

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2006.03.07**

(30) Prioridade(s): **2005.03.16 US 662410 P**
2006.02.16 US 773847 P

(43) Data de publicação do pedido: **2007.12.26**

(45) Data e BPI da concessão: **2018.02.21**
088/2018

(73) Titular(es):
SYNGENTA PARTICIPATIONS AG
SCHWARZWALDALLEE 215 4058 BASEL CH

(72) Inventor(es):
BRIAN JOHNSON, C/O SYNGENTA BIOTECHNOLOGY, INC. US
TANYA MARKHAM C/O SYNGENTA BIOTECHNOLOGY, INC. US
VLADIMIR SAMOYLOV US
KEN DALLMIER US

(74) Mandatário:
MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA
AV. CASAL RIBEIRO, 50 - 3º ANDAR 1000-093 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **EVENTO DE MILHO 3272 E MÉTODOS PARA A SUA DETEÇÃO**

(57) Resumo:

É REVELADO UM NOVO EVENTO DE MILHO TRANSGÉNICO DESIGNADO 3272. A INVENÇÃO REFERE-SE A SEQUÊNCIAS DE ADN DOS CONSTRUCTOS RECOMBINANTES INSERIDOS NO GENOMA DO MILHO QUE ORIGINARAM O EVENTO 3272 E DE SEQUÊNCIAS GENÓMICAS QUE FLANQUEIAM OS SÍTIOS DE INSERÇÃO BEM COMO A ENSAIOS PARA DETETAR A PRESENÇA DO EVENTO 3272 COM BASE NESTAS NOVAS SEQUÊNCIAS. A INVENÇÃO REFERE-SE ADICIONALMENTE A SEMENTES DE PLANTAS DE MILHO QUE COMPREENDEM O GENÓTIPO DE 3272, UMA PLANTAS DE MILHO QUE COMPREENDEM O GENÓTIPO DE 3272 E A MÉTODOS PARA PRODUIR UMA PLANTA DE MILHO POR CRUZAMENTO DE UMA PLANTA DE MILHO QUE COMPREENDE O GENÓTIPO DE 3272 CONSIGO PRÓPRIA OU OUTRA VARIEDADE DE MILHO.

RESUMO

"EVENTO DE MILHO 3272 E MÉTODOS PARA A SUA DETEÇÃO"

É revelado um novo evento de milho transgênico designado 3272. A invenção refere-se a sequências de ADN dos constructos recombinantes inseridos no genoma do milho que originaram o evento 3272 e de sequências genómicas que flanqueiam os sítios de inserção bem como a ensaios para detetar a presença do evento 3272 com base nestas novas sequências. A invenção refere-se adicionalmente a sementes de plantas de milho que compreendem o genótipo de 3272, uma plantas de milho que compreendem o genótipo de 3272 e a métodos para produzir uma planta de milho por cruzamento de uma planta de milho que compreende o genótipo de 3272 consigo própria ou outra variedade de milho.

DESCRIÇÃO

"EVENTO DE MILHO 3272 E MÉTODOS PARA A SUA DETEÇÃO"

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se genericamente ao domínio da biologia molecular de plantas, transformação de plantas e melhoramento de plantas. Mais especificamente, a invenção refere-se a plantas de milho transgênicas com autoprocessamento que compreendem um novo genótipo transgênico e a métodos de detecção da presença do ADN da planta de milho numa amostra e suas composições.

ANTECEDENTES

Utilizam-se enzimas para processar uma variedade de produtos agrícolas como madeira, frutos e vegetais, amidos, sumos e semelhantes. Tipicamente, enzimas de processamento são produzidas e recuperadas à escala industrial a partir de várias fontes, como fermentação microbiana (α -amilase de *Bacillus*) ou isolamento a partir de plantas (β -galactosidase do café ou papaína de partes de plantas). Utilizam-se preparações enzimáticas em diferentes aplicações de processamento misturando a enzima e o substrato sob as condições apropriadas de humidade, temperatura, tempo e mistura mecânica de modo que a reação enzimática se dê de um modo comercialmente viável. Uma área na qual enzimas desempenham um papel importante é a área da moagem de milho.

