecnologia de detecção por amplificação do DNA tal como a PCR ou o TaqMan®. Em uma modalidade adicional da presente invenção, o dito kit de partes pode compreender a tecnologia de detecção por hibridização de sondas tais como "Southern Blots", "Northern Blots" ou a Hibridização *in-situ*. Em uma outra modalidade da presente invenção, o dito kit

de partes pode compreender a tecnologia de detecção por ligação a anticorpos tais como "Western Blots", ELISAs, espectrometria de massa SELDI ou tiras de teste. Em uma modalidade adicional da presente invenção, o dito kit de partes pode compreender a tecnologia de detecção por ensaio biológico com insetos tais como os ensaios biológicos de alimentação com folhas ou ensaios biológicos de mortalidade. Em uma modalidade adicional da presente invenção, o dito kit de partes pode compreender qualquer combinação das tecnologias de detecção mencionadas acima. Ainda em uma modalidade adicional, o dito kit de partes pode compreender na forma de instruções um ou mais dos métodos descritos anteriormente.

EXEMPLOS

A invenção será adicionalmente evidente partindo dos exemplos não limitantes a seguir juntamente com as listagens de seqüências associadas como descrito abaixo:

15 SEQ ID Nº 1: Seqüência de polinucleotídeo que se estende ao longo da junção em que a extremidade 5' do inserto COT102 é inserida no genoma do algodão no evento COT102.

SEQ ID Nº 2: Seqüência de polinucleotídeo que se estende ao longo da junção em que a extremidade 3' do inserto COT102 é inserida no genoma do algodão no evento COT102.

SEQ ID Nºs 3 - 4: Seqüências de polinucleotídeo adequadas para uso como iniciadores na detecção do evento COT102.

SEQ ID Nºs 5 - 7: Seqüências de polinucleotídeo adequadas para uso como sondas na detecção do evento COT102.

25 SEQ ID Nº 8: Seqüência de aminoácidos da proteína da toxina VIP3A.

SEQ ID Nºs 9 - 17: Seqüências de polinucleotídeo adequadas para uso como iniciadores de TaqMan na detecção do evento COT102.

SEQ ID Nºs 18 - 20: Seqüências de polinucleotídeo adequadas para uso como iniciadores na detecção do evento COT102 através do teste de zigosidade.

30 SEQ ID Nº 21: Evento COT102 caracterizando a seqüência de polinucleotídeo.

SEQ ID N^{os} 22 - 25: Sequências de polinucleotídeo adequadas para uso como iniciadores na detecção do evento COT102.

Exemplo 1: Clonagem e Transformação

1.1 Clonagem do vetor

5 As técnicas padronizadas de clonagem gênica de digestão de restrição e de ligamentos de fragmentos de vetores produzidos no laboratório foram utilizadas para construir o vetor de transformação, pNOV3001. O vetor incluía um cassete marcador que podia ser selecionado compreendendo um promotor da Ubiquitina (UBQ3), o íntron UBQ3, uma seqüência
10 gênica que codifica uma proteína que confere resistência à higromicina e uma seqüência de poliadenilação do nos. O vetor incluía ainda o cassete de expressão do gene alvo, cujo cassete compreendia um promotor da Actina (Act2), o íntron Act2, uma seqüência que codifica o gene VIP3A que teve seus códons otimizados para a expressão no milho e uma seqüência de poliadenilação do nos. O cassete do marcador que podia ser selecionado e o
15 cassete contendo VIP3A foram clonados dentro da região T-DNA do vetor pNOV3001, entre as seqüências das bordas esquerda e direita. O vetor compreendia ainda um gene conferindo resistência a um antibiótico, a espectinomicina, para a seleção procariótica.

20 O vetor foi transformado na cepa EHA101 de *Agrobacterium tumefaciens* utilizando técnicas padronizadas de transformação com *Agrobacterium* e as células transformadas foram selecionadas através de sua resistência à espectinomicina.

1.2 Transformação das plantas

25 O evento COT102 foi produzido através da transformação mediada por *Agrobacterium* de *Gossypium hirsutum* L. cv Coker 312.

