

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

(21) **PI0610462-2 A2**



* B R P I O 6 1 0 4 6 2 A 2 *

(22) Data de Depósito: 04/04/2006
(43) Data da Publicação: 22/06/2010
(RPI 2059)

(51) *Int.Cl.:*
C12Q 1/68

(54) Título: **EVENTO DE ELITE A5547-127 E
MÉTODOS E KITS PARA IDENTIFICAR TAL EVENTO
EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS**

(57) **Resumo:** A presente invenção refere-se a ferramentas as quais permitem a identificação rápida e inequívoca do evento de elite A5547-127 em amostras biológicas.

(30) Prioridade Unionista: 11/04/2005 EP 05 075846.5,
12/04/2005 US 60/670,414

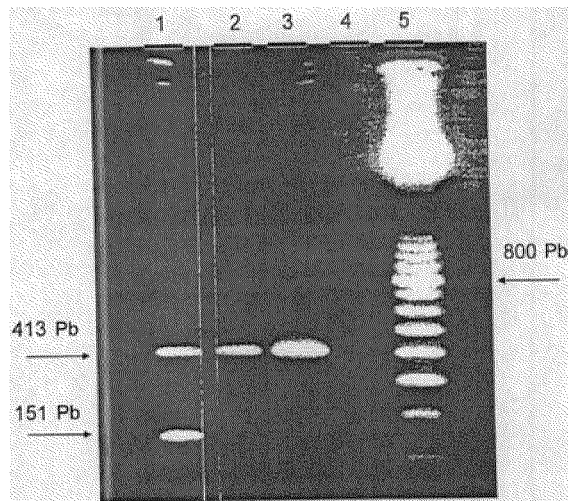
(73) Titular(es): BAYER BIOSCIENCE N.V

(72) Inventor(es): Marc De Beuckeleer

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

(86) Pedido Internacional: PCT EP2006003455 de 04/04/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/108675 de 19/10/2006



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"EVENTO DE ELITE A5547-127 E MÉTODOS E KITS PARA IDENTIFICAR TAL EVENTO EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS"**.

Campo da invenção

5 A presente invenção refere-se a métodos e kits para identificação em amostras biológicas da presença de material vegetal, compreendendo especificamente o evento de transformação A5547-127, assim como plantas de soja transgênicas, material vegetal e sementes contendo tal evento. As plantas de soja da invenção combinam o fenótipo tolerante herbicida
10 com um desempenho agrônômico, estabilidade genética e adaptabilidade a diferentes cenários genéticos equivalentes à linhagem de soja não-transformada na ausência de pressão de ervas daninhas.

Antecedentes da invenção

15 A expressão fenotípica de um transgene em uma planta é determinada tanto pela própria estrutura do gene quanto pela sua localização no genoma da planta. Ao mesmo tempo a presença do transgene (em um DNA estrangeiro) em diferentes locais no genoma irá influenciar o fenótipo global da planta de diferentes formas. A introdução agronomicamente ou industrialmente bem-sucedida de uma característica comercialmente interessante em uma planta por manipulação genética pode ser um procedimento demorado dependente de diferentes fatores. A verdadeira transformação e regeneração das plantas geneticamente transformadas são somente o
20 primeiro em uma série de etapas de seleção, os quais incluem a extensiva caracterização genética, criação e avaliação em testes de campo, eventualmente levando à seleção de um evento de elite.
25

 A identificação inequívoca de um evento de elite está se tornando crescentemente importante em vista das discussões de novos alimentos/ração, segregação de produtos GMO e não-GMO e da identificação de material proprietário. Idealmente, tal método de identificação é tanto rápido
30 quanto simples, sem a necessidade de um estabelecimento laboratorial extensivo. Além disso, o método deve proporcionar resultados que permitam a determinação inequívoca do evento de elite sem a interpretação perita, mas

o qual mostre sob um exame minucioso perito, caso necessário.

5 A5547-127 foi selecionado como um evento de elite no desenvolvimento da soja (*Glycine max L.*) resistente ao herbicida Liberty[®], pela transformação da soja com um plasmídeo compreendendo o gene *pat* sintético codificando tolerância à fosfotricina e pode ser comercialmente vendida como soja Liberty Link[®]. As ferramentas para uso em métodos simples e inequívocos para a identificação do evento de elite A5547-127 em amostras biológicas são aqui descritas.

Sumário da invenção

10 A presente invenção refere-se a métodos para identificar o evento de elite A5547-127 em amostras biológicas, cujos métodos são baseados em iniciadores ou sondas as quais reconhecem especificamente a seqüência flanqueadora 5' e/ou 3' do A5547-127.

15 Mais especificamente, a invenção refere-se a um método compreendendo a amplificação da seqüência de um ácido nucléico presente em amostras biológicas, usando uma reação em cadeia da polimerase com pelo menos dois iniciadores, um dos quais reconhece a região flanqueadora 5' ou 3' do A5547-127, a outra a qual reconhece uma seqüência no DNA estrangeiro, preferivelmente para obter um fragmento de DNA de entre 100 e 500 bp. Os
20 iniciadores podem reconhecer uma seqüência na região flanqueadora 5' do A5547-127 (SEQ ID NO: 1, da posição 1 até a posição 311) ou na região flanqueadora 3' do A5547-127 (complemento da SEQ ID NO: 2 da posição 510 até a posição 1880) e uma seqüência no DNA estrangeiro (complemento da SEQ ID NO: 1 da posição 312 até a 810 ou a SEQ ID NO: 2 da posição
25 1 até a posição 510), respectivamente. O iniciador reconhecendo a região flanqueadora 5' pode compreender a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID NO: 15 e o iniciador reconhecendo uma seqüência no DNA estrangeiro pode compreender a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID NO: 13 aqui descrita.

30 A presente invenção, mais especificamente, refere a um método para identificar o evento de elite A5547-127 em amostras biológicas, cujo método compreende a amplificação de uma seqüência de um ácido nucléico presente em uma amostra biológica, usando uma reação em cadeia

da polimerase com dois iniciadores com a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID NO: 15 e a SEQ ID NO: 13 respectivamente, para obter um fragmento de DNA de cerca de 151 bp.

A presente invenção ainda refere-se às seqüências flanqueadoras específicas do A5547-127, aqui descrita, a qual pode ser usada para desenvolver métodos de identificação específicos para A5547-127 em amostras biológicas. Mais particularmente, a invenção refere-se às regiões flanqueadoras 5' e 3' do A5547-127, as quais podem ser usadas para o desenvolvimento de iniciadores específicos e sondas, conforme adicionalmente aqui descrito. A invenção ainda refere-se a métodos de identificação para a presença do A5547-127 em amostras biológicas baseando-se no uso de tais iniciadores ou sondas específicas. As sondas podem consistir em uma seqüência de nucleotídeos de 17 até cerca de 200 nucleotídeos consecutivos selecionados da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 1 até o nucleotídeo 311, ou o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID NO: 2 do nucleotídeo 510 até o nucleotídeo 1880) combinada com os iniciadores consistindo em uma seqüência de nucleotídeos de 17 até cerca de 200 nucleotídeos consecutivos selecionados do complemento de uma seqüência de nucleotídeos da SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 312 até o nucleotídeo 810 ou a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID NO: 2 do nucleotídeo 1 até o nucleotídeo 510. Os iniciadores também podem compreender essas seqüências de nucleotídeos localizadas nas suas extremidades 3' extremas, e ainda compreender seqüências não-relacionadas ou seqüências derivadas das seqüências de nucleotídeos mencionadas, mas compreendendo maus emparelhamentos.

A invenção refere-se ainda a kits para identificar o evento de elite A5547-127 em amostras biológicas, os referidos kits compreendendo pelo menos um iniciador ou sonda, a qual reconhece especificamente a região flanqueadora 5' ou 3' do A5547-127.

O kit da invenção pode compreender, além de um iniciador o qual reconhece especificamente a região flanqueadora 5' ou 3' do A5547-127, um segundo iniciador o qual reconhece especificamente uma seqüência

no DNA estrangeiro de A5547-127, para uso em um protocolo de identificação de PCR. Preferivelmente, o kit da invenção compreende dois iniciadores específicos, um dos quais reconhece uma seqüência na região flanqueadora 5' do A5547-127, e a outra a qual reconhece uma seqüência no DNA estrangeiro. Especialmente o iniciador reconhecendo a região flanqueadora 5' pode compreender a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID NO: 14 e o iniciador reconhecendo o transgene pode compreender a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID NO: 13 ou qualquer outro iniciador, conforme aqui descrito.

5
10 A invenção refere-se ainda a um kit para identificar o evento de elite A5547-127 em amostras biológicas, o referido kit compreendendo os iniciadores de PCR com a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID NO: 13 e SEQ ID NO: 15 para uso no protocolo de identificação de PCR aqui descrito.

15 A invenção também se refere a um kit para identificar o evento de elite A5547-127 em amostras biológicas, cujo kit compreende uma sonda específica com uma seqüência a qual corresponde (ou é complementar a) uma seqüência com entre 80% e 100% de identidade de seqüência com uma região específica do A5547-127. Preferivelmente a seqüência da sonda corresponde a uma região específica compreendendo parte da região flanqueadora 5' ou 3' do A5547-127. Mais preferivelmente a sonda específica
20 tem (ou é complementar a) uma seqüência com entre 80% e 100% de identidade de seqüência com a seqüência entre o nucleotídeo 360 e 460 da SEQ ID NO: 1 ou a seqüência entre o nucleotídeo 460 e 560 da SEQ ID NO: 2.

25 Os métodos e kits englobados pela presente invenção podem ser usados para diferentes propósitos tais como, porém não limitados, aos seguintes: para identificar a presença ou ausência de A5547-127 em plantas, material vegetal ou em produtos tais como, mas não limitados, a produtos alimentícios ou de ração (frescos ou processados) compreendendo ou derivados de material vegetal; adicionalmente ou alternativamente, os métodos e kits da presente invenção podem ser usados para identificar material
30 de planta transgênica para propósitos de segregação entre material transgênico e não-transgênico; adicionalmente ou alternativamente, os métodos e kits da presente invenção podem ser usados para determinar a qualidade

(isto é, a porcentagem de material puro) de material vegetal compreendendo A5547-127.

5 A invenção ainda refere-se às regiões flanqueadoras 5' e/ou 3' de A5547-127, assim como aos iniciadores e sondas específicos desenvolvidos das seqüências flanqueadoras 5' e/ou 3' do A5547-127.

A invenção também se refere a plantas de soja, suas partes, células, sementes e plantas da progênie, compreendendo o evento de elite A5547-127. Tais plantas, suas partes, células, sementes e plantas da progênie podem ser identificados usando os métodos conforme aqui descritos.

10 Descrição Detalhada

A incorporação de uma molécula de DNA recombinante no genoma da planta resulta tipicamente da transformação de uma célula ou tecido (ou de outra manipulação genética). O sítio particular de incorporação é ou devido à integração "aleatória" ou está em um local predeterminado (se
15 um processo de integração alvejada for usado).

O DNA introduzido no genoma da planta como um resultado da transformação de uma célula ou tecido vegetal com um DNA recombinante ou "DNA transformante", e originado de tal DNA transformante, é de agora em diante referido como "DNA estrangeiro" compreendendo um ou mais
20 "transgenes". "DNA vegetal" no contexto da presente invenção, irá se referir ao DNA originado da planta a qual é transformada. DNA vegetal será usualmente encontrado no mesmo local genético na correspondente planta de tipo selvagem. O DNA estrangeiro pode ser caracterizado pelo local e pela configuração no sítio de incorporação da molécula de DNA recombinante no
25 genoma vegetal. O sítio no genoma vegetal onde um DNA recombinante foi inserido é também referido como o "sítio de inserção" ou "sítio alvo". A inserção do DNA recombinante no genoma da planta pode ser associada a uma anulação do DNA vegetal, referida como a "anulação do sítio alvo". Uma "região flanqueadora" ou "seqüência flanqueadora", conforme aqui utilizada,
30 refere-se a uma seqüência de pelo menos 20 bp, preferivelmente pelo menos 50 bp, e até 5000 bp do genoma da planta, o qual está localizado ou imediatamente à montante de um contíguo com ou imediatamente à jusante

de um contíguo com o DNA estrangeiro. Os procedimentos de transformação levando à integração aleatória do DNA estrangeiro irão resultar em transformantes com diferentes regiões flangeadoras, as quais são características e únicas para cada transformante. Quando o DNA recombinante é introduzido em uma planta através de cruzamento tradicional, seu sítio de inserção no genoma da planta, ou suas regiões flangeadoras, não serão geralmente alteradas. Uma "região de inserção", conforme aqui utilizada, refere-se à região correspondente à região de pelo menos 40 bp, preferivelmente pelo menos 100 bp, e até 10000 bp, englobadas pela seqüência a qual compreende a região flangeadora à montante e/ou à jusante de um DNA estrangeiro no genoma da planta. Levando em consideração diferenças mínimas devido às mutações em uma espécie, uma região de inserção irá reter, no cruzamento em uma planta da mesma espécie, pelo menos 85%, preferivelmente 90%, mais preferivelmente 95% e mais preferivelmente 100% da identidade de seqüência com a seqüência compreendendo as regiões flangeadoras à montante e à jusante do DNA estrangeiro em uma planta originalmente obtida da transformação.