Hoje em dia, o milho é moído para se obter amido de milho e outros coprodutos da moagem do milho, como ração de glúten de

milho, farelo de glúten de milho e óleo de milho. O amido obtido do processo é muitas vezes adicionalmente processado noutros produtos, como amidos derivatizados e açúcares, ou fermentado para preparar uma variedade de produtos, incluindo álcoois ou ácido láctico.

O processo de recuperação de amido a partir de grãos de milho é bem conhecido e envolve um processo de moagem a húmido. A moagem a húmido de milho envolve muitos passos demorados e dispendiosos, que incluem maceração do grão de milho, trituração do grão de milho e separação dos componentes do grão. Processos de moagem a seco de preparação de açúcares fermentáveis (e depois etanol, por exemplo) a partir de amido de milho facilitam um contacto eficiente de enzimas exógenas com amido. Estes processos requerem menos investimento de capital do que a moagem a húmido mas ainda são desejáveis vantagens económicas significativas, pois muitas vezes os coprodutos derivados destes processos não são tão valiosos quanto os derivados da moagem da húmido.

Assim, para a moagem a seco é necessário um método que melhore a eficiência do processo e/ou aumente o valor dos coprodutos. Para a moagem a húmido é necessário um método de processamento de amido que não requeira o equipamento necessário para passos prolongados de maceração, trituração, moagem e/ou separação dos componentes do grão. Por exemplo, é necessário modificar ou eliminar o passo maceração na moagem a húmido pois tal irá reduzir a quantidade de águas residuais que é necessário desperdiçar, desse modo poupando energia e tempo e aumentando a capacidade do moinho (os grãos irão passar menos tempo nas

cubas de maceração). Também é necessário eliminar ou melhorar o processo de separação do endosperma que contém amido do embrião.

A presente invenção refere-se a uma planta de milho (*Zea mays*) transgênica com autoprocessamento que incorporou no seu genoma um gene de α -amilase sintético (*amy797E*) que codifica uma α -amilase Amy797E termoestável capaz de processar amido em plantas. Por expressão e ativação da α -amilase, a planta ou parte de planta processa o substrato no qual atua a α -amilase. Este "autoprocessamento" origina uma melhoria significativa na preparação de amido disponível para fermentação. Assim, métodos que empregam tais plantas e partes de plantas podem eliminar a necessidade da moagem ou destruição física de outro modo da integridade de partes de plantas antes da recuperação de produtos derivados de amido. O evento de milho transgênico também incorporou no seu genoma um gene *manA*, daqui em diante denominado gene *pmi*, que codifica uma enzima fosfomanose isomerase (PMI), útil como marcador selecionável, que permite que a planta utilize manose como fonte de carbono.

A expressão de genes estranhos em plantas pode ser influenciada pela sua localização no genoma da planta, talvez devido à estrutura da cromatina ou à proximidade de elementos reguladores da transcrição perto do sítio de integração (Weising *et al.*, 1988, *Ann. Rev. Genet.* 22: 421-477). Por este motivo é muitas vezes necessário rastrear um grande número de eventos para identificar um evento caracterizado por expressão ótima de um gene de interesse introduzido. Por exemplo, foi observado em plantas e noutros organismos que pode haver

grandes variações nos níveis de expressão de um gene heterólogo introduzido no cromossoma do genoma de uma planta entre eventos individualmente selecionados. Também pode haver diferenças em padrões de expressão espacial ou temporal, por exemplo, diferenças na expressão relativa de um transgene em vários tecidos de plantas, que podem não corresponder aos padrões esperados de elementos reguladores da transcrição presentes no constructo do gene introduzido. Em consequência, é comum produzir centenas de eventos diferentes e rastrear tais eventos quanto a um único evento que tenha níveis e padrões de expressão de transgenes desejados para fins comerciais. Um evento que tenha níveis ou padrões desejados de expressão de transgenes é útil para introgressão do transgene noutros contextos genéticos por cruzamento exogâmico sexuado utilizando métodos de melhoramento convencionais. A progenitura de tais cruzamentos mantém as características de expressão de transgenes do transformante original. Utiliza-se esta estratégia para assegurar expressão genética fiável nalgumas variedades que estão bem adaptadas a condições de cultura locais.