 As sementes Coker 312 tiveram suas superfícies esterilizadas durante 30 segundos em etanol a 70% utilizando etanol suficiente para cobrir a quantidade de sementes que deveria ser esterilizada. As sementes foram
30 lavadas com etanol, lavadas em água esterilizada e mergulhadas em uma solução de 12% de Clorox + Tween 20 durante 20 minutos. Este procedimento de lavagem foi realizado 3 vezes. As sementes foram então plaquea-

das em meio de germinação (Stewart e Hsu, 1977) e foi permitido que germinassem a 30°C durante 7 - 10 dias.

Culturas de 2 mL de *Agrobacterium* contendo o constructo pNOV3001 foram cultivadas durante a noite em antibióticos apropriados e então diluídas com meio MSNH (19:1) em uma placa de petri esterilizada. Os hipocotilédones foram cortados em comprimentos de 6 - 8 mm e colocados na solução de *Agrobacterium* diluída durante pelo menos 30 segundos. Os explantes de hipocotilédones foram removidos da solução de *Agrobacterium* e manchados em papel de filtro esterilizado para remover o excesso de bactérias. Os hipocotilédones foram colocados em meio T2 (sais de MS, vitaminas B5, 0,1 mg/L de 2,4-D, 0,5 mg/L de cinetina, 30 g/L de glicose, 2 g/L de Phytigel - pH 5,8) e co-cultivados com a *Agrobacterium* durante 72 horas na escuridão.

Os explantes de hipocotilédones foram novamente manchados em papel de filtro esterilizado e transferidos para placas contendo meio MS2NK (sais de MS, vitaminas B5, 2 mg/L de NAA, 0,1 mg/L de cinetina, 30 g/L de glicose, 2 g/L de Phytogel, 500 mg/L de cefotaxima, 10 mg/L de higromicina - pH 5,8). As placas foram embrulhadas com parafilme e incubadas na luz a 30°C durante vários meses até que os calos fossem formados.

Os calos foram quebrados o menor possível e colocados em um frasco Erlenmeyer de 50 mL contendo 10 mL de meio MSNH líquido (Sais de MS, Vitaminas B5, 30 g/L de glicose - pH 5,8). Os calos suspensos foram agitados a 110 rpm na luz a 30°C até que aglomerados de célula arredondadas ligeiramente brancas pequenas fossem visíveis. As células foram lavadas e plaqueadas em meio MSNH sólido (sais de MS, vitaminas B5, 30 g/L de glicose, 2 g/L de Phytogel - pH 5,8). As placas foram verificadas mensalmente em relação ao desenvolvimento de embriões somáticos.

Os embriões somáticos maduros foram retirados das placas e colocados sobre placas contendo meio SA (sais de Stewart e Hsu, 20 g/L de sacarose, 20 g/L de ágar - pH 5,8). As placas dos embriões foram colocadas na escuridão durante aproximadamente 14 dias. As raízes foram podadas dos embriões em maturação e os embriões foram transferidos para o meio

SGA (sais de Stewart e Hsu, 5 g/L de sacarose, 1,5 g/L de Phytigel, 5 g/L de ágar - pH 6,8).

Após a primeira folha verdadeira emergir, as plantas jovens foram transferidas para vasos de metal cilíndrico do tamanho de aproximada-
5 mente 500 mL (um pinto) contendo meio SGA. Quando as plantas atingiram 7 - 10 cm de altura, o topo foi cortado e transferido para um outro vaso. No desenvolvimento de um bom sistema de raízes, os cortes enraizados dessa forma foram transplantados para vasos e cultivados na estufa.

1.1 Identificação e seleção de transgênicos

10 As supostas plantas transgênicas foram selecionadas através da PCR em relação à presença do gene VIP3A. Os eventos positivos foram identifi-
cados e selecionados utilizando ensaios biológicos para a atividade insetici-
da contra a Lagarta dos Cereais do Outono (*Spodoptera frugiperda*) (ver o
Exemplo 7). As linhagens inseticidas foram caracterizadas em relação ao
15 número de cópias através da análise de TaqMan® (ver o Exemplo 2). A se-
mente T1 de eventos de 3 cópias únicas & 2 cópias duplas foi observada em
um teste de campo em relação à resistência a insetos e em relação à quali-
dade agrônômica. Dois eventos, COT101 e COT102, foram escolhidos ba-
seados no fato de possuírem uma cópia única do transgene, boa expressão
20 de proteínas como identificado por ELISA (ver o Exemplo 4), boa atividade
inseticida contra a lagarta que ataca o algodoeiro (*Helicoverpa zea*) e de-
sempenho no campo. No final do segundo ano dos testes em campo, os resul-
tados entre os dois eventos foram comparados e o COT102 tinha progredido.

Verificação da seqüência do COT102

25 O DNA genômico foi isolado do evento COT102. Este foi utiliza-
do no seqüenciamento das junções do sítio de inserção do DNA com o DNA
genômico do algodão no evento COT102, utilizando técnicas padronizadas
de seqüenciamento do DNA.

Exemplo 2: Detecção do COT102 através de TaqMan®

30 2.1 Extração do DNA

O DNA foi extraído do tecido foliar utilizando o Wizard® Magnetic
96 DNA Plant System (Promega, #FF3760), de acordo com as instruções

dos fabricantes, com uma etapa adicional no início do protocolo: após a moagem do material foliar, 0,9 mL de Cotton Extraction Buffer (0,2 M de Tris pH 8,0, 50mM de EDTA, 0,25M de NaCl, 0,1% v/v de 2-mercaptoetanol, 2,5% p/v de polivinil-pirrolidona) foi adicionado em cada poço, o tecido vegetal foi ressuspenso e a placa foi centrifugada a 4.000 rpm (2755 g) durante 10 minutos. Após a aspiração e o descarte do sobrenadante, 300 µL de Lysis Buffer A (Promega) foram adicionados e o protocolo do fabricante foi seguido partindo deste ponto. Este procedimento resultou em aproximadamente 85 µL de DNA genômico purificado a uma concentração de aproximadamente 10 ng/µL.

2.2 Reações da PCR com TaqMan

As reações da PCR com TaqMan[®] foram ajustadas utilizando uma mistura padronizada de reação compreendendo:

625 µL de 2x Jumpstart Master Mix para Q-PCR (Sigma, #P2893), suplementado com 15 mM de MgCl₂ e 200 nM de Strata-ROX
 25 µL de 50x de mistura FAM iniciador/sonda
 25 µL de 50x TET iniciador/sonda mix
 200 µL de Água.

As misturas de 50x iniciador/sonda compreendem 45 µL de cada iniciador a uma concentração de 1 mM, 50 µL da sonda a uma concentração de 100 µM e 860 µL de 1x TE e foram armazenadas em um tubo âmbar a 4°C. Os exemplos de combinações de seqüências adequadas de iniciador/sonda que foram utilizadas são:

Nome do Iniciador	Seqüência do Iniciador 5' - 3'	SEQ ID
25 GhCHI2b-F	GGTCCCTGGATACGGTGTC	SEQ ID Nº: 9
Para frente		
GhCHI2b-R	TTGAGGGTTGGATCCTTTGC	SEQ ID Nº: 10
Para trás		
GhCHI2b-TET	CCAACATCATCAATGGTGGCATCGAAT	SEQ ID Nº: 11
30 Sonda	(marcação a 5' = TET, marcação a 3' = TAMRA)	
Hygromycin-F	CAGGCAGGTCTTGCAACGT	SEQ ID Nº: 12
Para frente		

	Nome do Iniciador	Seqüência do Iniciador 5' - 3'	SEQ_ID
	Hygromycin-R	CGAGAGCCTGACCTATTGCAT	SEQ ID Nº: 13
	Para trás		
	Hygromycin-FAM	ACACCCTGTGCACGGCGGG	SEQ ID Nº: 14
5	Sonda	(marcação a 5' = FAM, marcação a 3' = TAMRA)	
	Vip3-F	ATGAAGACCCTGCGCTACGA	SEQ ID Nº: 15
	Para frente		
	Vip3-R	ACGCCAGTGGCATGTAGA	SEQ ID Nº: 16
	Para trás		
10	Vip3-FAM	AGCGAGGCCGAGTACCGCACC	
	Sonda	(marcação a 5' = FAM, marcação a 3' = TAMRA)	SEQ ID Nº: 17

7 µL da mistura master foram dispensados em cada poço de uma placa de ensaio de TaqMan® de 384 poços. 3 µL de molde de DNA foram adicionados nos poços apropriados. 3 µL de séries de diluição do controle de cópias foram adicionados em poços específicos como um controle. As reações foram corridas em um ABI7900 (Applied Biosystems) utilizando as condições de ciclos a seguir:

	Etapa	Temperatura	Tempo
	1	50°C	2 min
20	2	95°C	10 min
	3	95°C	15 s
	4	60°C	1 min
	5	Ir para a etapa 3, repetir 40 vezes	

Os dados foram analisados utilizando o software SDS2.0 (Applied Biosystems).

Exemplo 3: Detecção do COT102 através da PCR

3.1 Extração do DNA Genômico

O DNA genômico do COT102 foi extraído como descrito no Exemplo 2.1.

3.2 Teste de Zigosidade através da PCR Multiplex

Os iniciadores da PCR foram planejados para se ligarem à seqüência de DNA genômico do algodão a montante do sítio em que o cassette

do COT102 foi inserido (SEQ ID Nº: 18); a própria seqüência do cassete COT102 (SEQ ID Nº: 19); e a seqüência do DNA genômico do algodão que é substituída quando a seqüência do COT102 é inserida (SEQ ID Nº: 20). Quando o inserto COT102 está presente, o par de iniciadores SEQ ID Nºs:

5 18 e 19 amplifica um fragmento da PCR de 962 pb de tamanho. Uma reação da PCR de 50 µL foi ajustada para cada amostra a ser testada como a seguir:

	1x JumpState ReadyMix REDTaq PCR (Sigma P-1107)	25 µL
	40 pmoles do iniciador 1 (SEQ ID NO: 18)	4 µL
10	40 pmoles do iniciador 2 (SEQ ID NO: 19)	4 µL
	40 pmoles do iniciador 3 (SEQ ID NO: 20)	4 µL
	40 ng de DNA genômico	4 µL
	ddH ₂ O	9 µL

As reações da PCR foram aquecidas em um termociclador a

15 94°C durante 2 minutos, seguidos por 35 ciclos como a seguir: 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto. A reação foi completada através do aquecimento a 72°C durante 5 minutos.

3.3 Análise

As reações da PCR foram corridas em um gel de agarose e as

20 bandas do DNA foram visualizadas sob luz UV após a coloração com brometo de etídio. A presença de 3 bandas indicava que a amostra era uma planta homozigota para COT102; 2 bandas (das quais uma tinha o tamanho de 962 pb) indicavam que a amostra era uma planta heterozigota para COT102; 2 bandas (sem banda de 962 pb de tamanho) indicavam que a amostra era uma planta de algodão homozigota do tipo selvagem.

25

3.4 PCR específica ao evento

Um iniciador da PCR foi planejado para se ligar em direção à

extremidade 3' do gene VIP3A (SEQ ID Nº: 3). Um outro iniciador da PCR foi planejado para se ligar ao filamento complementar da seqüência de DNA

30 genômica flanqueadora a jusante da extremidade 3' do sítio de inserção do COT102 (SEQ ID Nº: 4). Estes iniciadores foram utilizados juntos em uma reação da PCR utilizando o DNA genômico do COT102 resultando na ampli-

ficação de um fragmento de 800 pb. Quando os iniciadores foram utilizados em uma reação da PCR utilizando uma amostra de DNA genômico de algodão não transformado Coker312, nenhum fragmento foi amplificado.

Em um segundo par de iniciadores, um iniciador foi planejado para se ligar ao gene da higromicina (SEQ ID Nº: 19) e o outro iniciador foi planejado para se ligar à seqüência do DNA genômico flanqueadora a montante da extremidade 5' do sítio de inserção do COT102 (SEQ ID Nº: 18). Estes iniciadores foram utilizados juntos em uma reação da PCR utilizando o DNA genômico do COT102 resultando na amplificação de um fragmento de 962 pb. Quando os iniciadores foram utilizados em uma reação da PCR utilizando uma amostra de DNA genômico de algodão não transformado Coker312, nenhum fragmento foi amplificado.

Exemplo 4: Detecção do COT102 através de "Southern Blot"

4.1 Extração do DNA para uso no "Southern Blotting"

Aproximadamente 5 até 10 gramas do tecido vegetal foram moídos em nitrogênio líquido utilizando um almofariz e um pilão. O tecido vegetal foi ressuspenso em 12,5 mL de tampão de extração A (0,2 M de Tris pH 8,0, 50 mM de EDTA, 0,25M de NaCl, 0,1% v/v de β -mercaptoetanol, 2,5% p/v de Polivinil-pirrolidona) e centrifugado durante 10 minutos a 4.000 rpm (2755 g). Após o descarte do sobrenadante, a pelota foi ressuspensa em 2,5 mL de Tampão de Extração B (0,2 M de Tris pH 8,0, 50 mM de EDTA, 0,5 M de NaCl, 1% v/v de β -mercaptoetanol, 2,5% p/v de Polivinil-pirrolidona, 3% de Sarcosila, 20% de Etanol) e incubada a 37°C durante 30 minutos. Durante a incubação, a amostra foi misturada uma vez com uma alça esterilizada. Após a incubação, um volume igual de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) foi adicionado, misturado delicadamente por inversão e centrifugado durante 20 minutos a 4.000 rpm. A camada aquosa foi coletada e 0,54 volume de isopropanol foi adicionado após a centrifugação durante 5 minutos a 4.000 rpm para precipitar o DNA. O sobrenadante foi descartado e a pelota de DNA foi ressuspensa em 500 μ L de TE. Com a finalidade de degradar qualquer RNA presente, o DNA foi incubado a 37°C durante 30 minutos com 1 μ L de 30 mg/mL de RNase A, centrifugado durante 5 minutos a 4.000 rpm

e precipitado através da centrifugação a 14.000 rpm durante 10 minutos na presença de 0,5 volume de 7,5 M de acetato de amônio e 0,54 volume de isopropanol. Após o descarte do sobrenadante, a pelota foi lavada com 500 μL de 70% de etanol e foi permitido que secasse antes da ressuspensão em 5 100 μL de TE.

4.2 Digestões com enzimas de restrição

O DNA foi quantificado utilizando um espectrofotômetro ou um fluorômetro (utilizando 1x TNE e corante Hoechst). As digestões das enzimas adequadas foram preparadas utilizando 8 μg de DNA por digestão em 10 um volume total de 50 μL . As digestões incluíam *BamHI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *NcoI*, *SacI*, *SalI*, *SpeI* e *PstI*, tanto isoladamente quanto em combinação. Em particular, uma digestão dupla com *BamHI* e *EcoRI* foi utilizada para detectar se o gene VIP3A estava intacto; uma digestão dupla com *BamHI* e *EcoRV* foi utilizada para detectar o número de loci do VIP3A e se o 15 gene da higromicina estava intacto; e uma digestão simples com *BamHI* foi utilizada para detectar o número de loci do VIP3A. Os produtos da digestão foram incubados durante a noite na temperatura apropriada para cada enzima. As amostras foram centrifugadas em uma centrífuga a vácuo para reduzir o volume para 30 μL .

20 4.3 Eletroforese em gel

O corante de carga de azul de bromofenol foi adicionado a cada amostra do 4.2 anterior e cada amostra foi carregada em um gel de TBE agarose a 0,8% contendo brometo de etídio. O gel foi corrido a 60 volts durante a noite.

25 O gel foi lavado em 0,25 M de HCl durante 15 minutos para despurinar o DNA e então foi lavado com água. Um "Southern Blot" foi montado como a seguir: 20 folhas de papel manchadas secas grossas foram colocadas em uma bandeja e 4 folhas de papel manchadas secas finas foram colocadas na superfície. Uma folha de papel manchadas fino foi pré-umedecida 30 em 0,4 M de NaOH e colocada na superfície da pilha, seguida por uma folha de membrana de transferência Hybond-N+ (Amersham Pharmacia Biotech, #RPN303B), também pré-umedecida em 0,4 M de NaOH. O gel foi colocado

na superfície garantindo que não havia bolhas de ar entre o gel e a membrana. Três folhas adicionais de papel manchadas pré-encharcadas foram colocadas na superfície do gel e a bandeja de tampão foi preenchida com 0,4 M de NaOH. A conexão da pilha com o gel com a bandeja de tampão utilizando
5 uma mecha pré-encharcada em 0,4 M de NaOH iniciou a transferência do DNA para a membrana. A transferência do DNA ocorreu durante aproximadamente 4 horas à temperatura ambiente. Após a transferência, a membrana Hybond foi lavada em 2x SSC durante 10 segundos e o DNA foi ligado à membrana através da ligação cruzada com UV.

10 4.4 Hibridização

Uma sonda de DNA adequada foi preparada através da PCR. 25 ng do DNA da sonda em 45 μ L de TE foram fervidos durante 5 minutos, colocados em gelo durante 7 minutos e então transferidos para um tubo Rediprime II (Amersham Pharmacia Biotech, #RPN1633). Após a adição de 5 μ L
15 de dCTP marcado com P^{32} ao tubo Rediprime, a sonda foi incubada a 37°C durante 15 minutos. A sonda foi purificada através de centrifugação através de uma coluna de microcentrifugação G-50 (Amersham Pharmacia Biotech, #27-5330-01) de acordo com as instruções do fabricante para remover os dNTPs não incorporados. A atividade da sonda foi medida utilizando um
20 contador de cintilação.

A membrana Hybond foi pré-hibridizada através do umedecimento com 20 mL de solução de pré-hibridização preaquecida de Church (500 mM de $NaPO_4$, 1mM de EDTA, 7% de SDS, 1% de BSA) a 65°C durante 30 minutos. A sonda marcada foi fervida durante 5 minutos e colocada
25 em gelo durante 10 minutos. Uma quantidade apropriada da sonda (1 milhão de contagens por 1 mL de tampão de pré-hibridização) foi adicionada ao tampão de pré-hibridização e a hibridização ocorreu a 65°C durante a noite. No dia seguinte, o tampão de hibridização foi descartado e após uma lavagem com 20 mL de Solução de Lavagem de Church 1 (40 mM de $NaPO_4$,
30 1mM de EDTA, 5% de SDS, 0,5% de BSA), a membrana foi lavada em 150 mL da Solução de Lavagem de Church 1 a 65°C durante 20 minutos. Este processo foi repetido duas vezes com a Solução de Lavagem de Church 2

(40 mM de NaPO₄, 1 mM de EDTA, 1% de SDS). A membrana foi exposta a uma tela de fósforo ou a um filme de raios-X para detectar onde a sonda tinha se ligado.

Exemplo 5: Detecção do COT102 através de ELISA

5 5.1 Extração de proteínas

O tecido de algodão para a análise foi coletado e congelado a –70°C. O tecido fresco foi moído até um pó fino e pesado em um tubo de polipropileno marcado. O tampão de extração (100 mM de Tris, 100 mM de Borato de Sódio, 5 mM de MgCl, 0,05% de Tween 20, 0,2% de Ascorbato de Sódio, Água, pH 7,8, 1 mM de AEBSEF, 0,001 mM de Leupeptina) foi adicionado à amostra em uma proporção de 2:1 (volume do tampão de extração : amostra em peso fresco) para o tecido fresco ou de 30:1 (volume do tampão de extração : amostra em peso seco) para o tecido liofilizado. A amostra foi submetida ao vórtex e homogeneizada utilizando um Brinkman PT 10/35 Polytron equipado com um gerador de redução de espuma PTA 10TS, até que a mistura ficasse líquida. Os extratos foram centrifugados a 10.000 x g durante 15 minutos. O sobrenadante do extrato de proteínas foi armazenado a 2 - 8°C.

5.2 Protocolo de ELISA

O procedimento de ELISA utilizou técnicas padronizadas como a seguir. Uma placa de 96 poços foi mergulhada em etanol durante duas horas e seca ao ar. A placa foi revestida com 50 µL de anticorpo anti-VIP3A de cabra por poço e incubada durante a noite a 2 - 8°C. Após lavar três vezes com a solução de lavagem de ELISA 1X (100 mM de Tris, 0,5% de Tween-20, 75 mM de NaCl, pH 8,5), a placa foi seca rapidamente batendo de cabeça para baixo sobre uma toalha de papel. 150 µL de solução de bloqueio (10 mM de NaPO₄, 140 mM de NaCl, 1% de BSA, 0,02% de Azida Sódica, titulado até pH 7,4 com NaPi monobásico e NaPi dibásico) foram adicionados em cada poço seguidos pela incubação à temperatura ambiente durante 45 minutos. A placa foi lavada 3 vezes como descrito acima.

Os padrões de VIP3A e as amostras de extrato de proteínas foram aplicados nos poços apropriados em triplicata, 50 µL do volume total por

- poço. A placa foi incubada a 2 - 8°C durante uma hora e 30 minutos, seguido pela temperatura ambiente durante mais 30 minutos. A placa foi lavada três vezes com a solução de lavagem de ELISA e então incubada a 35 - 39°C durante uma hora com 50 µL de anticorpo anti-VIP3A de coelho por poço.
- 5 A placa foi lavada três vezes com a solução de lavagem de ELISA e incubada à temperatura ambiente durante 30 minutos com 50 µL de fosfatase alcalina anticoelho de asno por poço. Após mais três lavagens com a solução de lavagem de ELISA, 50 µL de solução de substrato da fosfatase foram adicionados por poço e a placa foi incubada durante 30 minutos à temperatura
- 10 ambiente. A reação foi interrompida através da adição de 50 µL de 3 M de NaOH por poço. A absorbância da solução em cada poço foi medida a 405 nm utilizando uma leitora de vários poços Ceres 900C e os resultados foram analisados utilizando um software de ajuste de Curva KC3 (Bio-Tek Instruments Inc.). A concentração de VIP3A nas amostras foi calculada com refe-
- 15 rência aos padrões da proteína VIP3A.

Exemplo 6: Detecção do COT102 através de Varetas

6.1 Extração de proteínas

- Um pedaço de tecido foliar de aproximadamente 2 cm² foi colocado em um tubo contendo tampão de extração. Um agitador de plástico foi
- 20 utilizado para extrair a proteína do tecido, cortando e macerando o tecido.

6.2 Teste de varetas

- Uma tira de testes foi colocada no tubo e incubada durante 5 - 10 minutos para o resultado se desenvolver. A tira de testes compreendia uma primeira banda na qual o anticorpo anti-VIP3A foi ligado e uma segunda
- 25 banda na qual um anticorpo de controle foi ligado. Após a incubação, uma linha vermelha dupla na janela de resultados da tira de testes indicava que a VIP3A estava presente. A linha inferior indicava a presença da proteína Vip3A enquanto que a linha superior era um controle indicando que o ensaio estava funcionando corretamente.

30 Exemplo 7: Detecção do COT102 através do Ensaio Biológico com Insetos

7.1 Ensaios biológicos foliares

Os ensaios com folhas foram realizados com a Lagarta dos Ce-

reais do Outono (*Spodoptera frugiperda*), a Lagarta que ataca o Algodoeiro (*Helicoverpa zea*) e o Verme do Broto do Tabaco (*Heliothis virescens*) como a seguir:

Os chumaços foram encharcados com 300 μ L até 500 μ L de
5 água destilada e colocados sobre placas de Gelman. Pedacos de folhas me-
dindo entre aproximadamente 3,22 centímetros quadrados e 4,83 centíme-
tros quadrados (0,5 polegada quadrada e 0,75 polegada quadrada) foram
cortados de plantas de algodão de 20,32 até 30,48 centímetros (8 até 12
10 polegadas de altura) e colocados sobre os chumaços. Entre 8 e 10 larvas de
insetos foram colocadas em cada placa e uma tampa foi ajustada. As placas
foram incubadas a 28°C. No terceiro e sexto dias após a infestação, os da-
nos nas folhas em cada placa foram classificados e comparados com as
plantas de controle.

7.2 Ensaio biológico com cápsulas

15 Quatro chumaços absorventes foram saturados com água e co-
locados dentro de uma grande cúpula de plástico. Três filtros de vidro extra
grossos, cada um encharcado com 100 μ L de água destilada, foram coloca-
dos em uma cúpula de plástico menor, que foi então assentada dentro da
cúpula maior. Uma cápsula de 3,17 centímetros de comprimento (1,25 pole-
20 gada) foi cortada, imersa em 10 mg/mL até 20 mg/mL de Nistatina e coloca-
da sobre os filtros na cúpula pequena. 50 larvas de insetos foram colocadas
sobre o quadrado ou a cápsula e uma tampa foi encaixada na cúpula maior.
Os quadrados ou as cápsulas foram reinfestados com mais 50 larvas após 7
dias.

25 O experimento foi incubado à temperatura ambiente durante
aproximadamente 3 semanas. As cápsulas foram então abertas com um
corte para determinar os danos. Os danos nas cápsulas foram comparados
com as amostras de controle.

7.3 Ensaio biológico com folhas liofilizadas

30 Os ensaios biológicos utilizando tecido foliar seco por congela-
mento foram realizados em *Heliothis virescens* como a seguir:

As folhas terminais foram congeladas rapidamente em gelo seco

no momento da coleta e liofilizadas durante a noite. O tecido seco por congelamento foi moído em um almofariz e um pilão até um pó fino e ressuspenso em uma solução de 0,2% de ágar para produzir uma suspensão de pó de folhas a 8% (0,08 g/mL). A suspensão foi coberta na superfície com uma

5 dieta artificial para insetos em placas de 96 poços e deixada secar. Uma única larva de inseto neonato foi introduzida em cada poço e as placas foram seladas. As placas foram incubadas a 28°C. No sexto dia após a infestação, a mortalidade das larvas foi classificada e comparada com as amostras de controle. Os resultados obtidos foram os seguintes:

variedade	% de suspensão foliar em pó	% de mortalidade das larvas (média de 5 testes)
Coker 312	8	6,7
COT102	8	98,3

REIVINDICAÇÕES

1. Polinucleotídeo, caracterizado pelo fato de que é do evento de algodão transgênico resistente a insetos COT102 e que consiste da sequência de SEQ ID NO: 1.

5 2. Polinucleotídeo, caracterizado pelo fato de que é do evento de algodão transgênico resistente a insetos COT102 e que consiste da sequência de SEQ ID NO: 2.

 3. Polinucleotídeo, caracterizado pelo fato de que é do evento de algodão transgênico resistente a insetos COT102 e que consiste da sequência de SEQ ID NO: 21.

10 4. Polinucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que está contido dentro do genoma de uma célula de planta de algodão.

 5. Processo de detecção de material vegetal do evento de algodão transgênico resistente a insetos COT102, caracterizado pelo fato de que compreende:

 • a obtenção de uma amostra para análise;

 • o fornecimento de DNA da amostra;

 • o fornecimento de um primeiro iniciador e um segundo iniciador projetados para se ligarem a um polinucleotídeo quando o dito polinucleotídeo é de fita simples, em que o referido primeiro iniciador é SEQ ID NO:18 e o referido segundo iniciador é selecionado do grupo que consiste em SEQ ID NO:13, 19, e 24, ou o referido primeiro iniciador é SEQ ID NO:4 e o referido segundo iniciador é selecionado do grupo que consiste em SEQ ID NO: 3, 15, 17, e 23;

20 • a amplificação da região que fica entre os sítios em que os iniciadores se ligam; e

 • a detecção da presença do produto da amplificação;

 em que a presença do produto da amplificação é indicativa de que a amostra é derivada do evento de algodão transgênico resistente a insetos COT102.

25 6. Processo de detecção de material vegetal do evento de algo-

dão transgênico resistente a insetos COT102, caracterizado pelo fato de que compreende:

- a obtenção de uma amostra para análise;
 - o fornecimento de uma sonda projetada para se ligar ao
- 5 complemento de um polinucleotídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, quando o dito polinucleotídeo tem fita simples;
- a hibridização da dita sonda com a amostra; e
 - a detecção do fato da sonda ter se hibridizado;

em que a hibridização da sonda é indicativa de que a amostra é derivada do

10 evento de algodão transgênico resistente a insetos COT102.

7. Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a sonda se hibridiza com a amostra sob condições rigorosas de hibridização.

8. Kit, caracterizado pelo fato de que compreende um meio para

15 a detecção da presença em uma amostra de um polinucleotídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3.