Um evento é definido como um local genético "artificial" que, como resultado de uma engenharia genética, carrega um transgene compreendendo pelo menos uma cópia de um gene de interesse. Os estados alélicos típicos de um evento são a presença ou ausência do DNA estrangeiro. Um evento é caracterizado fenotipicamente pela expressão do transgene. No nível genético, um evento é parte da composição genética de uma planta. A nível molecular, um evento pode ser caracterizado pelo mapa de restrição (por exemplo, conforme determinado por "Southern blotting"), pelas seqüências flangeadoras à montante e/ou à jusante do transgene, pelo local de marcadores moleculares e/ou pela configuração molecular do transgene. Geralmente a transformação de uma planta com um DNA transformante compreendendo pelo menos um gene de interesse leva a uma multidão de eventos, cada um dos quais é único.

Um evento de elite, conforme aqui usado, é um evento o qual é selecionado de um grupo de eventos, obtidos pela transformação com o

mesmo DNA transformante ou pelo cruzamento reverso com plantas obtidas por tal transformação, baseando-se na expressão e estabilidade do(s) transgene(s) e na sua compatibilidade com características agronômicas ótimas da planta que o compreende. Conseqüentemente, os critérios para a seleção do evento de elite são um ou mais, preferivelmente dois ou mais; vantajosamente todos os seguintes:

a) que a presença do DNA estrangeiro não compromete outras características desejadas da planta, tais como aquelas relacionadas com o desempenho agronômico ou com o valor comercial;

b) que o evento é caracterizado por uma configuração molecular bem definida a qual é estavelmente herdada e para a qual ferramentas apropriadas para controle de identidade podem ser desenvolvidas;

c) que o(s) gene(s) de interesse mostra(m) uma expressão fenotípica correta, apropriada e espacialmente e temporalmente estável, tanto na condição heterozigótica (ou hemizigótica) quanto homozigótica do evento, em um nível comercialmente aceitável em uma faixa de condições ambientais na qual as plantas carregando o evento são propensas a serem expostas em uso agronômico normal.

É preferido que o DNA estrangeiro esteja associado a uma posição no genoma da planta que permita a fácil introgressão nos motivos genéticos comerciais desejados.

O status de um evento como um evento de elite é confirmado pela introgressão do evento de elite em diferentes fundos genéticos relevantes e observando a complacência com um, dois ou todos os critérios, por exemplo, a), b) e c) acima.

Um "evento de elite", conseqüentemente, refere-se a um local genético compreendendo um DNA estrangeiro, o qual responde aos critérios acima descritos. Uma planta, material vegetal ou progênie, tal como sementes, pode compreender um ou mais eventos de elite em seu genoma.

As ferramentas desenvolvidas identificam um evento de elite da planta, o material vegetal compreendendo um evento de elite, ou produtos os quais compreendem material vegetal compreendendo o evento de elite

são baseados nas características genômicas específicas do evento de elite, tal como um mapa de restrição específico da região genômica compreendendo o DNA estrangeiro, marcadores moleculares ou a seqüência da(s) região(ões) flanqueadora(s) do DNA estrangeiro.

5 Uma vez que uma ou ambas as regiões flanqueadoras do DNA estrangeiro tenham sido seqüenciadas, iniciadores e sondas podem ser desenvolvidos, os quais reconhecem especificamente essa (essas) seqüência(s) no ácido nucléico (DNA ou RNA) de uma amostra através de uma técnica biológica molecular. Por exemplo, um método de PCR pode ser desenvolvido para identificar o evento de elite em amostras biológicas (tais como
10 amostras de plantas, material vegetal ou produtos compreendendo material vegetal). Tal PCR é baseado em pelo menos dois "iniciadores" específicos, um reconhecendo uma seqüência na região flanqueadora 5' ou 3' do evento de elite e o outro reconhecendo uma seqüência no DNA estrangeiro. Os iniciadores preferivelmente têm uma seqüência de entre 15 e 35 nucleotídeos,
15 os quais sob condições otimizadas de PCR, "reconhecem especificamente" uma seqüência na região flanqueadora 5' ou 3' do evento de elite e o DNA estrangeiro do evento de elite respectivamente, de forma que um fragmento específico ("fragmento de integração ou amplicon discriminante) seja amplificado a partir de uma amostra de ácido nucléico compreendendo o evento
20 de elite. Isso significa que somente o fragmento de integração alvejado, e nenhuma outra seqüência no genoma vegetal ou DNA estrangeiro, é amplificado sob condições de PCR otimizadas.

25 Iniciadores de PCR adequados para a invenção podem ser os seguintes:

- oligonucleotídeos variando em comprimento de 17 nt até cerca de 300 nt, compreendendo uma seqüência de nucleotídeos de pelo menos 17 nucleotídeos consecutivos, preferivelmente 20 nucleotídeos consecutivos selecionados da seqüência flanqueadora 5' (SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 1
30 até o nucleotídeo 311) na sua extremidade 3' (iniciadores reconhecendo seqüências flanqueadoras 5'); ou

- oligonucleotídeos variando em comprimento de 17 nt até cerca

de 300 nt, compreendendo uma seqüência de nucleotídeos de pelo menos 17 nucleotídeos consecutivos, preferivelmente 20 nucleotídeos consecutivos selecionados da seqüência flanqueadora 3' (complemento da SEQ ID NO: 2 do nucleotídeo 510 até o nucleotídeo 1880) na sua extremidade 3' (iniciadores reconhecendo seqüências flanqueadoras 3'); ou

5 - oligonucleotídeos variando em comprimento de 17 nt até cerca de 510 nt, compreendendo uma seqüência de nucleotídeos de pelo menos 17 nucleotídeos consecutivos, preferivelmente 20 nucleotídeos selecionados das seqüências de DNA inseridas (complemento da SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 312 até o nucleotídeo 810) na sua extremidade 3' (iniciadores reconhecendo DNA estrangeiro) ou

10 - oligonucleotídeos variando em comprimento de 17 nt até cerca de 300 nt, compreendendo uma seqüência de nucleotídeos de pelo menos 17 nucleotídeos consecutivos, preferivelmente 20 nucleotídeos selecionados das seqüências de DNA inseridas (SEQ ID NO: 2 do nucleotídeo 1 ao nucleotídeo 509).

Os iniciadores podem, é claro, ser mais longos do que os 17 nucleotídeos consecutivos, e podem ser, por exemplo, de 20, 21, 30, 35, 50, 75, 100, 150, 200 nt de comprimento ou ainda mais longos. Os iniciadores podem consistir completamente na seqüência de nucleotídeos selecionada das seqüências de nucleotídeo mencionadas ou das seqüências flanqueadoras e das seqüências de DNA estrangeiro. Entretanto, a seqüência de nucleotídeos dos iniciadores nas suas extremidades 5' (isto é, foram dos 17 nucleotídeos consecutivos localizados em 3') é menos crítica. Conseqüentemente, a seqüência 5' dos iniciadores pode consistir em uma seqüência de nucleotídeos selecionada das seqüências flanqueadoras ou de DNA estrangeiro, conforme apropriado, mas pode conter várias (por exemplo, 1, 2, 5, 10 maus emparelhamentos). A seqüência 5' dos iniciadores pode mesmo completamente consistir em uma seqüência de nucleotídeos não-relacionada com as seqüências flanqueadoras ou com o DNA estrangeiro, tais como, por exemplo, uma seqüência de nucleotídeos representando sítios de reconhecimento de enzimas de restrição. Tais seqüências não-relacionadas ou se-

qüências de DNA flanqueadoras com maus emparelhamentos não deve preferencialmente ser mais longas do que 100, mais preferivelmente não ser mais longas do que 50 ou mesmo 25 nucleotídeos.

Além disso, iniciadores adequados podem compreender ou consistir em uma seqüência de nucleotídeos nas suas extremidades 3', se estendendo na região de junção entre as seqüências derivadas de DNA vegetal e as seqüências de DNA estrangeiro (localizados nos nucleotídeos 311 - 312 na SEQ ID NO: 1 e nos nucleotídeos 509 - 510 na SEQ ID NO: 2), com a condição de que os 17 nucleotídeos consecutivos localizados em 3' mencionados não são derivados exclusivamente ou do DNA estrangeiro ou das seqüências derivadas de plantas na SEQ ID NO: 1 ou 2.

Conseqüentemente, iniciadores de PCR para a invenção também podem ser os seguintes:

- oligonucleotídeos variando em comprimento de 17 nt até cerca de 300 nt, compreendendo uma seqüência de nucleotídeos de pelo menos 17 nucleotídeos consecutivos, preferivelmente 20 nucleotídeos consecutivos selecionados da SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 1 até o nucleotídeo 325) nas suas extremidades 3'; ou

- oligonucleotídeos variando em comprimento de 17 nt até cerca de 300 nt, compreendendo uma seqüência de nucleotídeos de pelo menos 17 nucleotídeos consecutivos, preferivelmente 20 nucleotídeos consecutivos selecionados da SEQ ID NO: 2 do nucleotídeo 495 até o nucleotídeo 1880) na sua extremidade 3'; ou

- oligonucleotídeos variando em comprimento de 17 nt até cerca de 300 nt, compreendendo uma seqüência de nucleotídeos de pelo menos 17 nucleotídeos consecutivos, preferivelmente 20 nucleotídeos selecionados do complemento da SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 295 até o nucleotídeo 810) na sua extremidade 3' ou

- oligonucleotídeos variando em comprimento de 17 nt até cerca de 300 nt, compreendendo uma seqüência de nucleotídeos de pelo menos 17 nucleotídeos consecutivos, preferivelmente 20 nucleotídeos selecionados da SEQ ID NO: 2 do nucleotídeo 1 ao nucleotídeo 525).

Também é imediatamente claro para o artífice habilitado que pares de iniciadores de PCR propriamente selecionados não devem também compreender seqüências as quais sejam complementares umas às outras.

5 Para o propósito da invenção, o "complemento de uma seqüência de nucleotídeos representada na SEQ ID NO: X" é a seqüência de nucleotídeos a qual pode ser derivada da seqüência de nucleotídeo representada pela substituição dos nucleotídeos através de seus nucleotídeos complementares de acordo com as regras de Chargaff ($A \Leftrightarrow T$; $G \Leftrightarrow C$) e lendo a seqüência na direção 5' até 3', isto é, em direção oposta da seqüência de
10 nucleotídeos representada.

Exemplos dos iniciadores adequados são as seqüências de oligonucleotídeos da SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 (seqüência
15 flanqueadora 5' que reconhece iniciadores) SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 (DNA estrangeiro reconhecendo iniciadores para uso com a seqüência flanqueadora 5' que reconhece iniciadores) SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 (DNA estrangeiro reconhecendo iniciadores para uso com a seqüência
20 flanqueadora 3' que reconhece iniciadores) SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 ou SEQ ID NO: 17 (seqüência flanqueadora 3' que reconhece iniciadores).

Outros exemplos de iniciadores de oligonucleotídeos adequados compreendem nas suas extremidades 3' as seguintes seqüências ou consistem em tais seqüências:

- a. seqüência flanqueadora 5' que reconhece iniciadores:
- 25 - a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 45 até o nucleotídeo 64
 - a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 22 até o nucleotídeo 41
 - a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 47 até o nucleotídeo 64
 - 30 - a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 183 até o nucleotídeo 202
 - a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo

- 184 até o nucleotídeo 203
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 301 até o nucleotídeo 320
 - a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 303 até o nucleotídeo 322
 - a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 306 até o nucleotídeo 325
 - a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 36 até o nucleotídeo 55
- 10 - a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 182 até o nucleotídeo 202
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 183 até o nucleotídeo 203
 - a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 184 até o nucleotídeo 202
 - a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 185 até o nucleotídeo 203
 - a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 185 até o nucleotídeo 204
- 20 - a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 292 até o nucleotídeo 311
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 295 até o nucleotídeo 314
 - a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 307 até o nucleotídeo 325
- 25 - a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 8 até o nucleotídeo 27
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 10 até o nucleotídeo 29
- 30 - a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 11 até o nucleotídeo 30
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 13

- até o nucleotídeo 32
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 20
- até o nucleotídeo 41
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 35
- 5 até o nucleotídeo 54
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 37
- até o nucleotídeo 55
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 66
- 10 até o nucleotídeo 85
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 67
- até o nucleotídeo 86
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 68
- até o nucleotídeo 87
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo
- 15 181 até o nucleotídeo 202
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo
- 182 até o nucleotídeo 203
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo
- 184 até o nucleotídeo 204
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo
- 20 185 até o nucleotídeo 202
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo
- 186 até o nucleotídeo 204
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo
- 25 186 até o nucleotídeo 203
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo
- 248 até o nucleotídeo 267
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo
- 249 até o nucleotídeo 268
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo
- 30 290 até o nucleotídeo 309
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo

- 291 até o nucleotídeo 311
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 293 até o nucleotídeo 311
- 5 294 até o nucleotídeo 314
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 301 até o nucleotídeo 322
- 10 303 até o nucleotídeo 320
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 305 até o nucleotídeo 322
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 308 até o nucleotídeo 325
- 15 até o nucleotídeo 29
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 36 até o nucleotídeo 54
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 41 até o nucleotídeo 61
- 20 até o nucleotídeo 64
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 66 até o nucleotídeo 86
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 67 até o nucleotídeo 85
- 25 até o nucleotídeo 85
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 67 até o nucleotídeo 87
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 68 até o nucleotídeo 86
- 30 até o nucleotídeo 87
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 69 até o nucleotídeo 87
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo

- 180 até o nucleotídeo 197
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 183 até o nucleotídeo 204
 - a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 187 até o nucleotídeo 204
- 5 200 até o nucleotídeo 219
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 246 até o nucleotídeo 263
- 10 247 até o nucleotídeo 267
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 248 até o nucleotídeo 268
 - a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 249 até o nucleotídeo 267
- 15 250 até o nucleotídeo 268
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 290 até o nucleotídeo 311
- 20 291 até o nucleotídeo 308
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 291 até o nucleotídeo 309
 - a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 293 até o nucleotídeo 214
- 25 até o nucleotídeo 29
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 11 até o nucleotídeo 32
- 30 até o nucleotídeo 37
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 37 até o nucleotídeo 54
 - a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 40

- até o nucleotídeo 61
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 64
- até o nucleotídeo 85
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 65
- 5 até o nucleotídeo 86
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 66
- até o nucleotídeo 87
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 68
- até o nucleotídeo 85
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 69
- 10 até o nucleotídeo 86
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 197 até o nucleotídeo 218
 - a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 201 até o nucleotídeo 219
- 15
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 201 até o nucleotídeo 218
 - a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 234 até o nucleotídeo 253
- 20
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 244 até o nucleotídeo 263
 - a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 246 até o nucleotídeo 267
 - a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 247 até o nucleotídeo 268
- 25
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 250 até o nucleotídeo 267
 - a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 292 até o nucleotídeo 309
- 30
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 198 até o nucleotídeo 219
 - a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo

- 202 até o nucleotídeo 219
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 233 até o nucleotídeo 253
- 5 235 até o nucleotídeo 254
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 235 até o nucleotídeo 253
 - a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 243 até o nucleotídeo 263
- 10 232 até o nucleotídeo 253
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 234 até o nucleotídeo 254
 - a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 242 até o nucleotídeo 263
- 15 233 até o nucleotídeo 254
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 234 até o nucleotídeo 255
- 20 294 até o nucleotídeo 215
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 247 até o nucleotídeo 266
 - a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 248 até o nucleotídeo 266
- 25 249 até o nucleotídeo 266
- a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 249 até o nucleotídeo 266
- b. Seqüência de DNA estrangeiro reconhecendo iniciadores para uso com a seqüência flanqueadora 5' reconhecendo iniciadores:
- 30 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 781 até o nucleotídeo 800
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1

- do nucleotídeo 301 até o nucleotídeo 320
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1
- do nucleotídeo 303 até o nucleotídeo 322
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1
- 5 do nucleotídeo 442 até o nucleotídeo 461
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1
- do nucleotídeo 444 até o nucleotídeo 463
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1
- do nucleotídeo 778 até o nucleotídeo 797
- 10 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1
- do nucleotídeo 781 até o nucleotídeo 799
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1
- do nucleotídeo 788 até o nucleotídeo 807
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1
- 15 do nucleotídeo 318 até o nucleotídeo 337
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1
- do nucleotídeo 322 até o nucleotídeo 341
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1
- do nucleotídeo 325 até o nucleotídeo 344
- 20 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1
- do nucleotídeo 329 até o nucleotídeo 348
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1
- do nucleotídeo 353 até o nucleotídeo 372
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1
- 25 do nucleotídeo 376 até o nucleotídeo 395
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1
- do nucleotídeo 378 até o nucleotídeo 397
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1
- do nucleotídeo 384 até o nucleotídeo 403
- 30 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1
- do nucleotídeo 440 até o nucleotídeo 459
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1

- do nucleotídeo 442 até o nucleotídeo 460
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 444 até o nucleotídeo 462.
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1
- 5 do nucleotídeo 442 até o nucleotídeo 462
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 444 até o nucleotídeo 464
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 449 até o nucleotídeo 468
- 10 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 470 até o nucleotídeo 489
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 484 até o nucleotídeo 503
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1
- 15 do nucleotídeo 492 até o nucleotídeo 511
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 781 até o nucleotídeo 798
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 778 até o nucleotídeo 798
- 20 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 781 até o nucleotídeo 802
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 788 até o nucleotídeo 806
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1
- 25 do nucleotídeo 301 até o nucleotídeo 318
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 303 até o nucleotídeo 320
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 301 até o nucleotídeo 322
- 30 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 318 até o nucleotídeo 336
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1

- do nucleotídeo 318 até o nucleotídeo 338
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 320 até o nucleotídeo 339
- 5 do nucleotídeo 322 até o nucleotídeo 340
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 322 até o nucleotídeo 342
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 325 até o nucleotídeo 343
- 10 do nucleotídeo 329 até o nucleotídeo 347
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 346 até o nucleotídeo 365
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 348 até o nucleotídeo 367
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 353 até o nucleotídeo 371
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 378 até o nucleotídeo 396
- 20 do nucleotídeo 376 até o nucleotídeo 396
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 382 até o nucleotídeo 400
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 382 até o nucleotídeo 401
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 384 até o nucleotídeo 404
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 442 até o nucleotídeo 459
- 30 do nucleotídeo 440 até o nucleotídeo 460
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 440 até o nucleotídeo 460
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 440 até o nucleotídeo 460

- do nucleotídeo 444 até o nucleotídeo 461
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 442 até o nucleotídeo 463
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 444 até o nucleotídeo 465
- 5 do nucleotídeo 444 até o nucleotídeo 465
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 469 até o nucleotídeo 488
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 470 até o nucleotídeo 488
- 10 do nucleotídeo 484 até o nucleotídeo 504
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 490 até o nucleotídeo 509
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 491 até o nucleotídeo 510
- 15 do nucleotídeo 491 até o nucleotídeo 510
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 492 até o nucleotídeo 512
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 561 até o nucleotídeo 580
- 20 do nucleotídeo 563 até o nucleotídeo 582
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 565 até o nucleotídeo 584
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 568 até o nucleotídeo 587
- 25 do nucleotídeo 568 até o nucleotídeo 587
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 572 até o nucleotídeo 591
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 590 até o nucleotídeo 609
- 30 do nucleotídeo 640 até o nucleotídeo 659
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 640 até o nucleotídeo 659
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 640 até o nucleotídeo 659

- do nucleotídeo 695 até o nucleotídeo 713
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 782 até o nucleotídeo 799
- 5 do nucleotídeo 778 até o nucleotídeo 799
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 788 até o nucleotídeo 805
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 788 até o nucleotídeo 808
- 10 do nucleotídeo 318 até o nucleotídeo 335
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 315 até o nucleotídeo 336
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 320 até o nucleotídeo 338
- 15 do nucleotídeo 318 até o nucleotídeo 339
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 322 até o nucleotídeo 339
- 20 do nucleotídeo 320 até o nucleotídeo 340
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 325 até o nucleotídeo 342
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 322 até o nucleotídeo 343
- 25 do nucleotídeo 322 até o nucleotídeo 343
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 329 até o nucleotídeo 346
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 325 até o nucleotídeo 346
- 30 do nucleotídeo 329 até o nucleotídeo 349
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 329 até o nucleotídeo 349
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1

- do nucleotídeo 346 até o nucleotídeo 364
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 348 até o nucleotídeo 366
- 5 do nucleotídeo 346 até o nucleotídeo 366
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 348 até o nucleotídeo 368
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 353 até o nucleotídeo 370
- 10 do nucleotídeo 378 até o nucleotídeo 395
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 376 até o nucleotídeo 397
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 376 até o nucleotídeo 399
- 15 do nucleotídeo 384 até o nucleotídeo 401
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 384 até o nucleotídeo 405
- 20 do nucleotídeo 440 até o nucleotídeo 461
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 466 até o nucleotídeo 487
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 484 até o nucleotídeo 505
- 25 do nucleotídeo 490 até o nucleotídeo 508
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 492 até o nucleotídeo 509
- 30 do nucleotídeo 491 até o nucleotídeo 509
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1

- do nucleotídeo 490 até o nucleotídeo 510
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 491 até o nucleotídeo 511
- 5 do nucleotídeo 492 até o nucleotídeo 513
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 561 até o nucleotídeo 579
- 10 do nucleotídeo 561 até o nucleotídeo 581
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 563 até o nucleotídeo 581
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 568 até o nucleotídeo 586
- 15 do nucleotídeo 572 até o nucleotídeo 590
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 572 até o nucleotídeo 592
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 590 até o nucleotídeo 610
- 20 do nucleotídeo 596 até o nucleotídeo 613
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 596 até o nucleotídeo 614
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 640 até o nucleotídeo 657
- 25 do nucleotídeo 640 até o nucleotídeo 657
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 640 até o nucleotídeo 658
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 640 até o nucleotídeo 660
- 30 do nucleotídeo 695 até o nucleotídeo 712
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 695 até o nucleotídeo 712
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1

- do nucleotídeo 696 até o nucleotídeo 713
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 320 até o nucleotídeo 337
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 320 até o nucleotídeo 341
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 329 até o nucleotídeo 350
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 346 até o nucleotídeo 363
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 348 até o nucleotídeo 365
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 346 até o nucleotídeo 367
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 348 até o nucleotídeo 369
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 354 até o nucleotídeo 371
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 382 até o nucleotídeo 403
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 482 até o nucleotídeo 503
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 491 até o nucleotídeo 518
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 490 até o nucleotídeo 511
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 491 até o nucleotídeo 512
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 563 até o nucleotídeo 580
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 563 até o nucleotídeo 582
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1

- do nucleotídeo 565 até o nucleotídeo 582
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1
- do nucleotídeo 563 até o nucleotídeo 584
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1
- 5 do nucleotídeo 568 até o nucleotídeo 585
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1
- do nucleotídeo 562 até o nucleotídeo 589
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1
- do nucleotídeo 572 até o nucleotídeo 593
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1
- 10 do nucleotídeo 584 até o nucleotídeo 605
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1
- do nucleotídeo 590 até o nucleotídeo 607
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1
- 15 do nucleotídeo 590 até o nucleotídeo 611
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1
- do nucleotídeo 596 até o nucleotídeo 615
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1
- do nucleotídeo 599 até o nucleotídeo 618
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1
- 20 do nucleotídeo 540 até o nucleotídeo 661
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1
- do nucleotídeo 779 até o nucleotídeo 798
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1
- 25 do nucleotídeo 788 até o nucleotídeo 809
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1
- do nucleotídeo 568 até o nucleotídeo 589
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1
- do nucleotídeo 596 até o nucleotídeo 616
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1
- 30 do nucleotídeo 599 até o nucleotídeo 619
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1

- do nucleotídeo 745 até o nucleotídeo 762
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 779 até o nucleotídeo 797
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 779 até o nucleotídeo 799
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 786 até o nucleotídeo 805
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 596 até o nucleotídeo 617
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 599 até o nucleotídeo 620
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 779 até o nucleotídeo 796
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 779 até o nucleotídeo 800
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 786 até o nucleotídeo 804
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 314 até o nucleotídeo 335
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 786 até o nucleotídeo 803
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 786 até o nucleotídeo 806
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 1 do nucleotídeo 296 até o nucleotídeo 315
- c. seqüência de DNA estrangeiro reconhecendo iniciadores para uso com a seqüência flanqueadora 3' reconhecendo iniciadores:
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 1413 até o nucleotídeo 1432
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 721 até o nucleotídeo 740
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2

- do nucleotídeo 767 até o nucleotídeo 786
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2
- do nucleotídeo 1185 até o nucleotídeo 1204
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2
- 5 do nucleotídeo 1332 até o nucleotídeo 1351
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2
- do nucleotídeo 1413 até o nucleotídeo 1431
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2
- do nucleotídeo 1413 até o nucleotídeo 1433
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2
- 10 do nucleotídeo 503 até o nucleotídeo 522
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2
- do nucleotídeo 507 até o nucleotídeo 526
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2
- 15 do nucleotídeo 721 até o nucleotídeo 739
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2
- do nucleotídeo 722 até o nucleotídeo 741
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2
- do nucleotídeo 721 até o nucleotídeo 741
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2
- 20 do nucleotídeo 770 até o nucleotídeo 789
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2
- do nucleotídeo 775 até o nucleotídeo 794
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2
- 25 do nucleotídeo 1135 até o nucleotídeo 1154
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2
- do nucleotídeo 1185 até o nucleotídeo 1202
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2
- do nucleotídeo 1185 até o nucleotídeo 1205
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2
- 30 do nucleotídeo 1191 até o nucleotídeo 1210
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2

- do nucleotídeo 1332 até o nucleotídeo 1350
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 1332 até o nucleotídeo 1352
- 5 do nucleotídeo 1413 até o nucleotídeo 1430
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 506 até o nucleotídeo 525
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 507 até o nucleotídeo 525
- 10 do nucleotídeo 507 até o nucleotídeo 527
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 721 até o nucleotídeo 738
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 722 até o nucleotídeo 740
- 15 do nucleotídeo 721 até o nucleotídeo 742
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 775 até o nucleotídeo 793
- 20 do nucleotídeo 775 até o nucleotídeo 795
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 1135 até o nucleotídeo 1153
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 1135 até o nucleotídeo 1155
- 25 do nucleotídeo 1135 até o nucleotídeo 1155
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 1185 até o nucleotídeo 1206
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 1191 até o nucleotídeo 1209
- 30 do nucleotídeo 1191 até o nucleotídeo 1209
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 1316 até o nucleotídeo 1335
 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2