Será vantajoso conseguir detetar a presença de um evento particular para determinar se a progenitura de um cruzamento sexuado contém um transgene de interesse. Além disso, um método para detetar um evento particular ajudará a cumprir regulamentações que requerem a aprovação pré-comercialização e etiquetagem de alimentos derivados de plantas de culturas recombinantes, por exemplo, ou para utilização na monitorização ambiental, monitorização de características em culturas no campo ou monitorização de produtos derivados de uma colheita,

bem como para utilização no cumprimento de partes sujeitas a termos regulamentares ou contratuais.

É possível detetar a presença de um transgene por qualquer método de deteção de ácidos nucleicos bem conhecido, incluindo mas não se limitando a amplificação térmica (reação em cadeia de polimerase (PCR)) utilizando iniciadores polinucleotídicos ou hibridação de ADN utilizando sondas de ácidos nucleicos. Tipicamente, por motivos de simplicidade e uniformidade de reagentes e metodologias para utilização na deteção de um constructo de ADN particular que foi utilizado para a transformação de diversas variedades de plantas, estes métodos de deteção centram-se geralmente em elementos genéticos frequentemente utilizados, como promotores, terminadores, genes marcadores e semelhantes, porque, para muitos constructos de ADN, a região da sequência codificadora é intermutável. Em resultado, tais métodos podem não ser úteis para distinguir constructos que diferem apenas na sequência codificadora. Além disso, tais métodos podem não ser úteis para distinguir diferentes eventos, particularmente os produzidos utilizando um constructo de ADN igual ou semelhante, a menos que a sequência do ADN flanqueador adjacente ao ADN heterólogo inserido seja conhecida.

O documento W003/018766 revela um evento de Milho.

RESUMO

O relatório descritivo é dirigido a um evento de milho transgénico, designado 3272, compreendendo um novo genótipo transgénico que compreende um gene de α -amilase *amy797E* e um

gene *pmi* que confere à planta a capacidade de hidrolisar amido sob altas temperaturas e a capacidade de utilizar manose como fonte de carbono, respetivamente, para o evento de milho 3272 e sua progenitura. Descrevem-se aqui composições e métodos para detetar a presença de ácidos nucleicos do evento 3272 com base na sequência de ADN das cassetes de expressão recombinantes inseridas no genoma do milho que originaram o evento 3272 e de sequências genómicas que flanqueiam o sítio de inserção. Também se descrevem plantas de milho transgénicas compreendendo o genótipo descrito aqui, sementes de plantas de milho transgénicas compreendendo o referido genótipo e métodos para produzir uma planta de milho transgénica compreendendo o genótipo por cruzamento de uma linhagem endogâmica de milho compreendendo o genótipo consigo própria ou com outra linhagem de milho de um genótipo diferente. As plantas de milho transgénicas podem ter essencialmente todas as características morfológicas e fisiológicas da planta de milho não transgénica isogénica correspondente para além das conferidas à planta de milho pelo novo genótipo. O evento 3272 pode ser adicionalmente caracterizado por análise dos níveis de expressão das proteínas Amy797E e PMI bem como por teste da atividade enzimática das plantas.

De acordo com um aspeto, a presente invenção proporciona uma molécula de ácido nucleico isolada que liga uma molécula de ADN heterólogo ao genoma da planta de milho no evento de milho 3272 que consiste em pelo menos uma sequência de nucleótidos de junção do evento de milho 3272 selecionada do grupo que consiste na SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2, em que a sequência de junção abrange a junção entre o ADN heterólogo que compreende

a cassete de expressão inserida no genoma do milho e ADN do genoma do milho que flanqueia o sítio de inserção. A molécula de ácido nucleico isolada de acordo com este aspeto pode compreender pelo menos 20 ou pelo menos 50 nucleótidos contíguos de uma sequência de ADN heterólogo inserida no genoma da planta de milho do evento de milho 3272 e pelo menos 20 ou pelo menos 50 nucleótidos contíguos de um ADN do genoma da planta de milho que flanqueia o ponto de inserção de uma sequência de ADN heterólogo inserida no genoma da planta de milho do evento de milho 3272.

De acordo com outro aspeto descreve-se aqui uma molécula de ácido nucleico isolada compreendendo uma sequência de nucleótidos que compreende pelo menos uma sequência de junção do evento 3272 selecionada do grupo que consiste na SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2 e seus complementos. Uma sequência de junção abrange a junção entre o ADN heterólogo que compreende as cassetes de expressão inseridas no genoma do milho e ADN do genoma do milho que flanqueia o sítio de inserção e é diagnóstico do evento 3272.

Noutro aspeto descreve-se um ácido nucleico isolado que liga uma molécula de ADN heterólogo ao genoma da planta de milho no evento de milho 3272 que compreende uma sequência com desde cerca de 11 até cerca de 20 nucleótidos contíguos selecionada do grupo que consiste na SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 e seus complementos.

Também se descreve uma molécula de ácido nucleico isolada compreendendo uma sequência de nucleótidos selecionada do grupo

que consiste na SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 e seus complementos.

De acordo com outro aspeto da invenção é proporcionado um amplificação que compreende uma molécula de ácido nucleico da invenção.

Descrevem-se iniciadores de sequências flanqueadoras para detetar o evento 3272. Tais iniciadores de sequências flanqueadoras compreendem uma sequência de nucleótidos isolada de pelo menos 10-15 nucleótidos contíguos dos nucleótidos 1-1409 da SEQ ID NO: 3 (arbitrariamente designada aqui sequência flanqueadora 5') ou os seus complementos. Num aspeto, iniciadores de sequências flanqueadoras são selecionados do grupo que consiste na SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 45 e SEQ ID NO: 48 e os seus complementos.

Noutro aspeto, os iniciadores de sequências flanqueadoras compreendem uma sequência de nucleótidos de pelo menos 10-15 nucleótidos contíguos dos nucleótidos 322-1879 da SEQ ID NO: 4 (arbitrariamente designada aqui sequência flanqueadora 3') ou os seus complementos. Num elemento deste aspeto, os iniciadores de sequências flanqueadoras são selecionados do grupo que consiste na SEQ ID NO: 36 e SEQ ID NO: 42 e os seus complementos.

De acordo com outro aspeto descrevem-se pares de iniciadores que são úteis para amplificação de ácidos nucleicos, por exemplo. Tais pares de iniciadores compreendem um primeiro iniciador que compreende uma sequência de nucleótidos de pelo

menos 10-15 nucleótidos contíguos de comprimento que é ou é complementar a uma das sequências flanqueadoras genómicas acima descritas (SEQ ID NO: 3 ou SEQ ID NO: 4) e um segundo iniciador que compreende uma sequência de nucleótidos de pelo menos 10-15 nucleótidos contíguos de ADN heterólogo inserido no genoma do evento 3272. O segundo iniciador compreende preferencialmente uma sequência de nucleótidos que é ou é complementar à sequência de inserto adjacente à sequência de ADN flanqueadora genómica da planta apresentada na SEQ ID NO: 3 desde a posição do nucleótido 1410 até 1600 e na SEQ ID NO: 4 desde a posição do nucleótido 1 até 321.

De acordo com outro aspeto descrevem-se métodos de deteção da presença de ADN correspondente ao evento 3272 numa amostra biológica. