



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

(21) **PI0614693-7 A2**

(22) Data de Depósito: 19/07/2006
(43) Data da Publicação: 12/04/2011
(RPI 2101)



* B R P I 0 6 1 4 6 9 3 A 2 *

(51) *Int.Cl.:*
C12N 15/82
A01H 1/02
A01H 1/04
C12Q 1/68

(54) Título: **DESENVOLVIMENTO DE GERMOPLASMA USANDO SEGREGADOS DE CRUZAMENTOS TRANSGÊNICOS**

(30) Prioridade Unionista: 29/07/2005 US 60/703,917

(73) Titular(es): MONSANTO TECHNOLOGY LLC

(72) Inventor(es): CINDY ARNEVIK, GREGORY HECK, JENNIFER LISTELLO, JOHN SOTERES, KUNSHENG WU, QINGYI ZENG, RAY DOBERT

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemens, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2006028209 de 19/07/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/015945 de 08/02/2007

(57) Resumo: DESENVOLVIMENTO DE GERMOPLASMA USANDO SEGREGADOS DE CRUZAMENTOS TRANSGÊNICOS. A presente invenção refere-se a um método para o desenvolvimento de novo germoplasma de planta usando segregados de uma linhagem transgênica combinados com testagem de zigosidade baseada em PCR e, opcionalmente, análise de Southern Blot.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**DESENVOLVIMENTO DE GERMOPLASMA USANDO SEGREGADOS DE CRUZAMENTOS TRANSGÊNICOS**".

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção no campo de cruzamento de planta refere-se a um método para o desenvolvimento de germoplasma de planta usando segregados de uma linhagem transgênica. Um método de testagem de zigossidade para avaliar a ausência de um transgene também é descrito.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

10 Germoplasma de safra amplamente plantada freqüentemente representa a maioria das linhagens de elite contendo uma combinação dos traços de rendimento, agrônômico e de resistência a pestes e a doenças mais desejadas pelos agricultores. Em virtude de sua combinação de traços de elite, esse germoplasma pode servir para gerar semente comercialmente
15 disponível e também pode ser usado como uma fonte para futuros esforços de cruzamento de planta. Em alguns casos, esse germoplasma pode, freqüentemente, compreender um traço transgênico além dos traços de elite que ele exibe. Assim, há uma necessidade no campo de cruzamento de planta por métodos para usar o complemento total da base de germoplasma existente de uma safra em cruzamento de planta, a despeito de se um
20 transgene está presente em qualquer uma das variedades de elite que poderia ser usada para experimentos de cruzamento. Métodos para aplicar, adicionalmente, testagem de zigossidade para melhorar a eficácia de esforços de cruzamento de planta são também necessários.

25 Testagem de zigossidade e número de cópias baseado em PCR quantitativa em tempo real TAQMAN® (qRT-PCR) tem sido usada para analisar prole de planta transgênica (por exemplo, Bubner e Baldwin, Plant Cell Rep. 23: 263-271 (2004)). Essa técnica pode permitir detecção e quantificação do número de cópias de uma determinada seqüência de DNA em um
30 genoma de planta e requer apenas uma pequena quantidade de tecido de planta. A técnica é menos trabalhosa por amostra do que os métodos anteriormente empregados, tal como Southern blotting, para detecção e quantifi-

cação de números de cópias de transgene. Todavia, ela é notoriamente sensível à concentração e à pureza do DNA padrão inicial, dentre outras variáveis. Como tal, seu uso tem sido primariamente como uma primeira seleção quanto ao número de cópias de um transgene antes de cruzamento seletivo seja iniciado realmente, com subsequente confirmação de resultados por outros meios, tal como Southern blotting. Ela é conhecida por ser adequada, por exemplo, para identificação de eventos com altos números de cópia que podem ser descartados precocemente em uma análise de evento de planta transgênica antes que eventos selecionados sejam passados para os produtores. O método ainda não foi usado com material de cruzamento transgênico de elite com uma única cópia.

Se uma linhagem de planta transgênica tiver de ser usada em um programa de cruzamento, métodos eficazes para remoção de um transgene, ou seleção quanto às suas perdas, são desejáveis. Remoção específica de seqüências de transgene, tal como um gene que codifica um marcador selecionável, foi reportada, incluindo o sistema de recombinase *Cre/lox* (Hare e Chua, *Nature Biotechnol.* 20: 575-580 (2002)). Esse método pode levar especificamente à remoção de seqüências de DNA transgênico inseridas de uma planta transgênica, mas seqüências do sítio *lox* ainda restaram necessariamente, flanqueando o sítio da seqüência excisada. Seleção quanto à perda de um transgene através de segregação genética em prole é outro método que é amplamente conhecido, mas requer tempo e esforço substanciais para resultados. Assim, métodos mais eficazes para selecionar perda de seqüências específicas são desejáveis, especialmente métodos que asseguram a remoção completa de todas as seqüências transgênicas inseridas.

Uma parte significativa de cruzamento de soja recente tem utilizado linhagens contendo o traço ROUNDUP READY® encontrado no evento 40-3-2, possivelmente em virtude do fato de tanto quanto 80-95% do germoplasma de soja oferecidos para venda nos Estados Unidos atualmente contém esse evento transgênico. Esse germoplasma exibe um conjunto de traços agronômicos superiores à linhagem precursora A5403 não-transgênica e

a muitas linhagens de cruzamento de soja convencionais (isto é, não-transgênicas). Assim, essas variedades de soja transgênica ROUNDUP READY® são, em si, úteis em programas de cruzamento de planta. De forma a obter completamente sua utilidade, é desejável ser capaz de identificar prole dessas linhagens ROUNDUP READY® que retêm os traços agronômicos de elite da linhagem precursora, exceto quanto à resistência ao glifosato derivada do inserto de transgene do evento 40-3-2 e as seqüências transgênicas associadas encontradas no evento 40-3-2.

As seqüências do transgene funcional do evento 40-3-2 de soja e seu DNA de planta de flaqueamento associado podem ser usados para detectar a presença do transgene em prole de 40-3-2. A seqüência de DNA que flanqueia o inserto transgênico funcional no evento 40-3-2 de soja foi caracterizada (Padgett e outros. Crop Sci. 35: 1451-1461 (1995); Windels e outros. Eur. Food Res. Technol. 213: 107-112 (2001)).

Aprovação legislativa em muitos países para a liberação e comercialização de um evento de planta transgênica em particular pode requerer descrição de seqüências de DNA genômico que flanqueiam um DNA inserido e um método para detectar DNA específico para o evento. Conseqüentemente, algumas seqüências que flanqueiam a inserção funcional no evento 40-3-2 de soja foram anteriormente reportadas (Monsanto MSL-16646, disponível no link [http para //archive.food.gov.uk/pdf_files/acnfp/dossier.pdf](http://archive.food.gov.uk/pdf_files/acnfp/dossier.pdf)). Um método de detecção de milho compreendendo o evento transgênico NK603 também foi reportado no link [http //gmo-crl.jrc.it/ detectionmethods.htm](http://gmo-crl.jrc.it/detectionmethods.htm).

25 SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Produtores de planta podem utilizar um conjunto de cultivares de "elite" exibindo traços superiores relacionados ao crescimento, adaptabilidade, resistência a pestes e a doenças, rendimento da semente, resistência a acamamento, emergência, maturidade, falta de danos na planta em estações posteriores, altura da planta e resistência à fragmentação, dentre outros, como uma base para desenvolver novos cultivares de safra aperfeiçoados. Esses pacotes de traços podem, então, ser introduzidos como novas

linhagens de cruzamento com um ou mais traços desejados adicionais de forma a melhorar eficazmente o germoplasma de cruzamento. Se o cultivar de elite que está sendo usado como uma base para cruzamento adicional já compreende um transgene, é útil ser capaz de identificar a presença ou ausência do transgene dentre muitas proles de segregação enquanto essa prole está sendo selecionada através de métodos clássicos de cruzamento de planta com relação às suas outras qualidades agronômicas.

Produtores de planta que praticam a invenção podem usar várias técnicas. Seleção recorrente é um procedimento de cruzamento projetado para acumular genes favoráveis para um traço ou traços em uma população. Linhagens precursoras são cruzadas, sua prole é evoluída para um ou mais traços e as proles as quais melhor expressam o traço são inter cruzadas para repetir o processo durante gerações sucessivas. Variações na seleção recorrente incluem, dentre outros, seleção de irmãos completos, seleção de família de meio-irmãos e seleção recorrente de prole S_1 . Técnicas tais como cruzamento retroativo, seleção em massa e cruzamento marcador-assistido também podem ser empregadas. Essas técnicas podem ser usadas para selecionar traços de interesse em safras autopolinizadas e de polinização cruzada, conforme apropriado.

A presente invenção se refere, em parte, a um método para o desenvolvimento de uma variedade de safra de elite compreendendo cruzamento de uma primeira linhagem de elite exibindo um traço útil e compreendendo um transgene que codifica o traço útil e o qual exibe traços ou características de elite adicionais, com uma segunda linhagem que exibe um traço útil; obtenção de linhagens híbridas F1 individuais; seleção de pelo menos um indivíduo híbrido F1 que exibe um traço útil das primeira ou segunda linhagens; derivação de pelo menos uma outra geração de prole de sementes ou plantas do indivíduo híbrido F1 selecionado; seleção de prole F2 ou posterior que exibe pelo menos um dos traços ou características de elite adicionais da primeira linhagem com relação à presença do transgene; e identificação de pelo menos um indivíduo carecendo do transgene, em que o traço útil é derivado da segunda linhagem.

Em outro aspecto da invenção, há um método de determinação da zigosidade da prole híbrida compreendendo: (a) contato de uma amostra compreendendo DNA derivado da prole com um conjunto de iniciador compreendendo SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 6 que, quando usado em uma reação de amplificação de ácido nucléico com DNA genômico da prole, produz um primeiro amplicon que é diagnóstico do evento transgênico; e (b) realização de uma reação de amplificação de ácido nucléico, desse modo, produzindo o primeiro amplicon; e (c) detecção do primeiro amplicon; e (d) contato da amostra compreendendo DNA de prole com um conjunto de iniciador compreendendo SEQ ID NOs: 4, 5 e 7 que, quando usado em uma reação de amplificação de ácido nucléico com DNA genômico de plantas de prole, produz um segundo amplicon compreendendo o DNA genômico nativo homólogo à região genômica na qual o transgene é inserido; e (e) realização de uma reação de amplificação de ácido nucléico, desse modo, produzindo o segundo amplicon; e (f) detecção do segundo amplicon; e (g) comparação dos primeiro e segundo amplicons em uma amostra, em que a presença de ambos os amplicons indica se a amostra é heterozigótica para a inserção de transgene.

Em particular, a introdução de um novo traço transgênico de tolerância ao glifosato em uma linhagem de soja já compreendendo o evento 40-3-2 iria requerer a capacidade de distinguir entre dois eventos, uma vez que a aplicação de seleção por glifosato não serviria para identificar a presença do novo evento com relação ao anterior. Adicionalmente, se o novo evento compreende o mesmo transgene funcional como um evento prévio, a tecnologia ELISA também seria incapaz de distinguir a presença de um ou ambos os eventos. ELISA ou outros métodos de detecção de proteína poderiam permitir que o produtor identifique a presença de um novo traço de resistência ao glifosato em uma linhagem carecendo de qualquer outra cópia do transgene, mas não permitiria que um produtor avaliasse, de uma maneira positiva, se quaisquer elementos genéticos atribuídos ao evento 40-3-2 ainda restam.

Para avaliação e cruzamento de traços que conferem tolerância

ao glifosato em si ou em pilhas de vetor com outros traços de valor para produtores, o uso da tecnologia de DNA, em particular tecnologia de zigosidade por PCR baseada em seqüências de flanqueamento para o evento 40-3-2, aumentará a eficiência do processo de seleção e uma estabilidade de produtor para construir sobre a base de germoplasma existente que já contém o evento 40-3-2, bem como outros traços úteis. Esse é atualmente o único método que pode demonstrar a ausência de todos os elementos genéticos identificados do evento 40-3-2 em populações de cruzamento de uma maneira relativamente econômica.

10 Cruzamento de milho, por exemplo, abrangendo conversão de uma linhagem de milho compreendendo um primeiro evento, tal como GA21, a um segundo evento, tal como um compreendendo NK603, também é um assunto da presente invenção. Identificação de uma linhagem segregante GA21-nula que compreende o evento NK603 e carece da presença de seqüências associadas ao evento GA21, após um cruzamento entre linhagens transgênicas de milho compreendendo os eventos GA21 e NK603, também é um assunto da presente invenção.

De acordo com um aspecto da invenção, mutagênese pode ser usada para criar sojas reproduzíveis viáveis ou outras espécies de planta com perfis genéticos únicos, começando com linhagens transgênicas das quais o transgene tem de ser removido. Por exemplo, mutagênese de soja transgênica ou outras espécies pode ser induzida através de tratamento com uma variedade de agentes mutagênicos conhecidos na técnica, incluindo mutágenos físicos, tais como raios X, raios gama, nêutrons rápidos ou térmicos, prótons e mutágenos químicos, tais como metano-sulfonato de etila (EMS), sulfato de dietila (DES), etilenoimina (EI), propano sultona, N-metil-N-nitrosouretano (MNU), N-nitroso-N-metiluréia (NMU), N-etil-N-nitrosouréia (ENU) e azida de sódio. Para exemplos desses métodos veja Ohshima e outros (1998) *Virology* 243: 472-481; Okubara e outros (1994) *Genetics* 137: 867-874; Quesada e outros (2000) *Genetics* 154: 421-436. Além disso, um método rápido e automático para seleção de mutações quimicamente induzidas, TILLING (Objetivação de Lesões Locais Induzidas em Genomas), u-

sando HPLC de desnaturação ou digestão com endonuclease seletiva de produtos de PCR selecionados também é aplicável à presente invenção (veja McCallum e outros (2000) Nat. Biotechnol. 18: 455-457). Variantes genéticas de sojas também podem ser obtidas, por exemplo, através de mutagênese dirigida oligonucleotídeo por, mutagênese por exploração de ligante, mutagênese usando a reação em cadeia de polimerase e similares. Veja, por exemplo, Ausubel, páginas 8.0.3-8.5.9. Também, veja, de modo geral, McPherson (ed.), DIRECTED MUTAGENESIS: A Practical approach, (IRL Press, 1991). Após mutagênese, as sementes são plantadas, avaliadas e sementes com os novos perfis genéticos desejáveis são selecionadas que são viáveis e capazes de subsequente uso. As sementes resultantes podem, então, ser processadas de acordo com a invenção para remover o evento transgênico e a prole com o novo perfil genético resultante usada em programas de cruzamento e desenvolvimento.

15 A presente invenção se refere a um método de cruzamento de planta para identificação de uma planta transgênica ou células ou tecidos da mesma, método o qual é baseado na identificação da presença ou da ausência de pelo menos uma seqüência de DNA transgênica. De acordo com um aspecto da invenção, o método para identificação na prole de uma planta transgênica, ou células ou tecidos da mesma, compreende amplificação de uma seqüência de um ácido nucléico presente em amostras biológicas, usando uma reação em cadeia de polimerase, com pelo menos dois iniciadores, um dos quais reconhece, ou se hibridiza com, o DNA de planta na região de flanqueamento 3' ou 5' de um evento de inserção, o outro do qual reconhece uma seqüência dentro do DNA transgênico inserido. De preferência, o DNA genômico é analisado de acordo com o protocolo de identificação por PCR descrito aqui, pelo que um iniciador reconhece uma seqüência dentro da respectiva região de flanqueamento 5' ou 3' compreendendo a seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 2 ou seu complemento. Alternativamente, os iniciadores usados podem reconhecer uma seqüência dentro do inserto compreendendo a seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 3 e o iniciador que reconhece uma seqüência dentro da região

de flanqueamento 3' compreende a seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 5, de modo que pelo menos um fragmento amplificado específico seja detectado.

5 A presente invenção também se refere a um método para produção de uma variedade de safra de elite não-transgênica compreendendo cruzamento de uma linhagem de elite compreendendo um transgene e exibindo um ou mais traços de elite transgenicamente derivados e um ou mais traços ou características de elite convencionalmente derivadas com uma linhagem não-transgênica convencional; obtenção de linhagens híbridas F1;
10 seleção de pelo menos um indivíduo híbrido F1 exibindo características de elite da linhagem de elite; derivação de pelo menos uma outra geração de prole de sementes ou plantas do indivíduo híbrido F1 selecionado; classificação de prole F2 ou posterior do indivíduo híbrido exibindo os traços ou características de elite convencionalmente derivados da linhagem de elite
15 com relação à presença do transgene; e seleção de prole exibindo os traços ou características de elite convencionalmente derivadas da linhagem de elite, em que o transgene está ausente do genoma da prole.

A invenção também se refere a um método para identificação de segregantes nulos com relação a um transgene em um programa de cruzamento de planta compreendendo cruzamento de uma primeira linhagem contendo um transgene que codifica um traço útil inserido em seu genoma com uma segunda linhagem; obtenção de indivíduos híbridos F1; derivação de pelo menos uma outra geração de prole de sementes ou plantas do indivíduo F1; realização de análise de zigosidade sobre a outra geração de prole
20 e opcionalmente análises de Southern ou Western; seleção de prole em que elementos do transgene estão ausentes e o sítio de inserção do transgene é restaurado para se aproximar de seu estado nativo e derivação de outras gerações da prole selecionada, em que a remoção do transgene não é causada pela presença de uma recombinase transgênica.

30 A presente invenção também se refere a métodos para identificação da presença ou ausência de seqüências de DNA em amostras biológicas de prole de um precursor que compreende um transgene, os métodos

sendo baseados em iniciadores ou sondas que reconhecem especificamente a seqüência de flanqueamento de DNA 5' e 3' de planta do(s) inserto(s) do evento transgênico. Dependendo da presença ou ausência de um transgene, um produto de amplificação de um tamanho específico pode ser detectado.

5 A invenção, assim, também se refere a um kit para permitir a segregação de seqüências transgênicas em prole de segregação de um evento transgênico de elite, o kit compreendendo pelo menos um iniciador ou sonda que reconhece especificamente a região de flanqueamento 5' ou 3' do evento, de modo que a presença, ausência ou número de cópia de um determinado evento pode ser acompanhado durante o processo de cruzamento de planta.

De preferência, o kit da invenção compreende, além de um iniciador que reconhece especificamente a região de flanqueamento 5' ou 3' de um determinado evento, um segundo iniciador que reconhece especificamente uma seqüência dentro do DNA inserido do evento, para uso em um protocolo de identificação por PCR. De preferência, o kit da invenção compreende dois (ou mais) iniciadores específicos, um dos quais reconhece uma seqüência dentro da região de franqueamento 5' de um evento, por exemplo, uma seqüência dentro da região de DNA de planta de SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 2 e outro o qual reconhece uma seqüência dentro do DNA inserido. Especialmente, de preferência, o iniciador que reconhece a seqüência de DNA de planta dentro de uma região de flanqueamento 5' compreende a seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 4 e o iniciador que reconhece o DNA inserido compreende a seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 3.

25 DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

As figuras a seguir formam parte da presente especificação e são incluídas para demonstrar adicionalmente determinados aspectos da presente invenção. A invenção pode ser melhor compreendida através de referência a uma ou mais dessas figuras em combinação com a descrição detalhada de modalidades específicas apresentadas aqui.

30 A figura 1 é um mapa esquemático do evento 40-3-2 e resultados de amplificação.

A figura 2 ilustra um processo de cruzamento de soja.

A figura 3 proporciona um esquema de verificação de nulos.

DESCRIÇÃO DAS LISTAGENS DE SEQÜÊNCIA

5 As listagens de seqüência a seguir formam parte da presente especificação e são incluídas para demonstrar adicionalmente determinados aspectos da invenção. A invenção pode ser melhor compreendida através de referência a uma ou mais dessas seqüências em combinação com a descrição detalhada de modalidades específicas apresentadas aqui.

Tabela 1

SEQ ID NO:	Descrição
1	DNA genômico de flanqueamento 5' e fragmento de junção de inserto funcional no evento 40-3-2
2	DNA genômico de flanqueamento 3' e fragmento de junção de inserto funcional no evento 40-3-2
3	Iniciador SQ1147; em transgene
4	Iniciador SQ1148; em DNA genômico de flanqueamento 5'
5	Iniciador SQ3523; em DNA genômico de flanqueamento 3'
6	Iniciador fluorogênico PB65; na junção de transgene-genômico 5'
7	Iniciador fluorogênico PB1172; na junção de transgene-genômico 3'
8	Iniciador ract-F
9	Iniciador ract-R

10 DEFINIÇÕES

A presente invenção é baseada, em parte, na conservação de germoplasma de elite através da identificação de uma região genômica compreendendo um inserto de transgene no genoma de uma planta de elite precursora de primeira safra modificada e a região homóloga no genoma de uma segunda planta precursora da mesma espécie não tendo o inserto de transgene idêntico e utilização de moléculas de DNA em um método de detecção de DNA para selecionar plantas de prole resultantes de um cruzamento das plantas precursoras, em que as plantas de prole selecionadas não contêm o inserto de transgene específico da primeira planta precursora e contêm algumas ou todas as características do germoplasma de elite do primeiro precursor. As descrições a seguir são proporcionadas para definir melhor a presente invenção e orientar aqueles versados na técnica na prática da presente invenção. A menos que de outro modo observado, os termos

15

20

devem ser compreendidos de acordo com o uso convencional por aqueles versados na técnica relevante. Definições de termos comuns em biologia molecular podem ser encontradas em Rieger e outros, Glossary of Genetics: Classical and Molecular, 5ª edição, Springer-Verlag: New York, (1991); e
5 Lewin, Genes V, Oxford University Press: New York, (1994). A nomenclatura para bases de DNA, conforme apresentada no 37 CFR § 1.822, é usada. A nomenclatura-padrão com uma e três letras para resíduos de aminoácido é usada.

"Segmento de DNA" se refere a uma molécula de DNA que tenha sido isolada livre de DNA genômico total de uma espécie em particular.
10

O termo "soja" significa "*Glycine max*" ou soja e inclui todas as variedades de planta que podem ser cruzadas com soja, incluindo espécies de soja silvestre.

Uma "linhagem de elite" pode se referir, por exemplo, a um genótipo de safra mostrando um ou mais traços moleculares ou agrônômicos ou de qualidade ou industriais de interesse.
15

"Glifosato" se refere a N-fosfometilglicina e seus sais. O glifosato é o ingrediente ativo do herbicida ROUNDUP® (Monsanto Co.). Tratamentos de planta com "glifosato" se refere a tratamentos com a formulação herbicida ROUNDUP® ou ROUNDUP ULTRA®, a menos que de outro modo estabelecido. Glifosato como N-fosfometilglicina e seus sais (não formulado como herbicida ROUNDUP®) são componentes de meios de cultura sintéticos usados para seleção de tolerância de bactérias e plantas ao glifosato ou usados para determinar resistência enzimática em ensaios bioquímicos *in vitro*. Exemplos de formulações comerciais de glifosato incluem, sem restrição, aquelas vendidas pela Monsanto Company como herbicidas ROUNDUP®, ROUNDUP® ULTRA, ROUNDUP® ULTRAMAX, ROUNDUP® WEATHERMAX, ROUNDUP® CT, ROUNDUP® EXTRA, ROUNDUP® BIACTIVE, ROUNDUP® BIOFORCE, RODEO®, POLARIS®, SPARK® e ACCORD®, todos os quais contêm glifosato como seu sal de isopropilamônio; aqueles vendidos pela Monsanto Company como herbicidas ROUNDUP®
20
25
30 DRY e RIVAL®, os quais contêm glifosato como seu sal de amônio; aquele

vendido pela Monsanto Company como ROUNDUP® GEOFORCE, o qual contém glifosato como seu sal de sódio; e aquele vendido pela Zeneca Limited como herbicida TOUCHDOWN®, o qual contém glifosato como seu sal de trimetil-sulfônio. Formulações herbicidas de glifosato podem ser seguramente usadas por cima de safras tolerantes ao glifosato para controlar ervas daninhas em um campo em taxas tão baixas quanto 236,6 ml/4047 m² até 1,9 l/4047 m² (8 onças/acre até 64 onças/acre). Experimentalmente, o glifosato tem sido aplicado à safras tolerantes ao glifosato em taxas tão baixas quanto 118,3 ml/4047 m² excedendo (4 onças/acre e até ou excedendo 128 onças/acre), sem nenhum dano substancial à planta de safra.

O termo "sonda" é um ácido nucléico isolado ao qual é preso um rótulo detectável ou molécula repórter convencional, por exemplo, um isótopo radioativo, agente quimioluminescente ou enzima. Tal sonda é complementar a um filamento de um ácido nucléico alvo, no caso da presente invenção, a um filamento de DNA genômico do evento 40-3-2 de soja, quer de uma planta de soja ou de uma amostra que inclui DNA do evento. Sondas de acordo com a presente invenção incluem não apenas ácidos desoxirribonucléico ou ribonucléico, mas também poliamidas e outros materiais de sonda que se ligam especificamente a uma seqüência de DNA alvo e podem ser usadas para detectar a presença dessa seqüência de DNA alvo.

O termo "iniciador" se refere a ácidos nucléicos isolados que são anelados a um filamento de DNA alvo complementar através de hibridização de ácido nucléico para formar um híbrido entre o iniciador e o filamento de DNA alvo, então, estendido aos longo do filamento de DNA alvo por uma polimerase, por exemplo, uma DNA polimerase. Pares de iniciador da presente invenção se referem a seu uso para amplificação de uma seqüência de ácido nucléico alvo, por exemplo, através de reação em cadeia de polimerase (PCR) ou outros métodos de amplificação de ácido nucléico convencionais.

A base desse método de amplificação é múltiplos ciclos de alterações de temperatura para desnaturar, então, reanelar as moléculas de iniciador de DNA, seguido por extensão para sintetizar novos filamentos de

DNA na região localizada entre os iniciadores de DNA de flanqueamento. Em geral, amplificação de DNA pode ser realizada através de qualquer um dos vários métodos de amplificação de ácido polinucleico conhecidos na técnica, incluindo PCR. Uma variedade de métodos de amplificação é conhecida na técnica e é descrita, inter alia, nas Patentes U.S. Nos. 4.683.195 e 4.683.202 e em *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, ed. Innis e outros, Academic Press, San Diego, 1990. Métodos de amplificação por PCR foram desenvolvidos para amplificar até 22 kb (quilobases) de DNA genômico e até 42 kb de DNA de bacteriófago (Cheng e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 5695-5699, 1994). Esses métodos, bem como outros métodos conhecidos na técnica de amplificação de DNA, podem ser usados na prática da presente invenção.

As sondas de ácido nucleico e iniciadores da presente invenção se hibridizam, sob condições estridentes, a uma seqüência de DNA alvo. Hibridização se refere à capacidade de um filamento de ácido nucleico de se unir a um filamento complementar via emparelhamento de base. Hibridização ocorre quando seqüências complementares nos dois filamentos de ácido nucleico se ligam uma à outra. Moléculas ou fragmentos de ácido nucleico das mesmas são capazes de hibridização específica a outras moléculas de ácido nucleico sob determinadas circunstâncias. Conforme usado aqui, duas moléculas de ácido nucleico são ditas como sendo capazes de se hibridizar especificamente uma à outra se as duas moléculas são capazes de formação de uma estrutura de ácido nucleico de filamento duplo anti-paralelo. Uma molécula de ácido nucleico é dita como sendo o "complemento" de outra molécula de ácido nucleico se ela exhibe complementaridade completa. Conforme usado aqui, moléculas são ditas como exibindo "complementaridade completa" quando cada nucleotídeo de uma das moléculas é complementar a um nucleotídeo da outra. Duas moléculas são ditas como sendo "minimamente complementares" se elas poderem se hibridizar uma à outra com estabilidade suficiente para permitir que as mesmas permaneçam aneladas uma à outra pelo menos sob condições de "baixa estridência" convencionais. Similarmente, as moléculas são ditas como sendo "complemen-

tares" se elas podem se hibridizar uma à outra com estabilidade suficiente para permitir que as mesmas permaneçam aneladas uma à outra sob condições convencionais de "alta estringência". Condições convencionais de estringência são descritas por Sambrook e outros, 1989 e por Haymes e outros, Em: *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, DC (1985), daqui por diante referido como Sambrook e outros, 1989. Desvios de complementaridade completa são, portanto, permissíveis, na medida em que tais desvios não eliminem completamente a capacidade das moléculas de formar uma estrutura de filamento duplo. De forma que uma molécula de ácido nucléico sirva como um iniciador ou sonda, ela precisa apenas ser suficientemente complementar em seqüência para ser capaz de formar uma estrutura de filamento duplo estável sob as concentrações de sal e solvente empregadas em particular.

Conforme usado aqui, uma "molécula de DNA substancialmente homóloga" é uma molécula de ácido polinucleico que se hibridizará especificamente ao complemento do ácido polinucleico à qual ela está sendo comparada sob condições de estringência. O termo "condições de estringência" é funcionalmente definido com relação à hibridização de uma sonda de ácido nucléico a um ácido nucléico alvo (isto é, a uma seqüência de ácido nucléico de interesse particular) através do procedimento de hibridização específica discutido em Sambrook e outros, 1989, em 9.52-9.55. Veja também Sambrook e outros, 1989 em 9.47-9.52, 9.56-9.58; Kanehisa (Nucl. Acids Res. 12: 203-213, 1984); e Wetmur e Davidson, (J. Mol Biol. 31: 349-370, 1988). Conseqüentemente, as seqüências de ácido nucléico da invenção podem ser usadas com relação à sua capacidade de formar seletivamente moléculas dúplice com trechos complementares de fragmentos de DNA. Dependendo da aplicação considerada, será desejado empregar condições variadas de hibridização para obter graus variados de seletividade da sonda com relação à seqüência-alvo. Para aplicações requerendo alta seletividade, será tipicamente desejado empregar condições relativamente de alta estringência para formar os híbridos, por exemplo, selecionar condições de alta temperatura e/ou baixo teor de sal, tal como proporcionado por NaCl a cerca de

0,02 M a cerca de 0,15 M em temperaturas de cerca de 50°C a cerca de 70°C. Uma condição de alta estringência, por exemplo, é lavar o filtro de hibridização pelo menos duas vezes com tampão de lavagem de alta estringência (0,2X SSC, SDS a 0,1%, 65°C). Condições de estringência moderada
5 apropriada que promovem a hibridização de DNA, por exemplo, 6,0 x cloreto de sódio/citrato de sódio (SSC) a cerca de 45°C, seguido por uma lavagem de 2,0 x SSC a 50°C, são conhecidas por aqueles versados na técnica ou podem ser encontradas em *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Adicionalmente, a concentração de sal
10 na etapa de lavagem pode ser selecionada de uma baixa estringência de cerca de 2,0 x SSC a 50°C até uma alta estringência de cerca de 0,2 x SSC a 50°C. Adicionalmente, a temperatura na etapa de lavagem pode ser aumentada de condições de baixa estringência em temperatura ambiente, cerca de 22°C, até condições de alta estringência a cerca de 65°C. A temperatura e sal podem ser variados ou a temperatura ou concentração de sal podem ser mantidas constantes enquanto a outra variável é alterada. Tais condições seletivas toleram pouca combinação errônea entre a sonda e o padrão ou filamento-alvo. Detecção de seqüências de DNA via hibridização é bem conhecida por aqueles versados na técnica e os ensinamentos das Patentes U.S. N^{os}. 4.965.188 e 5.176.995 são exemplificativos de métodos de análises de hibridização.
15
20

O amplicon diagnóstico produzido por esses métodos pode ser detectado através de uma pluralidade de técnicas. Um de tais métodos é Genetic Bit Analysis (Nikiforov e outros, *Nucleic Acid Res.* 22: 4167-4175,
25 1994), onde um oligonucleotídeo de DNA é projetado que se sobrepõe à seqüência de DNA genômico de flanqueamento adjacente e à seqüência de DNA inserida. O oligonucleotídeo é imobilizado em cavidades de uma lâmina de microtitulação. Após PCR da região de interesse (usando um iniciador na seqüência inserida e uma seqüência genômica de flanqueamento adjacente), um produto de PCR com um único filamento pode ser hibridizada ao oligonucleotídeo imobilizado e serve como um padrão para uma reação de extensão de uma única base usando uma DNA polimerase e trifosfatos de di-
30

desoxinucleotídeo (ddNTPs) rotulados específicos para a próxima base esperada. Leitura pode ser baseada em fluorescência ou ELISA. Um sinal indica a presença da seqüência genômica/transgene em virtude de amplificação, hibridização e extensão de uma única base com sucesso.

5 Outro método é a técnica de Piro-sequenciamento, conforme descrito por Winge (Innov. Pharma. Tech. 00: 18-24, 2000). Nesse método, um oligonucleotídeo é projetado que se sobrepõe ao DNA genômico adjacente e a junção de DNA do inserto. O oligonucleotídeo é hibridizado a um produto de PCR de filamento simples da região de interesse (um iniciador na
10 seqüência inserida e um na seqüência genômica de flanqueamento) e incubado na presença de uma DNA polimerase, ATP, sulfúrilase, luciferase, apirase, 5' fosfo-sulfato de adenosina e luciferina. DNTPs são adicionados individualmente e a incorporação resulta em um sinal luminoso que é medido. Um sinal luminoso indica a presença do transgene/seqüência genômica em
15 virtude de amplificação, hibridização e extensão de uma única ou múltiplas bases com sucesso.

 Polarização por fluorescência, conforme descrito por Chen e outros (Genome Res. 9: 492-498, 1999) é um método que pode ser usado para detectar o amplicon da presente invenção. Usando esse método, um oligo-
20 nucleotídeo é projetado que se sobrepõe à junção de DNA inserida e flanqueamento genômica. O oligonucleotídeo é hibridizado ao produto de PCR de filamento simples da região de interesse (um iniciador no DNA inserido e um na seqüência de DNA genômica de flanqueamento) e incubado na presença de uma DNA polimerase e um ddNTP rotulado por fluorescência. Ex-
25 tensão de uma única base resulta em incorporação do ddNTP. Incorporação pode ser medida como uma alteração na polarização usando um fluorômetro. Uma alteração na polarização indica a presença do transgene/seqüência genômica em virtude da amplificação, hibridização e extensão de uma única base com sucesso.

30 TAQMAN® (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) é descrito como um método de detecção e quantificação da presença de uma seqüência de DNA e é totalmente compreendido nas instruções fornecidas pelo fa-

bricante. Resumidamente, uma sonda de oligonucleotídeo de FRET é projetada que se sobrepõe à junção de DNA do inserto e flanqueamento genômico. A sonda de FRET e iniciadores de PCR (um iniciador na seqüência de DNA inserida e um na seqüência genômica de flanqueamento) são ciclizados na presença de uma polimerase termoestável e dNTPs. Hibridização da sonda de FRET resulta em clivagem e liberação da porção fluorescente da porção de resfriamento sobre a sonda de FRET. Um sinal fluorescente indica a presença do transgene/seqüência genômica em virtude de amplificação e hibridização com sucesso.

10 Sinais moleculares foram descritos para uso na detecção de seqüência conforme descrito em Tyangi e outros (Nature Biotech. 14: 303-308, 1996). Resumidamente, uma sonda de oligonucleotídeo de FRET é projetada que se sobrepõe à junção de DNA do inserto e genômico de flanqueamento. A estrutura única da sonda de FRET resulta no fato dela conter uma estrutura secundária que mantém as porções de fluorescência e resfriamento em proximidade íntima. A sonda de FRET e iniciadores de PCR (um iniciador na seqüência de DNA do inserto e uma na seqüência genômica de flanqueamento) são ciclizados na presença de uma polimerase termoestável e dNTPs. Após amplificação por PCR com sucesso, hibridização da sonda de FRET à seqüência-alvo resulta na remoção da estrutura secundária da sonda e separação espacial das porções de fluorescência e resfriamento. Um sinal fluorescente resulta. Um sinal fluorescente indica a presença da seqüência de inserto do transgene/flanqueamento em virtude de amplificação e hibridização com sucesso.

25 MODALIDADES ILUSTRATIVAS DA INVENÇÃO

Safras transgênicas para as quais o método da presente invenção pode ser aplicado incluem, mas não estão limitadas a, safras tolerantes a herbicida, por exemplo, Algodão ROUNDUP READY® 1445 e 88913; milho ROUNDUP READY® GA21, NK603, MON802, MON809; beterraba sacarina ROUNDUP READY® GTSB77 e H7-1; canola ROUNDUP READY® RT73 e GT200; colza ZSR500, soja ROUNDUP READY® 40-3-2, Bentgrass ROUNDUP READY® ASR368, canola HCN10, HCN28 e HCN92, canola

MS1 e RF1, canola OXY-235, canola PHY14, PHY35 e PHY36, chicória RM3-3, RM3-4 e RM3-6, soja A2704-12, A2704-21, A5547-35, A5547-127, soja GU262, soja W62 e W98, algodão 19-51A, algodão 31807 e 31808, algodão BXN, linho FP967, arroz LLRICE06 e LLRICE62, trigo MON71800, milho 676 e 678 e 680, milho B16, milho Bt11, milho CBH-351, milho DAS-06275-8, milho DBT418, milho MS3 e MS6, milho T14 e T25, milho H177 e milho TC1507.

Herbicidas para os quais tolerância de planta transgênica foi demonstrada e o método da presente invenção pode ser aplicado incluem, mas não estão limitados a: glifosato, glifosinato, sulfoniluréias, imidazolinonas, bromoxinila, dalapon, ciclohexanodiona, inibidores de oxidase de protoporfirinogênio e herbicidas de isoxaflutol. Moléculas de polinucleotídeo que codificam proteínas envolvidas em tolerância a herbicida são conhecidas na técnica e incluem, mas não estão limitadas a, uma molécula de polinucleotídeo que codifica sintase de 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato (EPSPS) descrita na Patente U.S. Nº. 5.627.061, na Patente U.S. Nº. 5.633.435, na Patente U.S. Nº. 6.040.497 e na Patente U.S. Nº. 5.094.945 para tolerância ao glifosato, todas as quais são incorporadas por referência; polinucleotídeos que codificam uma oxidoreductase de glifosato e uma N-acetil transferase de glifosato (GOX, Patente U.S. 5.463.175 e GAT, Publicação de Patente U.S. 20030083480, aqui incorporadas por referência); uma molécula de polinucleotídeo que codifica nitrilase de bromoxinila (*Bxn*) descrita na Patente U.S. Nº. 4.810.648 para tolerância à Bromoxinila, a qual é aqui incorporada por referência, uma molécula de polinucleotídeo que codifica desaturase de fitoeno (*crtI*) descrita em Misawa e outros, (1993) *Plant J.* 4: 833-840 e Misawa e outros (1994) *Plant J.* 6: 481-489 para tolerância ao norflurazon; uma molécula de polinucleotídeo que codifica sintase de aceto hidróxi ácido (AHAS, aka ALS) descrita em Sathasiivan e outros (1990) *Nucl. Acids Res.* 18: 2188-2193 para tolerância a herbicidas de sulfoniluréia; e o gene bar descrito em DeBlock e outros (1987) *EMBO J.* 6: 2513- 2519 para tolerância ao glifosinato e bialaphos; resistente à desidrogenase de hidroxifenil piruvato (HPPD, Patente U.S. 6.768.044). O promotor da presente invenção pode expressar

genes que codificam acetiltransferase de fosfinotricina, EPSPS resistente ao glifosato, fosfotransferase de aminoglicosídeo, desidrogenase de hidroxifenil piruvato, fosfotransferase de higromicina, fosfotransferase de neomicina, desalogenase de dalapon, nitrilase resistente à bromoxinila, sintase de antranilato, oxidorreductase de glifosato e N-acetil transferase de glifosato.

Safras transgênicas para as quais o método da presente invenção pode ser aplicado incluem, mas não estão limitadas a, safras resistentes a inseto, por exemplo, eventos de milho, tais como MON15985, 281-24-236, 3006-210-23, MON531, MON757, MON1076 e COT102; ou eventos de milho, tais como 176, BT11, CBH-351, DAS-06275-8, DBT418, MON80100, MON810, MON863, TC1507, MIR152V, 3210M e 3243M.

Os exemplos a seguir são incluídos para demonstrar modalidades preferidas da invenção. Será apreciado por aqueles versados na técnica que essas técnicas descritas nos exemplos que seguem representam técnicas descobertas pelos inventores para funcionar bem na prática da invenção e, assim, podem ser consideradas como constituindo modos preferidos para sua prática. Contudo, aqueles versados na técnica apreciarão, à luz da presente descrição, que muitas alterações podem ser feitas nas modalidades específicas as quais são descritas e ainda obter um resultado similar ou semelhante sem se desviar do espírito e escopo da invenção.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Prole de 40-3-2 carecendo de DNA inserido

Um cultivar de soja de elite compreendendo o evento 40-3-2 ROUNDUP READY® é cruzado com um cultivar convencional (não-transgênico) e segregação de traços e do transgene é acompanhada através de testagem de zigosidade PCR. A presença de seqüências de junção 5' ou 3' pode ser acompanhada conforme mostrado esquematicamente na figura 1. O ensaio de PCR pode ser singleplex ou multiplex. Um controle de quantificação interno pode ser incluído. No caso do evento 40-3-2, o DNA inserido consiste, na direção 5' para 3', de um inserto funcional, um DNA genômico interveniente (reestruturado), um fragmento não-funcional de 72 pb do gene que codifica CP4 EPSPS e seqüência genômica adicional. Fazendo referên-

cia à figura 1, uso de um conjunto de iniciador A-B-C sobre DNA padrão derivado de prole de um cruzamento de evento de soja 40-3-2 com outra planta, por exemplo, permite diferenciar positivamente entre prole que é homozigótica para o DNA inserido, hemizigótica para o DNA inserido ou carece do DNA inserido. O design de iniciador de PCR baseado em seqüências de DNA conhecidas é bem conhecido na técnica. Iniciadores exemplificativos nesse exemplo incluem SEQ ID NO: 3 (iniciador B), SEQ ID NO: 4 (iniciador A) e SEQ ID NO: 5 (iniciador C).

O DNA-padrão é extraído de tecidos de folha de planta ou semente triturada de prole do cruzamento mencionado acima. Resumidamente, perfuração de um orifício de 7 mm pode ser usada para coletar tecido de uma folha recentemente formada de uma planta jovem (menos de 1 mês de idade). O tecido é liofilizado e armazenado em um tubo até necessário. Três contas de vidro de 3 mm são adicionados ao tecido e o tubo é agitado para triturar o tecido em um pó fino. 600 µl de tampão de extração (Tris a 100 mM; KCl a 1 mM; EDTA a 10 mM; pH de 9,5) são adicionados e, após o tubo ser agitado para ressuspender o tecido em pó, ele é incubado a 65°C durante 1 hora, seguido por centrifugação durante 1 minuto a 1500 RPM. 200 µl de tampão de precipitação (KAc a 5 M; pH de 7,0) são adicionados e o tubo é agitado para mistura total, seguido por centrifugação a 3000 RPM durante 10 minutos. 600 µl de sobrenadante contendo DNA são transferidos para um novo tubo contendo 500 µl de isopropanol, misturados e deixados em temperatura ambiente durante 10 minutos. O tubo é centrifugado durante 5 minutos a 3000 RPM para peletizar o DNA e o sobrenadante é removido. O pélete de DNA é seco a 65°C durante 30 minutos e, então, 200 µl de tampão TE (Tris a 10 mM; EDTA a 1 mM) são adicionados e incubados em temperatura ambiente durante pelo menos 30 minutos. O pélete é agitado durante 1 minuto, centrifugado durante 1 minuto a 1000 RPM e armazenado a 4°C.

Após extração de DNA-padrão, reação de amplificação por PCR multiplex TAQMAN® é realizada sobre cada amostra. 3 µl de DNA template extraído são misturados com 0,2 µl de sonda de controle interno WT VIC® [SEQ ID NO: 7] suspenso em água purificada de 18 megohm [Sigma Catálo-

go No. W-4502] (concentração final de 0,2 µM); 0,2 µl de sonda Event 6-FAM® MGB [SEQ ID NO: 6] suspensa em água purificada de 18 megohm (concentração final de 0,2 µM); 0,5 µl de mistura de iniciador de sonda de zigosidade suspensa em água purificada de 18 megohm (concentração final de 1,0 µM preparada através de suspensão de cada iniciador (SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 5) em água de 18 megohm em uma concentração de 20 µM; e 5 µl de mistura de tampão mestre universal 2X [Applied Biosystems parte Nº 4304437]. O volume final é ajustado para 10 µl com água de 18 megohm e PCR é realizada em um ciclizador térmico Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700 ou MJ Research DNA Engine PTC-225 usando os seguintes parâmetros: 1 ciclo de 50°C, 2 minutos; 1 ciclo de 95°C, 10 minutos; 10 ciclos de 95°C, 15 segundos, seguido por 64°C, 1 minuto; -1°C/ciclo; 30 ciclos de 95°C, 15 segundos, seguido por 54°C, 1 minuto; e 1 ciclo de 10°C, manter a temperatura.

Os seguintes controles positivos são usados: DNA-padrão de soja transgênica 40-3-2 homocigótica conhecida; DNA-padrão de soja transgênica 40-3-2 hemizigótica conhecida. Os seguintes controles negativos são usados: DNA-padrão de soja não-transgênica conhecida; nenhum controle de DNA-padrão.

Fluorescência da sonda FAM é lida a 520 nm; fluorescência da sonda VIC® é lida a 550 nm. Sondas MGB TAQMAN® fluorogênicas são PB65 (6FAM-CCTTTTCCATTTGGG; SEQ ID NO: 6) e PB1172 (VIC®-ACCTCGTTTCT ATGCT AATT AC; SEQ ID NO: 7).

Após cruzamento de uma linhagem 40-3-2 com uma linhagem convencional, linhagens de prole são identificadas que carecem de uma sequência de inserto amplificada detectável e são selecionadas com relação à sensibilidade ao glifosato e traços de interesse. Cruzamento assistido por marcador pode ser empregado nesse processo. A presença de um transgene também pode ser avaliada na prole por meio de outros métodos, tais como outros métodos baseados em PCR, Southern blots, Northern blots, Western blots ou análise por ELISA.

Exemplo 2: Prole transgênica de 40-3-2 que compreende um transgene de

tolerância ao glifosato diferente e não contém a inserção funcional 40-3-2

Um cultivar de soja de elite compreendendo o evento 40-3-2 ROUNDUP READY® pode ser cruzado com um cultivar de soja compreendendo um evento transgênico diferente que confere tolerância ao glifosato e segregação dos dois insertos transgênicos e traços agronômicos adicionais são acompanhados. O teste de zigosidade baseado em PCR com relação às seqüências específicas ao evento 40-3-2 é realizado conforme descrito no Exemplo 1. Testagem de zigosidade similar pode, opcionalmente, ser realizada para identificar prole homozigótica ou hemizigótica para o outro evento ou eventos transgênicos. A prole é selecionada através do teste de zigosidade baseado em PCR com relação à perda da inserção 40-3-2 e selecionada com relação à resistência ao glifosato e outros traços de interesse.

Os métodos usados para identificar prole heterozigótica de homozigótica contendo DNA de inserção 40-3-2 são descritos em um ensaio de zigosidade para o qual exemplos de condições são descritos na Tabela 2 e na Tabela 3. Os iniciadores de DNA usados no ensaio de zigosidade são iniciadores (SEQ ID NO: 3), (SEQ ID NO: 4), (SEQ ID NO: 5), o iniciador rotulado 6FAM® (SEQ ID NO: 6) e o iniciador rotulado VIC® (SEQ ID NO: 7), 6FAM e VIC são produtos de corante fluorescente da Applied Biosystems (Foster City, CA) presos ao iniciador de DNA.

SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 5, quando usadas nesses métodos de reação, produzem um amplicon de DNA para soja não-transgênica, dois amplicons de DNA para soja heterozigótica contendo o DNA de evento 40-3-2 e um amplicon de DNA para planta de soja 40-3-2 homozigótica. Os controles para essa análise incluiriam um controle positivo de soja homozigótica e heterozigótica contendo DNA do evento 40-3-2, um controle negativo de soja não-transgênica e um controle negativo que não contém DNA-padrão. Esse ensaio é otimizado para uso com um termociclizador Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700 ou Eppendorf Mastercycler Gradient. Outros métodos e aparelhos conhecidos por aqueles versados na técnica que produzem amplicons que identificam a zigosidade da prole de cruzamentos feitos com plantas 40-3-2 está dentro da capacida-

de da técnica.

Tabela 2. Soluções de reação do ensaio de zigosidade

Etapa	Reagente	Quantidade	Comentários
1	Água isenta de nuclease	Adicionar 10 µl até volume final	
2	2X mistura-mestre universal (Applied Biosystems cat. Nº 4304437)	5 µl	1 X concentração final
3	Iniciadores SEQ ID NO: 3, 4 e 5 (ressuspensos em água isenta de nuclease até uma concentração de 20 µM)	0,5 µl	Concentração final de 0,25 µM
4	Iniciador 6FAM® (ressuspensa em água isenta de nuclease até uma concentração de 10 µM)	0,2 µl	Concentração final de 0,4 µM
5	Iniciador VIC® (ressuspensa em água isenta de nuclease até uma concentração de 10 µM)	0,2 µl	Concentração final de 0,15 µM
6	DNA polimerase <i>REDTaq</i> (1 unidade/µl)	1,0 µl (recomendado trocar de pipetas antes da próxima etapa)	1 unidade/reação
7	DNA extraído (padrão): <ul style="list-style-type: none"> • amostras a serem analisadas (folhas individuais) • Controle negativo • Controle negativo • Controle positivo • Controle positivo 	30 µl <ul style="list-style-type: none"> • 4-80 ng de DNA genômico • 4 ng de DNA genômico de soja não-transgênico • Sem DNA template (solução na qual o DNA foi ressuspenso) • 4 ng de DNA genômico a partir do evento de soja heterozigótica 40-3-2 • 4 ng de DNA genômico a partir do evento de soja homozigótica 40-3-2 conhecida 	Diluído em água
8	Misturar levemente, adicionar 1-2 gotas de óleo mineral por cima de cada reação		

Condições do termociclizador no ensaio de zigosidade: Prosseguir com a amplificação de DNA em um Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700 ou termociclizador Eppendorf Mastercycler Gradient usando os seguintes parâmetros de ciclicização. Quando de operação da PCR no Eppendorf Mastercycler Gradient ou MJ Engine, o termociclizador será

operado no modo calculado. Quando de operação da PCR no Perkin-Elmer 9700, operar o termociclizador com o ajuste da velocidade no máximo.

Tabela 3.

Ciclo Nº	Ajustes: Robocycler Stratagene
1	94°C 3 minutos
38	94°C 1 minuto 60°C 1 minuto 72°C 1 minuto e 30 segundos
1	72°C 10 minutos

Ciclo Nº	Ajustes: MJ Engine ou Perkin-Elmer 9700
1	94°C 3 minutos
38	94°C 30 segundos 60°C 30 segundos 72°C 1 minuto e 30 segundos
1	72°C 10 minutos

Ciclo Nº	Ajustes: Eppendorf Mastercycler Gradient
1	94°C 3 minutos
38	94°C 15 segundos 60°C 15 segundos 72°C 1 minuto e 30 segundos
1	72°C 10 minutos

Exemplo 3: Conversão de uma linhagem de milho contendo evento GA21 - análise de segregante

5

A presente invenção pode ser aplicada ao cruzamento de milho. Uma linhagem de milho endógama compreendendo o evento GA21 foi cruzada com outra linhagem endógama compreendendo o evento NK603 e segregação da prole foi acompanhada de forma a identificar eficazmente prole que carece de seqüências associadas ao evento GA21, compreende o evento NK603 e exibe outros marcadores de DNA da linhagem precursora que compreende GA21.

10

Conversão da linhagem GA21 foi realizada por meio de uma a-

bordagem de cruzamento assistido por marcador multi-empilhado de ensaios baseados em PCR específicos evento de, PCR marcador-ligado e análise de Southern blot, para confirmar a presença das seqüências de DNA relacionadas ao evento NK603 e ausência de seqüências de DNA relacionadas ao evento GA21-. Após múltiplos recruzamentos, foi confirmada a presença do
5 evento NK603 e de marcadores de DNA associados à base genética e qualidades agrônômicas do precursor original que compreende GA21.

A linhagem endógama de milho precursora recorrente RR728-18GA21 foi cruzada com o precursor doador 9034(5)NK603 e recruzada com
10 o precursor recorrente. A BC1S0 foi cruzada com o precursor recorrente e seu genotipo foi selecionado através de um ensaio baseado em PCR. Linhagens exibindo provável heterozigidade em ambos os loci transgênicos foram selecionadas e classificadas de acordo com o número de marcadores de PCR presentes para o precursor recorrente (RP). Linhagens selecionadas
15 (geração BC2S0) foram recruzadas com o precursor recorrente novamente (BS3S0), polinizadas e selecionadas através de Taqman PCR. De 558 linhagens coletadas, 165 compreendiam o evento NK603 e 38 dessas 165 foram consideradas altamente prováveis como sendo heterozigóticas para GA21 baseado no ensaio de evento GA21 e marcadores relacionados co-
20 dominantes. Essa geração foi polinizada para proporcionar uma geração BC3F2 e prole foi novamente selecionada com relação a marcadores de PCR relacionados a GA21, ensaio de zigosidade baseado em NK603 PCR e percentual de marcadores precursores recorrentes (baseado em PCR). Linhagens selecionadas para outro cruzamento nesse estágio que compreen-
25 diam até quase 95% de marcadores precursores recorrentes eram heterozigóticas para GA21 e compreendiam NK603 (Tabela 4).

Tabela 4

<u>Linhagem</u>	<u>% de marcadores precursores recorrentes</u>
304	90,89
312	89,78
323	91,94
336	94,94
397	90,72
406	92,77

A geração BC3F2 foi polinizada e a prole foi crescida e selecionada com relação à tolerância ao ROUNDUP®; seleção assistida por marcador com relação à presença de GA21 nula homozigótica e NK603 homozigótica e o percentual mais alto de marcadores precursores recorrentes. 15 de 251 linhagens classificadas eram GA21 nulas homozigóticas (isto é, carecem do evento GA21) e homozigóticas para o evento NK603. Sessenta reservatórios de 5 proles de cada uma das linhagens selecionadas foram submetidos à análise de Southern blot do DNA genômico digerido por EcoRV. Fileiras de controle incluíam DNA genômico de linhagens de milho GA21 e NK603 conhecidas e uma amostra de DNA genômico de GA21 incrustado a 1:9 em DNA genômico de NK603 para simular a presença de uma planta contendo GA21 hemizigótica em um reservatório de cinco plantas.

Uma sonda de promotor de actina de arroz foi usada. A sonda foi preparada através de síntese por PCR usando pDPG434 como DNA padrão e iniciadores ract-F TCGAGGTCATTCATATGCTTGAGAAG [SEQ ID NO: 8] e ract-R AAGCTCCGCACGAGGCTGCATTTG [SEQ ID NO: 9], seguido por rotulação com digoxigenina. pDPG434 é o constructo de plasmídeo usado para dar origem ao evento GA21 (Patente U.S. 6.040.497, incorporada aqui por referência) e contém elementos em comum com o constructo de plasmídeo usada para dar origem ao evento NK603. A sonda é um fragmento de DNA de 1,4 Kb abrangendo o promotor de actina 1 de arroz, íntron e região não-traduzida 5' (UTR). Com essa sonda, DNA genômico

contendo NK603 proporciona uma banda de hibridização de 4 Kb e DNA genômico contendo GA21 proporciona uma banda de hibridização de cerca de 21 Kb. O padrão de hibridização resultante indicou sinal de específico NK603 detectável e nenhum sinal específico de GA21 detectável em fileiras experimentais. Fileiras experimentais proporcionaram os sinais GA21 e NK603 específicos de tamanho esperado, confirmando que o ensaio era sensível o bastante para identificar um único indivíduo GA21 hemizigótico em um reservatório de cinco plantas. A linhagem endógama convertida é identificada como 9034 (NK603).

Esse método pode também ser usado para identificar prole não-transgênica (isto é, segregantes nulos para ambos os eventos transgênicos) em um cruzamento, tal como aquele descrito acima. Tais segregantes nulos não compreenderiam, nesse caso, nem o evento GA21 nem o NK603, mas podem compreender marcadores genéticos e qualidades agronômicas de uma ou ambas as linhagens precursoras.

Todos os métodos descritos e reivindicados aqui podem ser feitos e executados sem experimentação indevida à luz da presente descrição. Embora os métodos da presente invenção tenham sido descritos em termos de modalidades preferidas, será evidente para aqueles versados na técnica que variações podem ser aplicadas nas etapas ou na seqüência de etapas dos métodos descritos aqui sem se desviar do conceito, espírito e escopo da invenção. Todos de tais substitutos similares e modificações evidentes para aqueles versados na técnica são considerados como estando dentro do espírito, escopo e conceito da invenção.

LISTAGEM DE SEQÜÊNCIA

<110> Arnevik, Cindy
 Dobert, Ray
 Zeng, Qingyi
 Listello, Jennifer
 Heck, Gregory
 Soteris, John
 Wu, Kunsheng

<120> Desenvolvimento de germoplasma usando segregados de cruzamentos transgênicos

<130> 11899.0243.00PC00

<160> 9

<170> PatentIn Versão 3.3

<210> 1

<211> 291

<212> Dna

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Seqüência compreendendo seqüência de flanqueamento 5' de inserto primário em evento de soja 40-3-2

<400> 1

CGTGGGTGGG GTCCATCTTT GGGACCCTGT CGGCAGAGGC ATCTTCAACG ATGGCCTTTC 60

CTTTATCGCA ATGATGGCAT TTGTAGGAGC CACCTTCCTT TTCCATTGG GTTCCCTATG 120

TTTATTTTAA CCTGTAIGTA TGATCTTATT TTGAATGAAA TGCAATAAGT TATTTCTAGT 180

AAAAAAAAT AACATTGA TAGAAACAAA TTAAGCATG CAAAATAAC TCATTAGCAT 240

CGGTTAAATT GAAGGGTTG AATAATTTGC ACAAGTTCT GAATTCAAAT C 291

<210> 2

<211> 860

<212> Dna

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Seqüência compreendendo seqüência de flanqueamento 3' de inserto primário em evento de soja 40-3-2

<400> 2

TTTCTGTTGA ATACGTTAAG CATGTAATAA TTAACATGTA ATGCATGACG TTATTTATGA 60

GATGGGTTTT TATGATTAGA GTCCCGCAAT TATACATTTA ATACGCGATA GAAAACAAAA 120

TATAGCCGCG CAAACTAGGA TAAATTATCG CGCGCGGTGT CATCTATGTT ACTAGATCGG	180
GGATCGATCC CCCACCGGTC CTTTCATGTTT GCGCGTCTCG CGAGCGGTGA AACGCGCATC	240
ACCGGCCTTC TGGAAGGCGA GGACGTCATC AATACGGGCA AGGCCATGCA GGCCATGGGC	300
GCCAGGATCC GTAAGGAAGG CGACACCTGG ATCATCGATG GCGTCGGCAA TGGCGGCCTC	360
CTGGCGCCTG AGGCGCCGCT CGATTTCCGGC AATGCCGCCA CGGGCTGCCG CCTGACCATG	420
GGCCTCGTCG GGGTCTACGA TTTCAAGCGC ATCATGCTGG GAAATTTTAG CGAGATTATA	480
AGTATCTTCC TGGGGATCTC TGCTGTTACT GGTGAATAGT GAGACAGAGT CTTCTGAGCT	540
CATAGGATAA AATAAATTAT AATTAGTAAA TTTTTTAATT AAATAAATCA ATTACTTCAT	600
AAATAATTTT TTTTATAGAA TATGTTGACA TTCTAGCTGG ATATAGAACT AATATAAAGA	660
AACCTTAAAA ATTTTGTTTG GAAGAATATG TTATTGAAAG ACAAATCTAA TTAAGTTTAT	720
CAGGGTCATT TGTTGAAGAT AGGAAACCTT CAGCAATTTG AATATTAAGT AACTGCTTCT	780
CCCAGAATGA TCGGAGTTTC TCCTCCTGCT ATTACATGAA AAAAAATAAA AAATAAAAAA	840
AAGATAAGAT TAAGCTTCAA	860
<210>	3
<211>	21
<212>	Dna
<213>	Seqüência artificial
<220>	
<223>	Sg1147
<400>	3
GGCATTTGTA GGAGCCACCT T	21
<210>	4
<211>	31
<212>	Dna
<213>	Seqüência artificial
<220>	
<223>	Sg1148
<400>	4
TTCATTCAAA ATAAGATCAT ACATACAGGT T	31
<210>	5
<211>	23
<212>	Dna
<213>	Seqüência artificial
<220>	
<223>	Sq3523
<400>	5
GTGTCGTTCA CATCTTTGCA AGA	23
<210>	6
<211>	15

<212>	Dna	
<213>	Seqüência artificial	
<220>		
<223>	Sonda Fam Taqman Pb65	
<400>	6	
CCTTTTCCAT	TTGGG	15
<210>	7	
<211>	21	
<212>	Dna	
<213>	Seqüência artificial	
<220>		
<223>	Sonda Vic Taqman Pb1172	
<400>	7	
ACCTCGTTTC	TAGCTAATTA C	21
<210>	8	
<211>	30	
<212>	Dna	
<213>	Seqüência artificial	
<220>		
<223>	Iniciador Ract-F	
<400>	8	
TCGAGGTCAT	TCATTCATAT GCTTGAGAAG	30
<210>	9	
<211>	24	
<212>	Dna	
<213>	Seqüência artificial	
<220>		
<223>	Iniciador Ract-R	
<400>	9	
AAGCTCCGCA	CGAGGCTGCA TTTG	24

LISTAGEM DE REFERÊNCIA

As referências a seguir, até o ponto em que elas proporcionam procedimentos exemplificativos ou outros detalhes suplementares àqueles apresentados aqui, são especificamente incorporados aqui por referência:

- 5 Patentes US 6.825.400; 6.818.807; 6.468.747; 6.563.026; 6.040.497
Hare & Chua, Nature Biotechnol. 20: 575-580
Padgett, Crop Sci 35: 1451-1461
Windels, Eur Food Res. Technol. 213: 107-112
Bubner, BMC Biotechnol. 4: 14 (2004)
- 10 Schmidt, Plant Cell Rep. 20: 422-428
Song, Plant Cell Rep. 20: 948-954
Bubner, Plant Cell Rep. 23: 263-271
Windels, Med. Fac. Landbouww Univ. Gent. 64/5b: 459-462
Fehr, W.R. 1987. *Principles of Cultivar Development*, Vol. 1: Theory and Technique.
- 15 Simmonds, N. W. e J. Smartt. 1999. *Principles of Crop Improvement*. 2^a Ed.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para o desenvolvimento de uma variedade de safra de elite compreendendo:

- 5
- a) cruzamento de uma primeira linhagem de elite compreendendo um transgene que codifica um traço útil e a qual exibe pelo menos um traço de elite adicional com uma segunda linhagem que exibe um traço útil;
 - b) obtenção de linhagens híbridas F1 individuais;
 - c) seleção de pelo menos um indivíduo híbrido F1 que exibe um traço útil derivado da primeira ou da segunda linhagens;
 - d) derivação de pelo menos uma outra geração de prole do indivíduo híbrido F1 selecionado;
 - e) classificação de prole F2 ou posterior que exibe pelo menos um dos traços de elite adicionais da primeira linhagem com relação à presença do transgene; e
 - f) identificação de pelo menos um indivíduo carecendo do transgene da primeira linhagem.
- 10
- 15

2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o processo de classificação da etapa (e) compreende um ensaio de zigosidade ou um ensaio ELISA.

20

3. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o indivíduo identificado na etapa (f) ainda compreende o traço útil da segunda linhagem.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o traço útil é tolerância a herbicida.

25

5. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o traço útil é tolerância ao glifosato.

6. Método de acordo com a reivindicação 5, em que a tolerância ao glifosato é proporcionada pela expressão de CP4 EPSPS, EPSPS, GOX ou GAT tolerante ao glifosato.

30

7. Método de acordo com a reivindicação 5, em que os traços úteis exibidos pelas primeira e segunda linhagens compreendem tolerância a

herbicida.

8. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a safra é selecionada do grupo consistindo em soja, milho, algodão, arroz, trigo, canola, alfafa, turfa, linho, beterraba sacarínica, batata e chicória.

5 9. Método de acordo com a reivindicação 8, em que a safra é soja e a primeira linhagem de elite compreende o evento 40-3-2 de soja tolerante ao glifosato.

10. Método de acordo com a reivindicação 8, em que a safra é milho e a primeira linhagem de elite compreende o evento GA21.

10 11. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a segunda linhagem compreende um transgene.

12. Método de acordo com a reivindicação 1, ainda compreendendo:

15 g) cruzamento de pelo menos um indivíduo da etapa (f) com uma linhagem tolerante ao glifosato para obter pelo menos uma planta F1 individual;

h) seleção de pelo menos uma planta individual F1 exibindo tolerância ao glifosato;

20 i) derivação de pelo menos uma outra geração do indivíduo F1;

j) seleção da outra geração com relação à presença dos traços de elite adicionais da primeira linhagem e tolerância ao glifosato; e

25 k) seleção de sementes de prole ou plantas em que as sementes ou plantas exibem tolerância ao glifosato.

13. Método de acordo com a reivindicação 12, em que a tolerância ao glifosato é proporcionada pela expressão de um CP4 EPSPS, EPSPS, GOX ou GAT.

30 14. Método de acordo com a reivindicação 12, em que a safra é soja e a linhagem tolerante ao glifosato da etapa (a) é o evento 781 de soja.

15. Método para produção de uma variedade de safra de elite não-transgênica compreendendo:

- 5
- a) cruzamento de uma linhagem de elite compreendendo um transgene e exibindo um ou mais traços de elite transgenicamente derivados e um ou mais traços de elite convencionalmente derivados com uma linhagem não-transgênica convencional;
 - b) obtenção de linhagens híbridas F1 individuais;
 - c) seleção de pelo menos um indivíduo híbrido F1 exibindo pelo menos uma característica da linhagem de elite;
 - d) derivação de pelo menos uma outra geração de prole do indivíduo híbrido F1 selecionado;
 - e) classificação de prole do indivíduo híbrido exibindo pelo menos um traço de elite convencionalmente derivado da linhagem de elite com relação à presença do transgene; e
 - f) seleção de prole exibindo pelo menos um traço de elite convencionalmente derivado da linhagem de elite em que nenhuma seqüência de DNA de transgene está presente no genoma da prole.
- 10
- 15

16. Método de acordo com a reivindicação 15, em que a linhagem de elite compreende o evento 40-3-2 de soja.

20 17. Método de acordo com a reivindicação 16, em que a linhagem de elite compreendendo o evento de soja 40-3-2 foi exposta a um agente de mutagênese para desenvolver um perfil genético único.

25 18. Método de acordo com a reivindicação 15, em que a linhagem de elite exibe um ou mais traços selecionados do grupo consistindo em: tolerância a herbicida, resistência a inseto e esterilidade masculina.

19. Método de acordo com a reivindicação 15 ainda compreendendo:

- g) cruzamento de pelo menos uma prole da etapa (f) com outra linhagem para obter pelo menos uma planta F1 individual;
 - h) seleção de pelo menos uma planta individual F1 exibindo um ou mais traços derivados de seus precursores;
- 30

- i) derivação de pelo menos uma outra geração do indivíduo F1;
- j) classificação de outra geração com relação à presença de traços de elite; e
- 5 k) seleção de sementes ou plantas de prole, em que as sementes ou plantas exibem um ou mais traços de elite.

20. Método para identificação de segregantes nulos com relação a um transgene em um programa de cruzamento de planta compreendendo:

- 10 a) cruzamento de uma primeira linhagem contendo um transgene que codifica um traço útil inserido em seu genoma com uma segunda linhagem;
- b) obtenção de indivíduos F1 híbridos;
- c) derivação de pelo menos uma outra geração de prole do indivíduo F1;
- 15 d) realização de análise de zigosidade sobre a outra geração de prole e opcionalmente análise de Southern ou Western;
- e) seleção de prole em que elementos do transgene estão ausentes e o sítio de inserção do transgene é restaurado para se aproximar de seu estado nativo; e
- 20 f) derivação de outras gerações da prole selecionada, em que a remoção do transgene não é causada pela presença de uma recombinase transgênica.

21. Método de acordo com a reivindicação 20, em que o transgene codifica tolerância a herbicida.

25 22. Método de acordo com a reivindicação 21, em que o transgene codifica tolerância ao glifosato.

23. Método de acordo com a reivindicação 22, em que o transgene codifica CP4 EPSPS, EPSPS, GOX ou GAT.

30 24. Método de acordo com a reivindicação 20, em que o transgene codifica uma toxina inseticida derivada de *Bacillus thuringiensis*.

25. Planta, uma planta de prole ou uma semente produzida através do método como definido na reivindicação 1, 12, 15, 19 ou 20.

26. Planta ou semente produzida através do método como definido na reivindicação 1, 12 ou 19, em que a planta compreende um transgene.

27. Planta ou semente transgênica de acordo com a reivindicação 26, a qual contém um gene heterólogo o qual codifica uma enzima EPSPS tendo uma K_m para fosfoenolpiruvato (PEP) entre 1 e 150 μM e uma proporção de K_i (glifosato)/ K_m (PEP) entre cerca de 2 e 500, a referida planta exibindo tolerância ao herbicida de N-fosfometil glicina em uma taxa de 453,6 g/4047 m^2 (1 libra/acre) sem redução significativa no rendimento em virtude de aplicação do herbicida.

28. Planta ou semente produzida através do método como definido na reivindicação 15, 19 ou 20, em que a planta não compreende um transgene.

29. Planta, semente, planta de prole ou semente de prole compreendendo traços agronômicos de elite em que os referidos traços agronômicos de elite são derivados de uma linhagem doadora compreendendo os referidos traços agronômicos de elite e pelo menos uma inserção transgênica e em que a referida planta, semente, planta de prole ou semente de prole é ainda caracterizada pela ausência de uma ou mais inserções transgênicas da linhagem doadora.

30. Planta de acordo com a reivindicação 29, em que um dos traços de elite é tolerância a herbicida.

31. Planta de acordo com a reivindicação 30, em que o traço de elite é tolerância ao glifosato.

32. Planta de acordo com a reivindicação 31, em que a tolerância ao glifosato é proporcionada pela expressão de CP4 EPSPS, EPSPS, GOX ou GAT tolerante ao glifosato.

33. Método de acordo com a reivindicação 6, 13 ou 23, em que o transgene que codifica CP4 EPSPS compreende um promotor do vírus de DNA de planta, um peptídeo de trânsito em cloroplasta, CP4 EPSPS e um terminador NOS.

Mapa de ensaio de zigosidade 40-3-2

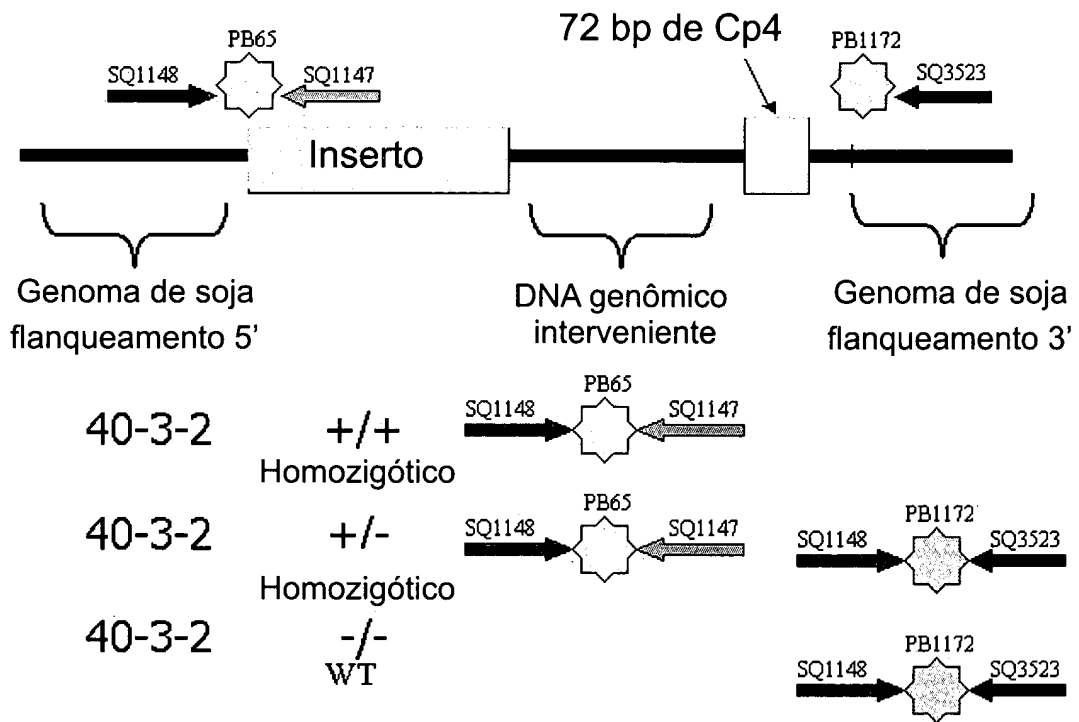


FIG 1

Processo de cruzamento de soja

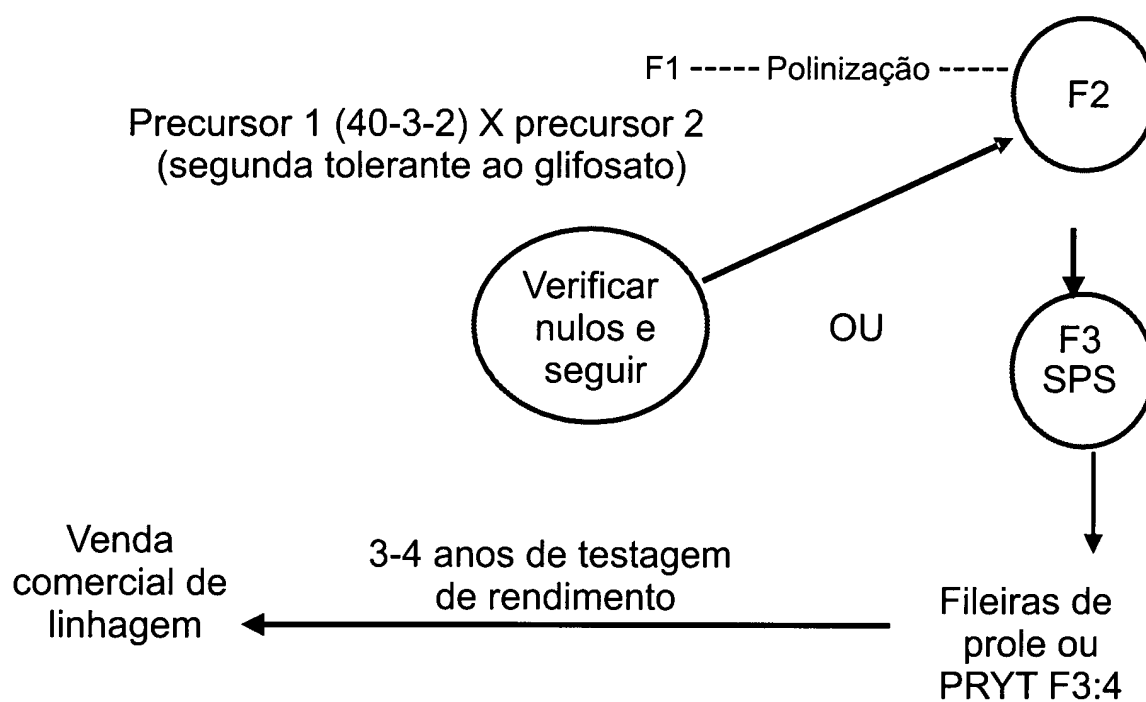


FIG 2

Verificação de nulos durante processo de desenvolvimento de sementes para cruzamento

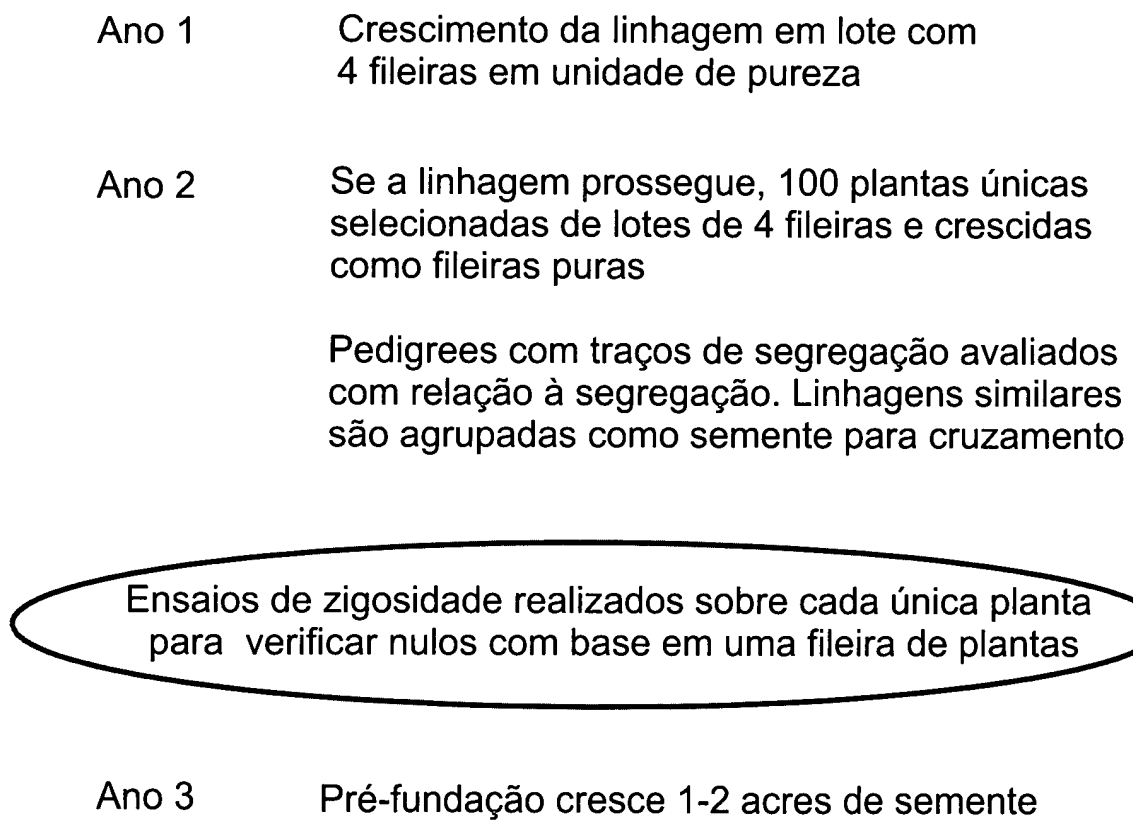


FIG 3

PI 0614693-7

RESUMO

Patente de Invenção: **"DESENVOLVIMENTO DE GERMOPLASMA USANDO SEGREGADOS DE CRUZAMENTOS TRANSGÊNICOS"**.

5 A presente invenção refere-se a um método para o desenvolvimento de novo germoplasma de planta usando segregados de uma linhagem transgênica combinados com testagem de zigosidade baseada em PCR e, opcionalmente, análise de Southern Blot.