- do nucleotídeo 1325 até o nucleotídeo 1344
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2
- do nucleotídeo 1332 até o nucleotídeo 1353
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2
- 5 do nucleotídeo 1413 até o nucleotídeo 1434
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2
- do nucleotídeo 507 até o nucleotídeo 528
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2
- do nucleotídeo 722 até o nucleotídeo 739
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2
- 10 do nucleotídeo 725 até o nucleotídeo 742
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2
- do nucleotídeo 730 até o nucleotídeo 749
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2
- 15 do nucleotídeo 770 até o nucleotídeo 787
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2
- do nucleotídeo 770 até o nucleotídeo 791
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2
- do nucleotídeo 771 até o nucleotídeo 792
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2
- 20 do nucleotídeo 775 até o nucleotídeo 792
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2
- do nucleotídeo 775 até o nucleotídeo 796
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2
- 25 do nucleotídeo 1153 até o nucleotídeo 1134
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2
- do nucleotídeo 1135 até o nucleotídeo 1156
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2
- do nucleotídeo 1187 até o nucleotídeo 1206
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2
- 30 do nucleotídeo 1191 até o nucleotídeo 1208
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2

- do nucleotídeo 1191 até o nucleotídeo 1212
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2
- do nucleotídeo 1325 até o nucleotídeo 1343
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2
- 5 do nucleotídeo 1325 até o nucleotídeo 1345
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2
- do nucleotídeo 1367 até o nucleotídeo 1384
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2
- do nucleotídeo 1511 até o nucleotídeo 1528
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2
- 10 do nucleotídeo 506 até o nucleotídeo 527
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2
- do nucleotídeo 730 até o nucleotídeo 750
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2
- 15 do nucleotídeo 1187 até o nucleotídeo 1204
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2
- do nucleotídeo 1187 até o nucleotídeo 1205
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2
- do nucleotídeo 1249 até o nucleotídeo 1266
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2
- 20 do nucleotídeo 1325 até o nucleotídeo 1342
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2
- do nucleotídeo 1325 até o nucleotídeo 1346
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2
- 25 do nucleotídeo 730 até o nucleotídeo 751
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2
- do nucleotídeo 1187 até o nucleotídeo 1208
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2
- do nucleotídeo 1334 até o nucleotídeo 1353
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2
- 30 do nucleotídeo 1334 até o nucleotídeo 1352
- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2

do nucleotídeo 1334 até o nucleotídeo 1354

- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 1334 até o nucleotídeo 1351

5 do nucleotídeo 1334 até o nucleotídeo 1355

- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 754 até o nucleotídeo 771

- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 842 até o nucleotídeo 863

10 - o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 732 até o nucleotídeo 751

- o complemento da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 732 até o nucleotídeo 750

d. seqüência flanqueadora 3' que reconhece os iniciadores:

15 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 284 até o nucleotídeo 303

- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 285 até o nucleotídeo 305

20 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 289 até o nucleotídeo 308

- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 160 até o nucleotídeo 179

- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 162 até o nucleotídeo 181

25 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 283 até o nucleotídeo 303

- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 284 até o nucleotídeo 304

30 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 286 até o nucleotídeo 304

- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 287 até o nucleotídeo 306

- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 288 até o nucleotídeo 308
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 290 até o nucleotídeo 308
- 5 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 394 até o nucleotídeo 413
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 398 até o nucleotídeo 417
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 10 399 até o nucleotídeo 418
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 400 até o nucleotídeo 418
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 119 até o nucleotídeo 138
- 15 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 161 até o nucleotídeo 179
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 161 até o nucleotídeo 181
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 20 184 até o nucleotídeo 203
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 192 até o nucleotídeo 211
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 193 até o nucleotídeo 212
- 25 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 195 até o nucleotídeo 214
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 241 até o nucleotídeo 260
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 30 283 até o nucleotídeo 304
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 286 até o nucleotídeo 303

- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 286 até o nucleotídeo 306
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 287 até o nucleotídeo 304
- 5 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 287 até o nucleotídeo 308
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 288 até o nucleotídeo 306
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 10 366 até o nucleotídeo 385
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 393 até o nucleotídeo 412
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 395 até o nucleotídeo 413
- 15 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 398 até o nucleotídeo 418
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 399 até o nucleotídeo 417
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 20 400 até o nucleotídeo 417
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 401 até o nucleotídeo 418
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 430 até o nucleotídeo 449
- 25 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 81 até o nucleotídeo 100
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 90 até o nucleotídeo 109
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 30 159 até o nucleotídeo 179
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 160 até o nucleotídeo 181

- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 185 até o nucleotídeo 203
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 191 até o nucleotídeo 211
- 5 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 192 até o nucleotídeo 212
 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 193 até o nucleotídeo 211
 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 10 194 até o nucleotídeo 212
 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 194 até o nucleotídeo 214
 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 196 até o nucleotídeo 215
- 15 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 196 até o nucleotídeo 214
 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 219 até o nucleotídeo 238
 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 20 240 até o nucleotídeo 260
 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 242 até o nucleotídeo 261
 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 242 até o nucleotídeo 260
- 25 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 275 até o nucleotídeo 294
 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 285 até o nucleotídeo 306
 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 30 289 até o nucleotídeo 306
 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 315 até o nucleotídeo 334

- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 319 até o nucleotídeo 338
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 366 até o nucleotídeo 383
- 5 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 372 até o nucleotídeo 391
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 392 até o nucleotídeo 412
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 10 392 até o nucleotídeo 413
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 394 até o nucleotídeo 412
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 397 até o nucleotídeo 417
- 15 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 397 até o nucleotídeo 418
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 424 até o nucleotídeo 443
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 20 429 até o nucleotídeo 449
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 431 até o nucleotídeo 450
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 431 até o nucleotídeo 449
- 25 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 439 até o nucleotídeo 458
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 447 até o nucleotídeo 466
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 30 481 até o nucleotídeo 500
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 507 até o nucleotídeo 526

- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 79 até o nucleotídeo 96
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 80 até o nucleotídeo 100
- 5 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 82 até o nucleotídeo 100
 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 89 até o nucleotídeo 109
 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 10
- 10 91 até o nucleotídeo 109
 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 121 até o nucleotídeo 138
 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 184 até o nucleotídeo 202
- 15 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 186 até o nucleotídeo 203
 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 190 até o nucleotídeo 211
 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 20
- 20 191 até o nucleotídeo 212
 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 193 até o nucleotídeo 214
 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 194 até o nucleotídeo 211
- 25 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 195 até o nucleotídeo 215
 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 195 até o nucleotídeo 212
 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 30
- 30 218 até o nucleotídeo 238
 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 220 até o nucleotídeo 238

- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 221 até o nucleotídeo 238
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 239 até o nucleotídeo 260
- 5 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 241 até o nucleotídeo 261
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 277 até o nucleotídeo 294
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 282 até o nucleotídeo 303
- 10 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 314 até o nucleotídeo 334
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 316 até o nucleotídeo 334
- 15 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 318 até o nucleotídeo 338
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 320 até o nucleotídeo 338
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 371 até o nucleotídeo 391
- 20 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 391 até o nucleotídeo 412
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 395 até o nucleotídeo 412
- 25 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 396 até o nucleotídeo 417
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 423 até o nucleotídeo 443
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 430 até o nucleotídeo 450
- 30 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 432 até o nucleotídeo 449

- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 438 até o nucleotídeo 458
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 446 até o nucleotídeo 466
- 5 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 448 até o nucleotídeo 466
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 449 até o nucleotídeo 466
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 481 até o nucleotídeo 498
- 10 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 481 até o nucleotídeo 499
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 482 até o nucleotídeo 500
- 15 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 508 até o nucleotídeo 526
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 79 até o nucleotídeo 100
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 83 até o nucleotídeo 100
- 20 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 88 até o nucleotídeo 109
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 92 até o nucleotídeo 109
- 25 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 185 até o nucleotídeo 202
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 194 até o nucleotídeo 215
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 217 até o nucleotídeo 238
- 30 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 240 até o nucleotídeo 261

- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 241 até o nucleotídeo 262
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 313 até o nucleotídeo 334
- 5 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 317 até o nucleotídeo 338
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 321 até o nucleotídeo 338
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 10 370 até o nucleotídeo 391
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 422 até o nucleotídeo 443
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 428 até o nucleotídeo 449
- 15 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 429 até o nucleotídeo 450
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 437 até o nucleotídeo 458
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 20 441 até o nucleotídeo 458
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 445 até o nucleotídeo 466
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 482 até o nucleotídeo 499
- 25 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 504 até o nucleotídeo 523
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 266 até o nucleotídeo 287
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 30 446 até o nucleotídeo 465
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 156 até o nucleotídeo 175

- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 448 até o nucleotídeo 465
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 155 até o nucleotídeo 175
- 5 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 157 até o nucleotídeo 175
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 154 até o nucleotídeo 175
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 10 312 até o nucleotídeo 329
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 191 até o nucleotídeo 210
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 190 até o nucleotídeo 210
- 15 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 192 até o nucleotídeo 210
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 157 até o nucleotídeo 176
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 20 189 até o nucleotídeo 210
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 193 até o nucleotídeo 210
- da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 156 até o nucleotídeo 176
- 25 - da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID Nº 2 do nucleotídeo 155 até o nucleotídeo 176

Conforme aqui utilizado, "a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID NO: Z da posição X até a posição Y" indica a seqüência de nucleotídeos incluindo ambos os pontos das extremidades dos nucleotídeos.

- 30 Preferivelmente, o fragmento de integração tem um comprimento de entre 50 e 500 nucleotídeos, mais preferivelmente de entre 100 e 350 nucleotídeos. Os iniciadores específicos podem ter uma seqüência a qual

seja entre 80 e 100% idêntica a uma seqüência na região flanqueadora 5' ou 3' do evento de elite e o DNA estrangeiro do evento de elite, respectivamente, com a condição de que os maus emparelhamentos ainda permitem a identificação específica do evento de elite com esses iniciadores sob condições de PCR otimizadas. A faixa de emparelhamentos ruins permitida, entretanto, pode ser facilmente determinada experimentalmente e são conhecidas por uma pessoa versada na técnica.

A tabela a seguir exemplifica os tamanhos dos amplicons de DNA esperados (ou fragmentos de integração) com pares selecionados de iniciadores de PCR.

Iniciador 1	Da posição	Iniciador 2	Até a posição	Comprimento do Amplicon
HCA150	8	KVM173	365	
HCA150	8	YTP228	402	
HCA150	8	YTP220	594	
HCA150	8	DPA024	736	
HCA150	8	YTP245	796	
DPA013	66	KVM173	365	
DPA013	66	YTP228	402	
DPA013	66	YTP220	594	
DPA013	66	DPA024	736	
DPA013	66	YTP245	796	
DPA228	292	KVM173	365	
DPA228	292	YTP228	402	110
DPA228	292	YTP220	594	302
DPA228	292	DPA024	736	444
DPA228	292	YTP245	796	504
YTP170	82	MDB687	527	445
YTP170	82	SMO022	724	642
YTP170	82	SMO024	1215	1133
YTP227	237	MDB687	527	290
YTP227	237	SMO022	724	487
YTP227	237	SMO024	1215	978

Iniciador 1	Da posição	Iniciador 2	Até a posição	Comprimento do Amplicon
MDB688	377	MDB687	527	150
MDB688	377	SMO022	724	347
MDB688	377	SMO024	1215	838
KVM175	476	MDB687	527	51
KVM175	476	SMO022	724	248
KVM175	476	SMO024	1215	739

A detecção dos fragmentos de integração pode ocorrer de diversas formas, por exemplo, através de estimativa de tamanho depois de análise de gel. Os fragmentos de integração também podem ser diretamente seqüenciados. Outros métodos específicos de seqüência para a detecção de fragmentos de DNA amplificados também são conhecidos na técnica.

Uma vez que a seqüência dos iniciadores e seus locais relativos no genoma são únicos para o evento de elite, a amplificação do fragmento de integração irá ocorrer somente em amostras biológicas compreendendo (o ácido nucléico do) evento de elite. Preferivelmente ao efetuar um PCR para identificar a presença do A5547-A12 em amostras desconhecidas, um controle é incluído de um grupo de iniciadores com os quais um fragmento em um "gene governante" da espécie vegetal do evento pode ser amplificado. Gentes governantes são genes que são expressos na maioria dos tipos celulares e os quais estão envolvidos com atividades metabólicas básicas comuns a todas as células. Preferivelmente, o fragmento amplificado do gene governante é um fragmento o qual é maior do que o fragmento de integração amplificado. Dependendo das amostras a serem analisadas, outros controles podem ser incluídos.

Protocolos de PCR padronizados são descritos na técnica, tal como em "manual de aplicações de PCR" (Roche Molecular Biochemicals, 2ª Edição, 1999). As condições ótimas para o PCR, incluindo a seqüência dos iniciadores específicos, é especificada em um "protocolo de identificação de PCR" para cada evento de elite. É, entretanto, entendido que uma variedade de parâmetros no protocolo de identificação de PCR pode necessitar ser ajustada a condições laboratoriais específicas, e pode ser levemente

modificada para obter resultados semelhantes. Por exemplo, o uso de um método diferente de preparação de DNA pode requerer o ajuste, por exemplo, da quantidade de iniciadores, polimerase e das condições de anelamento usadas. Similarmente, a seleção de outros iniciadores pode ditar outras condições ótimas para o protocolo de identificação de PCR. Esses ajustes irão, entretanto, ser aparentes para uma pessoa versada na técnica, e são ainda detalhados nos atuais manuais de aplicação de PCR, tais como aqueles citados acima.

Alternativamente, os iniciadores específicos podem ser usados para amplificar um fragmento de integração que possa ser usado como uma "sonda específica" para identificar A5547-127 em amostras biológicas. O contato do ácido nucléico de uma amostra biológica, com a sonda, sob condições as quais permitam a hibridização da sonda com o seu fragmento correspondente no ácido nucléico, resulta na formação de um híbrido de ácido nucléico/sonda. A formação desse híbrido pode ser detectada (por exemplo, marcação do ácido nucléico ou sonda), por meio do que a formação desse híbrido indica a presença de A5547-127. Tais métodos de identificação baseados na hibridização com uma sonda específica (seja em veículo de fase sólida ou em solução) foram descritos na técnica. A sonda específica é preferivelmente uma seqüência a qual, sob condições otimizadas, hibridiza especificamente a uma região na região flanqueadora 5' ou 3' do evento de elite e, preferivelmente, também compreendendo parte do DNA estrangeiro contíguo com isso (de agora em diante referida como "região específica). Preferivelmente, a sonda específica compreende uma seqüência de entre 50 e 500 bp, preferivelmente de 100 a 350 bp, a qual é pelo menos 80%, preferivelmente entre 80 e 85%, mais preferivelmente entre 85 e 90%, especialmente preferivelmente entre 90 e 95%, mais preferivelmente entre 95% e 100% idêntica (ou complementar) à seqüência de nucleotídeo de uma região específica. Preferivelmente, a sonda específica irá compreender uma seqüência de cerca de 15 até cerca de 100 nucleotídeos contíguos idênticos (ou complementares) a uma região específica do evento de elite.

Um "kit", conforme aqui utilizado, refere-se a um grupo de rea-

gentes para o propósito de efetuar o método da invenção, mais particularmente, a identificação do evento de elite A5547-127 em amostras biológicas. Mais particularmente, uma modalidade preferida do kit da invenção compreende pelo menos um ou dois iniciadores específicos, conforme descrito acima. Opcionalmente, o kit pode ainda compreender qualquer outro reagente aqui descrito no protocolo de identificação do PCR. Alternativamente, de acordo com outra modalidade dessa invenção, o kit pode compreender uma sonda específica, conforme descrito acima, a qual hibridiza especificamente com ácido nucléico de amostras biológicas para identificar a presença de A5547-127 ali. Opcionalmente, o kit pode ainda compreender qualquer outro reagente (tal como, porém não limitado ao tampão hibridizante, marcador) para identificação do A5547-127 em amostras biológicas, usando a sonda específica.

O kit da invenção pode ser usado, e seus componentes podem ser especificamente ajustados, para propósitos de controle de qualidade (por exemplo, pureza de lotes de sementes), detecção do evento de elite em material vegetal ou em material compreendendo ou derivado do material vegetal, tal como, porém não limitado, a produtos alimentícios ou de ração.

Conforme aqui utilizado, "identidade de seqüência", em consideração às seqüências de nucleotídeos (DNA ou RNA) refere-se à quantidade de posições com nucleotídeos idênticos divididos pela quantidade de nucleotídeos na mais curta das duas seqüências. O alinhamento das duas seqüências de nucleotídeos é efetuado pelo algoritmo de Wilbur e Lipmann (Wilbur e Lipmann, 1983, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 80:726) usando um tamanho de janela de 20 nucleotídeos, um comprimento de palavra de 4 nucleotídeos, e uma penalidade de intervalo de 4. A análise auxiliada por computador e a interpretação dos dados da seqüência, incluindo o alinhamento da seqüência conforme descrito acima, pode, por exemplo, ser convenientemente efetuada usando os programas do pacote de programas Intelligenetics™ (Intelligenetics Inc., CA) ou o pacote de programas de computador de análise de seqüência do Genetics Computer Group (GCG, centro de biotecnologia da Universidade de Wisconsin). As seqüências são indicadas como "essencial-

mente similares" quando tais seqüências têm uma identidade de seqüência de pelo menos cerca de 75%, particularmente pelo menos cerca de 80%, mais particularmente pelo menos cerca de 85%, muito particularmente cerca de 90%, especialmente cerca de 95%, mais especialmente cerca de 100%.

- 5 É claro que quando as seqüências de RNA são ditas como sendo essencialmente similares ou têm um certo grau de identidade de seqüência com seqüências de DNA, a timidina (T) na seqüência de DNA é considerada igual ao uracil (U) na seqüência de RNA.

O termo "iniciador", conforme aqui utilizado, engloba qualquer
10 ácido nucléico que seja capaz de iniciar a síntese de um ácido nucléico nascente em um processo dependente de molde, tal como PCR. Tipicamente, iniciadores são oligonucleotídeos de 10 a 30 nucleotídeos, mas seqüências mais longas podem ser empregadas. Iniciadores podem ser fornecidos na forma de duplo filamento, embora a forma de filamento único seja preferida.
15 As sondas podem ser usadas como iniciadores, mas são projetadas para se ligar ao DNA ou RNA alvo e não precisam ser usadas em um processo de amplificação.

O termo "reconhecendo", conforme aqui utilizado, quando se referindo a iniciadores específicos, refere-se ao fato de que os iniciadores
20 específicos hibridizam especialmente com uma seqüência de ácido nucléico no evento de elite sob as condições estabelecidas no método (tais como as condições do protocolo de identificação por PCR), por meio do qual a especificidade é determinada pela presença de controles positivos e negativos.

O termo "hibridizando", conforme utilizado aqui, quando se referindo a sondas específicas, refere-se ao fato de que a sonda se liga a uma
25 região específica na seqüência do ácido nucléico do evento de elite sob condições de estringência padronizadas. Condições de estringência padronizadas, conforme aqui utilizadas, se referem às condições para a hibridização aqui descrita ou às condições de hibridização convencionais conforme
30 descrito por Sambrook e outros, 1989 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edição, Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY), as quais, por exemplo, podem compreender as seguintes etapas: 1) imobilização dos

fragmentos de DNA genômico vegetal em um filtro, 2) pré-hibridização do filtro por 1 a 2 horas a 42°C em 50% de formamida, 5 x SSPE, 2 x reagente de Denhardt's e 0,1% de SDS, ou por 1 a 2 horas a 68°C em 6 x SSC, 2 x de reagente de Denhardt's e 0,1% de SDS, 3) adição da sonda de hibridização a qual foi marcada, 4) incubação por 16 a 24 horas, 5) lavagem do filtro por 20 min em temperatura ambiente em 1 x SSC, 0,1% de SDS, 6) lavagem do filtro três vezes por 20 min cada a 68°C em 0,2 x SSC, 0,1% SDS, e 7) exposição do filtro por 24 a 48 horas ao filme de raio-X a -70°C com uma tela intensificante.

10 Conforme aqui utilizado, uma amostra biológica é uma amostra de uma planta, material vegetal ou produtos compreendendo material vegetal. O termo "planta" é tencionado para englobar tecidos de planta de soja (*Glycine max*), em qualquer estágio de maturidade, assim como quaisquer células, tecidos ou órgãos tomados de ou derivados de qualquer tal planta, incluindo sem limitação, quaisquer sementes, folhas, caules, flores, raízes, 15 células individuais, gametas, culturas de células, culturas de tecidos ou protoplastos.

"Material vegetal", conforme aqui utilizado, refere-se ao material o qual é obtido ou derivado de uma planta. Produtos compreendendo material vegetal se referem a alimentos, rações ou outros produtos os quais são produzidos usando material vegetal ou que podem ser contaminados por material vegetal. É entendido que, no contexto da presente invenção, tais amostras biológicas são testadas para a presença de ácidos nucléicos específicos para A5547-127, implicando a presença de ácidos nucléicos nas amostras. Conseqüentemente, os métodos referidos aqui para identificar o evento de elite A5547-127 em amostras biológicas, relacionadas com a identificação em amostras biológicas de ácidos os quais compreendem o evento de elite. 20 25

Conforme aqui utilizado, "compreendendo" é para ser interpretado como especificando a presença das características, números inteiros, etapas, reagentes ou componentes conforme referidos a, mas não impedem a presença ou adição de uma ou mais características, números inteiros, eta- 30

pas ou componentes, ou seus grupos. Conseqüentemente, por exemplo, um ácido nucléico ou proteína compreendendo uma seqüência de nucleotídeos ou aminoácidos, pode compreender mais nucleotídeos ou aminoácidos do que os verdadeiramente citados, isto é, estar embutido em um ácido nucléico ou proteína maior. Um gene quimérico compreendendo uma seqüência de DNA a qual seja funcionalmente ou estruturalmente definida pode compreender seqüências de DNA adicionais, etc.

A presente invenção também refere-se ao desenvolvimento de um evento de elite A5547-127 em soja para as plantas compreendendo esse evento, a progênie obtida dessas plantas e para as células vegetais, ou material vegetal derivado desse evento. Plantas compreendendo evento de elite A5547-127 foram obtidas conforme descrito através do exemplo 1.

Plantas de soja ou material vegetal compreendendo A5547-127 podem ser identificadas de acordo com o protocolo de identificação por PCR descrito para A5547-127 no exemplo 2. Resumidamente, o DNA genômico de soja presente na amostra biológica é amplificado por PCR usando um iniciador o qual reconhece especificamente uma seqüência na seqüência flanqueadora 5' ou 3' de A5547-127, tal como o iniciador com a seqüência da SEQ ID NO: 15, e um iniciador o qual reconhece uma seqüência no DNA estrangeiro, tal como o iniciador com a seqüência da SEQ ID NO: 13. Iniciadores de DNA, os quais amplificam parte de uma seqüência de soja endógena, são usados como controle positivo para a amplificação por PCR. Se na amplificação por PCR, o material produzir um fragmento do tamanho esperado, o material contém material vegetal de uma planta de soja abrigando o evento de elite A5547-127.

Plantas abrigando A5547-127 são caracterizadas pela sua tolerância ao glufosinato, o qual no contexto da presente invenção, inclui aquelas plantas que são tolerantes ao herbicida Liberty[®]. Tolerância ao Liberty[™] pode ser testada de diferentes formas. O método de pintura da folha, conforme aqui descrito, é mais útil quando a discriminação entre plantas resistentes e sensíveis é necessária, sem matar as sensíveis. Alternativamente, a tolerância pode ser testada pela aplicação do spray Liberty[™]. Tratamentos

com spray devem ser feitos entre os estágios da folha V3 e V4 para melhores resultados. Plantas tolerantes são caracterizadas pelo fato de que a pulverização das plantas com pelo menos 200 gramas de ingrediente ativo/hectare (g.a.i./ha), preferivelmente 400 g.a.i./ha, e possivelmente até 5 1600 g.a.i./ha (4 x a taxa de campo normal), não mata as plantas. Uma aplicação espalhada deve ser aplicada em uma taxa de 0,79-0,96 pg (28 – 34 oz) de Liberty™. Ela é mais bem aplicada em um volume de 75,7 l (20 galões) de água por acre usando um bico do tipo leque plano enquanto sendo cuidadoso para não direcionar aplicações do spray diretamente no verticilo 10 das plantas para evitar que o tensoativo queime as plantas. O efeito herbicida deve aparecer em 48 horas e ser claramente visível dentro de 5 -7 dias.

As plantas abrigando A5547-127 podem ser ainda caracterizadas pela presença nas suas células de fosfinotricina acetil transferase conforme determinado por um ensaio PAT (De Block et al, 1987).

15 Plantas abrigando A5547-127 também são caracterizadas por ter características agronômicas que sejam comparáveis com variedades comercialmente disponíveis de soja nos EUA, na ausência de pressão de ervas daninhas, e uso de Liberty™ para o controle de ervas daninhas. Foi observado que a presença de um DNA estrangeiro na região de inserção do 20 genoma da planta de soja aqui descrito, confere características fenotípicas e moleculares particularmente interessantes às plantas compreendendo esse evento. Mais especificamente, a presença do DNA estrangeiro nessa região particular no genoma dessas plantas, resulta em plantas as quais apresentam uma expressão fenotípica estável do gene de interesse sem comprometer 25 significativamente qualquer aspecto do desempenho agronômico desejado das plantas.

Os seguintes exemplos descrevem a identificação do desenvolvimento de ferramentas para a identificação do evento de elite A5547-127 em amostras biológicas.

30 A não ser que seja estabelecido de outra forma, todas as técnicas de DNA recombinante são executadas de acordo com protocolos padronizados conforme descrito em Sambrook e outros (1989) *Molecular Cloning:*

A Laboratory Manual, Segunda edição, Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY e nos volumes 1 e 2 de Ausubel e outros (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols, EUA. Materiais e métodos padronizados para o trabalho molecular vegetal estão descritos em Plant Molecular Biology Labfax (1993) por R.D.D. Croy publicado pela BIOS Scientific Publications Ltd (UK) e Blackwell Scientific Publications, UK.

Na descrição e nos exemplos, é feita referência às seguintes seqüências:

- 10 SEQ ID NO: 1: seqüência de nucleotídeos compreendendo a região
flanqueadora 5' do A5547-127
- SEQ ID NO: 2: seqüência de nucleotídeos compreendendo a região
flanqueadora 3' do A5547-127
- SEQ ID NO: 3: iniciador HCA150
- SEQ ID NO: 4: iniciador DPA013
- 15 SEQ ID NO: 5: iniciador DPA228
- SEQ ID NO: 6: iniciador KVM173
- SEQ ID NO: 7: iniciador YTP228
- SEQ ID NO: 8: iniciador YTP220
- SEQ ID NO: 9: iniciador DPA024
- 20 SEQ ID NO: 10: iniciador YTP245
- SEQ ID NO: 11: iniciador YTP170
- SEQ ID NO: 12: iniciador YTP227
- SEQ ID NO: 13: iniciador MDB688
- SEQ ID NO: 14: iniciador KVM175
- 25 SEQ ID NO: 15: iniciador MDB687
- SEQ ID NO: 16: iniciador SMO022
- SEQ ID NO: 17: iniciador SMO024
- SEQ ID NO: 18: iniciador 1 para a amplificação do fragmento de controle
- SEQ ID NO: 19: iniciador 2 para a amplificação do fragmento de controle

30 Breve Descrição dos Desenhos

Os seguintes exemplos, não tencionados a limitar a invenção às modalidades específicas descritas, pode ser entendido juntamente com a

figura associada, incorporada aqui por referência, na qual:

Fig. 1: Representação esquemática da relação entre os iniciadores e as seqüências de nucleotídeos citadas. Barra preta: DNA estrangeiro; barra clara: DNA de origem vegetal; as figuras sob as barras representam posições de nucleotídeos; (c) refere-se ao complemento da seqüência de nucleotídeo indicada.

Fig. 2: Protocolo de identificação por PCR desenvolvido para A5547-127. A seqüência de carregamento do gel: Raia 1: amostra de DNA das plantas de soja compreendendo o evento transgênico A5547-127; raia 2: amostra de DNA de uma planta de soja transgênica não compreendendo evento de elite A5547-127; raia 3: amostras de DNA de controle das plantas de soja do tipo selvagem; raia 4: controle sem molde; raia 5: marcador de peso molecular.

Exemplos

1. Identificação das Regiões Flanqueadoras do Evento de Elite A5547-127

Soja resistente ao herbicida foi desenvolvida pela transformação de soja com um vetor compreendendo a seqüência codificadora de um gene *pat* que codifica a enzima fosfinotricinacetiltransferase, sob o controle do promotor 35S constitutivo do vírus mosaico da couve-flor.

O evento de elite A5547-127 foi selecionado baseando-se em um vasto procedimento de seleção baseando-se na boa expressão e estabilidade do gene de resistência ao herbicida e sua compatibilidade com características agronômicas ótimas.

A seqüência das regiões flanqueando o DNA estrangeiro no evento A5547-127 foi determinada usando o método de PCR interlaçado assimétrico térmico (TAIL-) descrito por Liu e outros (1995, Plant J. 8(3):457-463). Esse método utiliza três iniciadores aninhados em reações sucessivas juntamente com um iniciador degenerado arbitrário mais curto de forma que as eficiências de amplificação relativas dos produtos específicos e não-específicos possam ser termicamente controladas. Os iniciadores específicos foram selecionados para o anelamento para a borda do DNA estrangeiro e baseando-se nas suas condições de anelamento. Uma pequena quantidade (5 μ L) de produtos de PCR secundários e terciários, não-purificados, foi

analisada em um gel de agarose a 1%. O produto de PCR terciário foi usado para amplificação preparativa, purificado e seqüenciado em um seqüenciador automatizado usando o kit do ciclo DyeDeoxy Terminator.

1.1 Região Flanqueadora (5') da Direita

5 O fragmento identificado como compreendendo a região flanqueadora 5' obtida pelo método de TAIL-PCR foi completamente seqüenciado (SEQ ID NO: 1). A seqüência entre o nucleotídeo 1 e 311 corresponde ao DNA da planta, enquanto que a seqüência entre o nucleotídeo 312 e 810 corresponde ao DNA estrangeiro.

10 1.2 Região Flanqueadora (3') da Esquerda

O fragmento identificado como compreendendo a região flanqueadora 3' obtida pelo método de TAIL-PCR foi completamente seqüenciado (SEQ ID NO: 2). A seqüência entre o nucleotídeo 1 e 509 corresponde ao DNA estrangeiro, enquanto que a seqüência entre o nucleotídeo 510 e 1880
15 corresponde ao DNA vegetal.

2. Desenvolvimento de um Protocolo de Identificação da Reação em Cadeia da Polimerase

2.1 Iniciadores

Iniciadores específicos foram desenvolvidos os quais reconhecem seqüências no evento de elite. Mais particularmente, um iniciador foi desenvolvido o qual reconhece uma seqüência na região flanqueadora 5' do A5547-127. Um segundo iniciador foi, a seguir, selecionado na seqüência do DNA estrangeiro de forma que os iniciadores se estendam em uma seqüência de cerca de 150 nucleotídeos. Os seguintes iniciadores foram descobertos com proporcionando resultados particularmente claros e reproduzíveis
25 em uma reação em PCR no DNA A5547-127:

MDB687: 5'- TgT.ggT.TAT.ggC.ggT.gCC.ATC -3' (SEQ ID No.: 15)

(alvo: DNA vegetal)

MDB688: 5'-TgC.TAC.Agg.CAT.CgT.ggT.gTC-3' (SEQ ID No.: 13)

30 (alvo: DNA inserido)

Iniciadores alvejando uma seqüência endógena são preferivelmente incluídos no coquetel do PCR.

Esses iniciadores servem como um controle interno em amostras desconhecidas e no controle positivo de DNA. Um resultado positivo com o par de iniciadores endógenos demonstra que há um DNA amplo de qualidade adequada na preparação do DNA genômico para um produto de PCR ser gerado. Os iniciadores endógenos foram selecionados para reconhecer um gene governante em *Glycine max*:

SOY01: 5'-gTC.AgC.CAC.ACA.gTg.CCT.AT-3' (SEQ ID No.: 20)

(localizado no gene actina 1 da *Glycine max* (Acesso J01298))

SOY02: 5'-gTT.ACC.gTA.CAg.gTC.TTT.CC-3' (SEQ ID No.: 21)

(localizado no gene actina 1 da *Glycine max* (Acesso J01298))

2.2 Fragmentos Amplificados

Os fragmentos amplificados esperados na reação de PCR são:

Para o par de iniciadores SOY01-SOY02: 413 bp (controle endógeno)

Para o par de iniciadores MDB688-MDB687: 151 bp (evento de elite A5547-127)

2.3 DNA Molde

DNA molde foi preparado a partir de uma punção de folha de acordo com Edwards *e outros* (Nucleic Acid Research, 19, p1349, 1991). Ao usar DNA preparado com outros métodos, uma corrida de teste utilizando diferentes quantidades de molde devem ser feitas. Geralmente 50 ng de DNA molde genômico produzem os melhores resultados.

2.4 Controles Positivo e Negativo Designados

Para evitar falsos positivos ou negativos, foi determinado que os seguintes controles positivo e negativo devem ser incluídos em uma corrida de PCR:

- Controle de mistura mestre (controle de DNA negativo). Esse é um PCR no qual nenhum DNA é adicionado à reação. Quando o resultado esperado, nenhum produto de PCR, é observado, isso indica que o coquetel de PCR não foi contaminado com DNA alvo.

- Um controle positivo de DNA (amostra de DNA genômico conhecido por conter as seqüências transgênicas). A amplificação bem sucedida

da desse controle positivo demonstra que o PCR correu sob condições as quais permitem a amplificação das seqüências alvo.

- Um controle de DNA do tipo selvagem. Esse é um PCR no qual o DNA molde fornecido é DNA genômico preparado a partir de uma planta não-transgênica. Quando o resultado esperado, nenhuma amplificação de um produto de PCR transgênico, mas sim a amplificação do produto de PCR endógeno, é observada, isso indica que não há amplificação de fundo de transgene detectável em uma amostra de DNA genômico.

2.5 Condições de PCR

10 Resultados ótimos foram obtidos sob as seguintes condições:

- a mistura de PCR para reações de 25 μ L contém:

2,5 μ L de DNA molde

2,5 μ L de tampão de amplificação 10x (fornecido com Taq polimerase)

0,5 μ L de dNTP's 10 mM

15 0,5 μ L de MDB688 (10 pmols/ μ L)

0,5 μ L de MDB687 (10 pmols/ μ L)

0,25 μ L de SOY01 (10 pmols/ μ L)

0,25 μ L de SOY02 (10 pmols/ μ L)

0,1 μ L de Taq DNA polimerase (5 unidades/ μ L)

20 Água até 25 mL

- o perfil termociclizador a ser seguido para resultados ótimos é

o seguinte:

4 min a 95°C

Seguido por: 1 min a 95°C

25 1 min a 57°C

2 min a 72°C

Por 5 ciclos

Seguido por: 30 seg a 92°C

30 seg a 57°C

30 1 min a 72°C

Por 25 ciclos

Seguido por: 5 minutos a 72°C

2.6 Análise de Gel de Agarose

Para visualizar otimamente os resultados do PCR foi determinado que entre 10 e 20 μ L das amostras de PCR devem ser aplicadas em um gel de agarose 1,5% (tampão tris-borato) com um marcador de peso molecular apropriado (por exemplo, série de 100 bp PHARMACIA).

2.7 Validação dos Resultados

Foi determinado que dados das amostras de DNA vegetal transgênico em uma única corrida de PCR e um único coquetel de PCR não devem ser aceitas, a não ser que 1) o controle positivo de DNA apresente os produtos de PCR esperados (fragmentos transgênicos e endógenos), 2) o controle negativo de DNA seja negativo para a amplificação do PCR (sem fragmentos) e 3) o controle de DNA do tipo selvagem mostre o resultado esperado (amplificação de fragmento endógeno).

Ao seguir o Protocolo de Identificação de PCR para A5547-127, conforme descrito acima, as raias apresentando quantidades visíveis dos produtos de PCR transgênicos e endógenos dos tamanhos esperados, indicam que a planta correspondente a partir da qual o DNA molde genômico foi preparado, herdou o evento de elite A5547-127. As raias que não mostraram quantidades visíveis de qualquer um dos produtos de PCR transgênico e apresentando quantidades visíveis do produto de PCR endógeno, indicam que a planta correspondente a partir da qual o molde de DNA foi preparado não compreende o evento de elite. As raias não apresentando quantidades visíveis dos produtos de PCR endógeno e transgênico indicam que a qualidade e/ou quantidade do DNA genômico não permitem que um produto de PCR seja gerado. Essas plantas não podem ser pontuadas. A preparação de DNA genômico deve ser repetida e uma nova corrida de PCR, com os controles apropriados, tem que ser efetuada.

2.8 Uso de Protocolo de PCR Discriminativo para Identificar A5547-127.

Antes de tentar testar desconhecidos, uma corrida de teste, com todos os controles apropriados, tem que ser efetuada. O protocolo desenvolvido deve requerer a otimização para os componentes que podem diferir entre laboratórios (preparo do DNA molde, Taq DNA polimerase, qualidade dos

iniciadores, dNTP's, termociclizador, etc.).

A amplificação da seqüência endógena desempenha um papel chave no protocolo. Uma pessoa tem que conseguir condições de PCR e de termociclicação que amplifiquem quantidades equimolares tanto da seqüência endógena quanto da seqüência transgênica em um molde de DNA genômico transgênico conhecido. Sempre que o fragmento endógeno alvejado não for amplificado ou sempre as seqüências alvegadas não forem amplificadas com as mesmas intensidades de manchamento de brometo de etídio, conforme julgado pela eletroforese em gel de agarose, a otimização das condições de PCR podem ser requeridas.

Material de folha de *Glycine max* a partir de uma variedade de plantas, algumas das quais compreendendo A5547-127, foram testadas de acordo com o protocolo acima descrito. Amostras do evento de elite A5547-127 e do tipo selvagem de *Glyvine max* foram tomadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

Figura 2 ilustra o resultado obtido com o protocolo de identificação de PCR do evento de elite para A5547-127 em uma variedade de amostras de plantas de soja (raias de 1 a 14). Descobriu-se que as amostras na raia 1 contêm o evento de elite uma vez que a banda de 185 bp é detectada, enquanto que as amostras nas raias 2, 3 e 4 não compreendem A5547-127. A raia 2 compreende outro evento de elite da soja, a raia 3 representa um controle de *Glycine max* não-tansgênico; raia 4 representa a amostra de controle negativo (água), e a raia 5 representa o Marcador de Peso Molecular (100 bp).

3. Uso de um Fragmento de Integração Específico como uma Sonda para a Detecção de Material compreendendo A5547-127

Um fragmento de integração específico do A5547-127 é obtido por amplificação de PCR usando iniciadores específicos MDB687 (SEQ ID NO: 15) e MDB688 (SEQ ID NO: 13) ou por síntese química e é marcado. Esse fragmento de integração é usado como uma sonda específica para a detecção de A5547-127 em amostras biológicas. Ácido nucléico é extraído das amostras de acordo com procedimentos padronizados. Esse ácido nu-

cléico, então, entra em contato com a sonda específica sob condições hibridização as quais são otimizadas para permitir a formação de um híbrido. A formação do híbrido é, a seguir, detectada para indicar a presença do ácido nucléico A5547-127 na amostra. Opcionalmente, o ácido nucléico nas amostras é amplificado usando os iniciadores específicos antes do contato com a sonda específica. Alternativamente, o ácido nucléico é marcado antes do contato com a sonda específica ao invés do fragmento de integração. Opcionalmente, a sonda específica é ligada a um veículo sólido (tal como, porém não limitado, a um filtro, tira ou contas) antes do contato com as amostras.

LISTAGEM DE SEQÜÊNCIA

<110> Bayer BioScience N.V.
 Marc, De Beuckeleer

<120> Evento de elite A5547-127 e métodos e ktis para identificar tal even-
 5 to em amostras biológicas

<130> BCS 05-2009

<150> EP05075846.5

<151> 2005-04-11

<150> US60/670,414

10 <151> 2005-04-12

<160> 19

<170> Patente Versão 3.3

<210> 1

<211> 810

15 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Seqüência de nucleotídeos compreendendo a região flanco 5' de A5547-
 127

20 <220>

<221> descrição_mixta

<222> (1)..(311)

<223> 5' seqüência do flanco

<220>

25 <221> descrição_mixta

<222> (312)..(810)

<223> seqüência DNA inserida

<400> 1

gtcatcgtcg tcgcgctgga gttcttgtgg tgccgctggt cgcactggag tttgggtggt 60

30 gttgttcatg cttgcgctgc taatcccctt ttgtatgcca aaatcggggt tgggtcgggt 120

cggtcagcc caacacgacc taatttgtgt tacgaaaatt tcaacaaaa aaaaaagtta 180

tcttccgcca ttatcgccat tccgccacga tcattaaggc tatggcggcc gcaatggcgc 240

	cgccatatga aaccgcaat gccatcgcta tttggtggca tttttccaaa aaccgcaat	300
	gtcataccgt catcgttgtc agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc atggttatgg	360
	cagcactgca taattctctt actgtcatgc catccgtaag atgcttttct gtgactggtg	420
	agtactcaac caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc tcttgcccgg	480
5	cgccaatagc ggataatacc ggcacacata gcagaacttt aaaagtgctc atcattggaa	540
	aacgttcttc ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt	600
	aaccactcgc tgcacccaac tgatcttcag catcttttac tttcaccagc gtttctgggt	660
	gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa aaaaggaat aacgccaggg ttttcccagt	720
	cacgacgttg taaaacgacg gccagtgaat tcccatggag tcaaagattc aaatagagga	780
10	cctaacagaa ctgcccgtaa agactggcga	810
	<210> 2	
	<211> 1880	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> nucleotide sequence comprising the 3' flanking region of	
	A5547-127	
	<220>	
	<221> descrição_mixta	
20	<222> (1)..(509)	
	<223> seqüência DNA inseridas	
	<220>	
	<221> descrição_mixta	
	<222> (510)..(1880)	
25	<223> 3' flanking DNA sequences	
	<400> 2	
	cttttaaatt aaaaatgaag ttttaaatac atctaaagta tatatgagta aacttggctc	60
	gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct atttcgttca	120
	tccatagttg cctgactccc cgctcgttag ataactacga tacgggaggg cttaccatct	180
30	ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac ccacgctcac cggctccaga tttatcagca	240
	ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc	300
	atccagtcta ttaattggtg ccggaagct agagtaagta gttcgccagt taatagtttg	360

	cgcaacgctg ttgccattgc tacaggcatc gtggtgtcac gctcgtcgtt tggtaggct	420
	tcattcagct cgggttccca acgatcaagg cgagttacat gatccccat gttgtgcaaa	480
	aaagcggta gctccttcgg tctcctgatg gcaccgccat aaccacaatt taacaacttt	540
	ataaatgact tagtatatta gcaatttate ttgtcacatg cacatatattt ataactataa	600
5	taggagtttg agtttaaag atgtaatgaa ttttggattg catgttgttt tgtactatat	660
	tggtagcttt ttccaatgaa gtgttaaatt tgtatttttc atattcaggg tcacgtttga	720
	ccttctctag tcaactgcct aattaagccc tttctcttgc actcttgatg cttacttaac	780
	ctgggcatca ggcataatgta atgttatcaa tcaaactatc acgtttcatg cattattaa	840
	tcttcattga tgcccttgc tcgctcttgc cctttttcc aatttatgct tcaaatcttt	900
10	gacatgttcc atgtccttat tccttttctc tgtaactggt cattttcgtt atgaaccatg	960
	aagataaact actattgta aagtctcggg tcaaatttaa cttttctgct tttcccata	1020
	taattgaata agacttggtc gtggttggtc tcattgcata tacctttatt atatgcatag	1080
	aagtgatttt tttgcctaac ttgtacattt ttttatggca gtgatganga tgtagagagg	1140
	cttatcgagc ttgtgaaggg aatttcttgc aagattaatc taatctcatt caatccgac	1200
15	agtggatcat tcttcaaacc aaccaaata gaaaggatga ttgaattccg aaatacattg	1260
	gctggggcag gattgatagt attttaaga cttagtagag gtgatgatca attggcttcc	1320
	tgtggtcaat tgggtaagcc tggcaccatt caagctccat ttcttctgtg accagagcaa	1380
	ttccaaatgg caattggaag ttcaacttga ttctttgtgg aggttctgtg gcaaattgat	1440
	cttacagtta ttaacgaaga attatatagg acacttgtgg tgggggtagc tagggatgac	1500
20	ttcatactga caatgcaaga ccaagagcta aattaggggg atgtctgtct gttttcatat	1560
	tgtacttttc cattttacag ttaattgata tatttttttt tattaatgtg acggatccag	1620
	attacttact ggctaagaaa taagaaataa aatgattta aatatatttt tagtcaagt	1680
	ctgtattttt tagtttccca aattaaaatt tgcatttttt aatctctcat ttataaatg	1740
	cctttttaag ttcttcttag ctgatttttg gcaacttggg tgcacaatgt gcaactatcg	1800
25	taacaatatt tttcttgaaa tttaaagaga ctaaaatata tgtttacca taacactcat	1860
	gtagtagtaaa ccattatttg	1880
	<210> 3	
	<211> 21	
	<212> DNA	
30	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> iniciador HCA150	

<400> 3
 tcgtcgcgct ggagttcttg t 21
 <210> 4
 <211> 21
 5 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> iniciador DPA013
 <400> 4
 10 tcatgcttgc gctgctaate c 21
 <210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> iniciador DPA228
 <400> 5
 acccgcaatg tcataccgtc 20
 <210> 6
 20 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> iniciador KVM173
 25 <400> 6
 tgctgccata accatgagtg a 21
 <210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> iniciador YTP228

<400> 7
atcttacgga tggcatgaca g 21
<210> 8
<211> 27
5 <212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> iniciador YTP220
<400> 8
10 aactggatct caacagcggg aagatcc 27
<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial
15 <220>
<223> iniciador DPA024
<400> 9
gttttacaac gtcgtgactg g 21
<210> 10
20 <211> 21
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> PRIMER YTP245
25 <400> 10
ggcgagttct gttaggtcct c 21
<210> 11
<211> 21
<212> DNA
30 <213> Artificial
<220>
<223> iniciador YTP170

<400> 11
agtgaggcac ctatctcagc g 21
<210> 12
<211> 21
5 <212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> iniciador YTP227
<400> 12
10 agcaataaac cagccagccg g 21
<210> 13
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial
15 <220>
<223> iniciador MDB688
<400> 13
tgctacaggc atcgtggtgt c 21
<210> 14
20 <211> 21
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> iniciador KVM175
25 <400> 14
gcaaaaaagc ggtagctcc t 21
<210> 15
<211> 21
<212> DNA
30 <213> Artificial
<220>
<223> iniciador MDB687

<400> 15
 tgtggttatg gcggtgccat c 21
 <210> 16
 <211> 20
 5 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> iniciador SMO022
 <400> 16
 10 aaggtcaaac gtgaccctga 20
 <210> 17
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> iniciador SMO024
 <400> 17
 gaagaatgat ccaactgtgcg 20
 <210> 18
 20 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> iniciador 1 por amplificação do fragmento de controle endógeno
 25 <400> 18
 tgtggttatg gcggtgccat c 21
 <210> 19
 <211> 21
 <212> DNA
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> iniciador 2 por amplificação do fragmento de controle endógeno

<400> 19

tgctacaggc atcgtggtgt c

21

REIVINDICAÇÕES

1. Método para identificar o evento de elite A5547-127 em amostras biológicas, cujo método compreende a detecção de uma região específica A5547-127 com uma sonda ou iniciador específico, o qual especificamente reconhece a região flanqueadora 5' ou 3' do A5547-127.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, o referido método compreendendo a amplificação de um fragmento de DNA entre 100 e 500 bp de um ácido nucléico presente nas referidas amostras biológicas usando uma reação em cadeia da polimerase com pelo menos dois iniciadores, um dos referidos iniciadores reconhecendo a região flanqueadora 5' de A5547-127, a referida região flanqueadora 5' com a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 1 até o nucleotídeo 311, ou a região flanqueadora 3' do A5547-127, a referida região flanqueadora 3' com a seqüência de nucleotídeos do complemento da SEQ ID NO: 2 do nucleotídeo 510 até o nucleotídeo 1880, o outro iniciador dos referidos iniciadores reconhecendo uma seqüência no DNA estrangeiro com a seqüência de nucleotídeos do complemento da SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 312 até o nucleotídeo 810 ou a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID NO: 2 do nucleotídeo 510 até o nucleotídeo 1880.

3. Método, de acordo com a reivindicação 2, em que o referido iniciador reconhecendo a região flanqueadora 5' consiste em uma seqüência de nucleotídeos de 17 a 200 nucleotídeos consecutivos selecionados da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID NO: 1, do nucleotídeo 1 até o nucleotídeo 311, ou o referido iniciador reconhecendo a região flanqueadora 3' do A5547-127 consiste em uma seqüência de nucleotídeos de 17 a 200 nucleotídeos consecutivos selecionados da seqüência de nucleotídeos do complemento da SEQ ID NO: 2 do nucleotídeo 510 até o nucleotídeo 1880, e o referido iniciador reconhecendo uma seqüência no DNA estrangeiro consiste em 17 a 200 nucleotídeos consecutivos selecionados da seqüência de nucleotídeos do complemento da SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 312 até o nucleotídeo 810 ou a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID NO: 2 do nucleotídeo 510 até o nucleotídeo 1880.

4. Método, de acordo com a reivindicação 2, em que o referido iniciador reconhecendo a região flanqueadora 5' compreende na sua extremidade 3' extrema uma seqüência de nucleotídeos de pelo menos 17 nucleotídeos consecutivos selecionados da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 1 até o nucleotídeo 311, ou o referido iniciador reconhecendo a região flanqueadora 3' do A5547-127 compreende em sua extremidade 3' extrema uma seqüência de nucleotídeos de pelo menos 17 nucleotídeos consecutivos selecionados da seqüência de nucleotídeos do complemento da SEQ ID NO: 2 do nucleotídeo 510 até o nucleotídeo 1880, e o referido iniciador reconhecendo uma seqüência no DNA estrangeiro compreende na sua extremidade 3' pelo menos 17 nucleotídeos consecutivos selecionados da seqüência de nucleotídeos do complemento da SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 312 até o nucleotídeo 810 ou a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID NO: 2 do nucleotídeo 510 até o nucleotídeo 1880.

5. Método, de acordo com a reivindicação 4, em que os referidos iniciadores compreendem a seqüência da SEQ ID NO: 13 e da SEQ ID NO: 15, respectivamente.

6. Método, de acordo com a reivindicação 5, cujo método compreende a amplificação de um fragmento de cerca de 151 bp usando o protocolo de identificação A5547-127.

7. Kit para identificar o evento de elite A5547-127 em amostras biológicas, o referido kit compreendendo um iniciador reconhecendo a região flanqueadora 5' do A5547-127, a referida região flanqueadora 5' com a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 1 até o nucleotídeo 311, ou um iniciador reconhecendo a região flanqueadora 3' do A5547-127, a referida região flanqueadora 3' com a seqüência de nucleotídeos do complemento da SEQ ID NO: 2 do nucleotídeo 510 até o nucleotídeo 1880, e um iniciador reconhecendo uma seqüência no DNA estrangeiro, o referido DNA estrangeiro com a seqüência de nucleotídeos do complemento da SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 312 até o nucleotídeo 810 ou a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID NO: 2 do nucleotídeo 510 ao nucleotídeo 1880.

8. Kit, de acordo com a reivindicação 7, em que o referido inicia-

dor reconhecendo a região flanqueadora 5' consiste em uma seqüência de nucleotídeos de 17 a 200 nucleotídeos consecutivos selecionados da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 1 até o nucleotídeo 311 ou o referido iniciador reconhecendo a região flanqueadora 3' do A5547-127 consiste em uma seqüência de nucleotídeos de 17 a 200 nucleotídeos consecutivos selecionados da seqüência de nucleotídeos do complemento da SEQ ID NO: 2 do nucleotídeo 510 até o nucleotídeo 1880, e o referido iniciador reconhecendo uma seqüência no DNA estrangeiro consiste em 17 a 200 nucleotídeos consecutivos selecionados da seqüência de nucleotídeos do complemento da SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 312 até o nucleotídeo 810 ou a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID NO: 2 do nucleotídeo 510 até o nucleotídeo 1880.

9. Kit, de acordo com a reivindicação 7, em que o referido iniciador reconhecendo a região flanqueadora 5' compreende na sua extremidade 3' extrema uma seqüência de nucleotídeos de pelo menos 17 nucleotídeos consecutivos selecionados da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 1 até o nucleotídeo 311, ou o referido iniciador reconhecendo a região flanqueadora 3' de A5547-127 compreende na sua extremidade 3' extrema uma seqüência de nucleotídeos de pelo menos 17 nucleotídeos consecutivos selecionados da seqüência de nucleotídeos do complemento da SEQ ID NO: 2 do nucleotídeo 510 até o nucleotídeo 1880, e o referido iniciador reconhecendo uma seqüência no DNA estrangeiro compreende na sua extremidade 3' pelo menos 17 nucleotídeos consecutivos selecionados da seqüência de nucleotídeos do complemento da SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 312 até o nucleotídeo 810 ou a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID NO: 2 do nucleotídeo 510 até o nucleotídeo 1880.

10. Kit, de acordo com a reivindicação 7, compreendendo um iniciador consistindo da seqüência da SEQ ID NO: 13 e um iniciador consistindo da seqüência da SEQ ID NO: 15.

11. Iniciador para uso em um protocolo de identificação de PCR do A5547-127, com uma seqüência a qual, sob condições de PCR otimizadas, reconhece especificamente uma seqüência na região flanqueadora 5'

ou 3' do A5547-127, a referida região flanqueadora 5' com a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 1 até o nucleotídeo 311, e a referida região flanqueadora 3' com a seqüência de nucleotídeos do complemento da SEQ ID NO: 2 do nucleotídeo 510 até o nucleotídeo 1880.

5 12. Iniciador, de acordo com a reivindicação 11, em que o referido iniciador consiste em uma seqüência de nucleotídeos de 17 a 200 nucleotídeos consecutivos selecionados da seqüência de nucleotídeos da SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 1 até o nucleotídeo 311 ou uma seqüência de nucleotídeos de 17 a 200 nucleotídeos consecutivos selecionados da seqüência de nucleotídeos do complemento da SEQ ID NO: 2 do nucleotídeo 510 até o
10 nucleotídeo 1880.

 13. Iniciador, de acordo com a reivindicação 11, em que o referido iniciador compreende na sua extremidade 3' extrema uma seqüência de nucleotídeos de pelo menos 17 nucleotídeos consecutivos selecionados da
15 seqüência de nucleotídeos da SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 1 até o nucleotídeo 311 ou uma seqüência de nucleotídeos de pelo menos 17 nucleotídeos consecutivos selecionada da seqüência de nucleotídeos do complemento da SEQ ID NO: 2 do nucleotídeo 510 até o nucleotídeo 1880.

 14. Iniciador compreendendo na sua extremidade 3' extrema a
20 seqüência da SEQ ID NO: 13.

 15. Iniciador compreendendo na sua extremidade 3' extrema a seqüência da SEQ ID NO: 15.

 16. Método, de acordo com a reivindicação 1, cujo método compreende a hibridização de um ácido nucléico de amostras biológicas com
25 uma sonda específica para o A5547-127.

 17. Método, de acordo com a reivindicação 16, em que a seqüência da referida sonda específica tem pelo menos 80% de identidade de seqüência com uma seqüência compreendendo parte da seqüência flanqueadora 5' ou a seqüência flanqueadora 3' do A5547-127, e a seqüência do
30 DNA estrangeiro contíguo a essa.

 18. Método, de acordo com a reivindicação 17, em que a seqüência da referida sonda específica tem pelo menos 80% de identidade de

seqüência com a SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 260 ao 360 ou com a SEQ ID NO: 2 do nucleotídeo 460 ao 560, ou o complemento das referidas seqüências.

19. Kit para identificar o evento de elite A5547-127 em amostras biológicas, o referido kit compreendendo uma sonda específica, capaz de hibridizar especificamente a uma região específica da A5547-127.

20. Kit, de acordo com a reivindicação 19, em que a seqüência da referida sonda específica tem pelo menos 80% de identidade de seqüência com uma seqüência compreendendo parte da seqüência flanqueadora 5' ou a seqüência flanqueadora 3' do A5547-127 e a seqüência do DNA estrangeiro contíguo a essa.

21. Kit, de acordo com a reivindicação 20, em que a seqüência da referida sonda específica tem pelo menos 80% de identidade de seqüência com a SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 260 ao 360 ou com a SEQ ID NO: 2 do nucleotídeo 460 ao 560, ou o complemento das referidas seqüências.

22. Sonda específica para a identificação do evento de elite A5547-127 em amostras biológicas.

23. Sonda, de acordo com a reivindicação 22, a qual tem pelo menos 80% de identidade de seqüência com uma seqüência compreendendo parte da seqüência flanqueadora 5' ou da seqüência flanqueadora 3' do A5547-127 e a seqüência do DNA estrangeiro contíguo a ela, ou o seu complemento do mesmo.

24. Sonda, de acordo com a reivindicação 23, a qual tem pelo menos 80% de identidade de seqüência com a SEQ ID NO:1 do nucleotídeo 260 ao 360 ou com a SEQ ID NO: 2 do nucleotídeo 460 ao 560, ou o complemento das referidas seqüências.

25. Sonda específica para a identificação do evento de elite A5547-127 em amostras biológicas, a seqüência sendo essencialmente similar à SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 260 ao 360 ou à SEQ ID NO: 2 do nucleotídeo 460 ao 560, ou ao complemento das referidas seqüências.

26. Método para confirmar a pureza da semente, cujo método compreende a detecção de uma região específica A5547-127 com um inici-

ador ou sonda específica a qual reconhece especificamente a região flanqueadora 5' ou 3' do A5547-127, em amostras de sementes.

27. Método para testar sementes para a presença do A5547-127, cujo método compreende a detecção de uma região específica A5547-127 com um iniciador ou sonda específica, a qual reconhece especificamente a região flanqueadora 5' ou 3' do A5547-127 em amostras de lotes de sementes.

28. Planta de soja, ou células, partes, sementes ou sua progênie, compreendendo o evento de elite A5547-127 em seu genoma.

Fig. 1

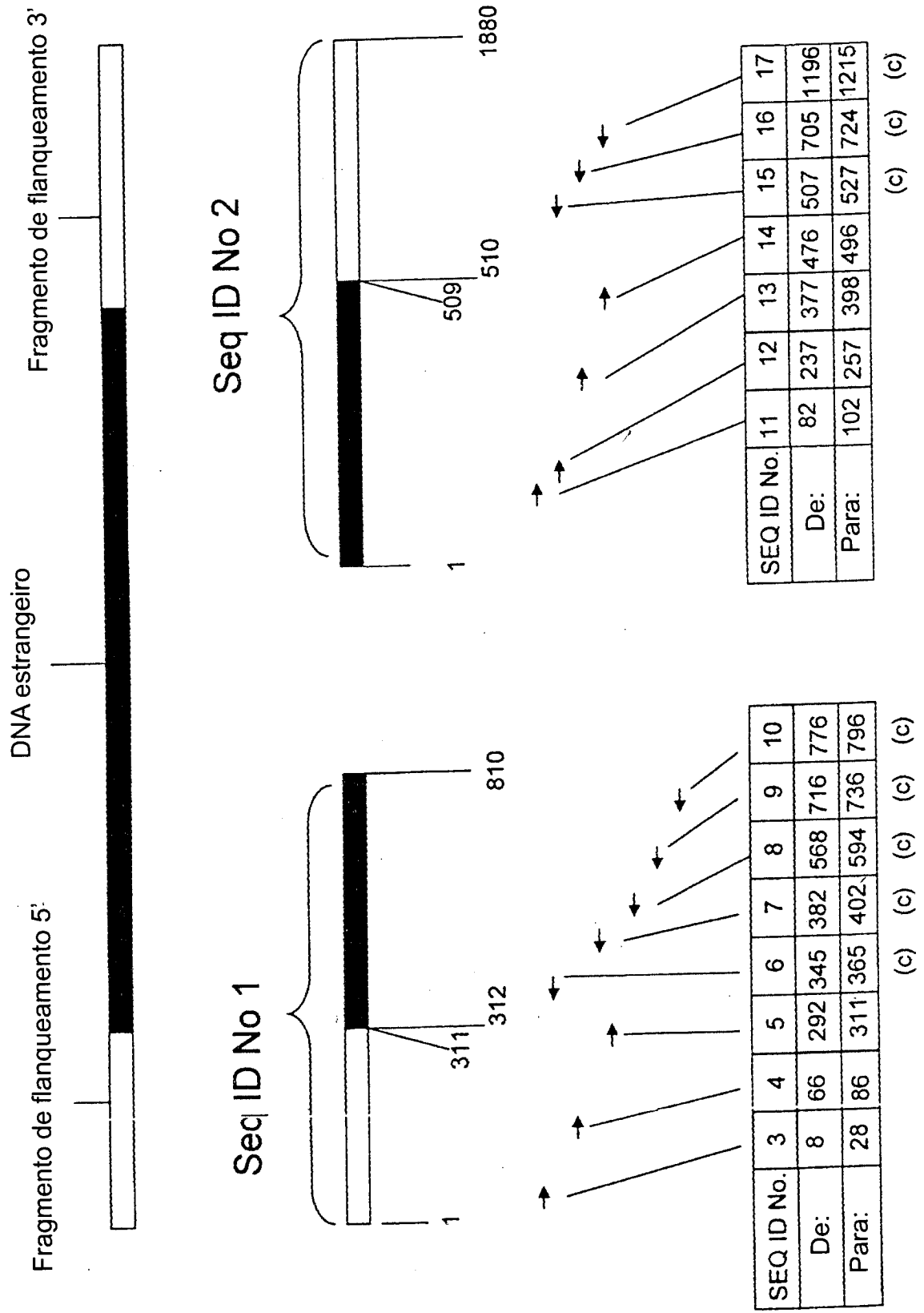
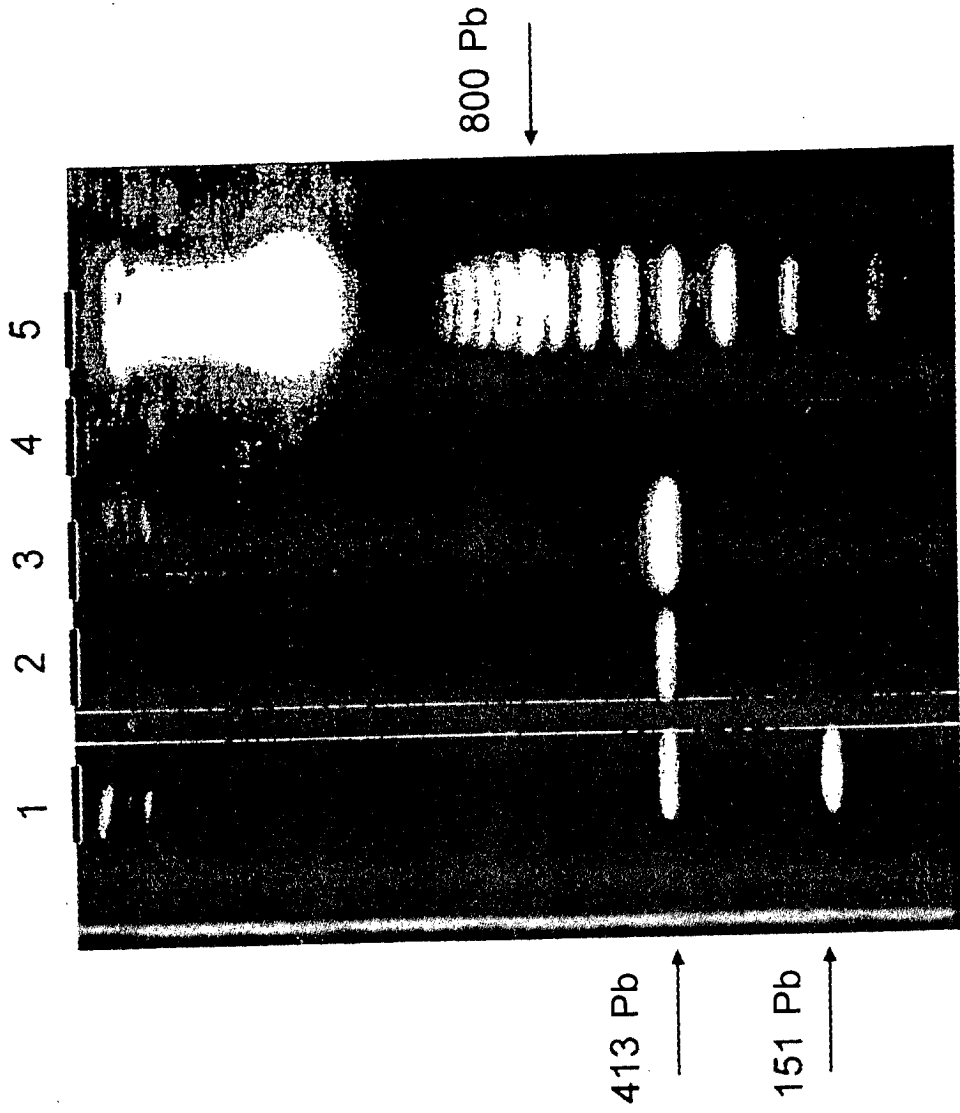


Fig. 2



RESUMO

Patente de Invenção: **"EVENTO DE ELITE A5547-127 E MÉTODOS E KITS PARA IDENTIFICAR TAL EVENTO EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS"**.

A presente invenção refere-se a ferramentas as quais permitem
5 a identificação rápida e inequívoca do evento de elite A5547-127 em amostras biológicas.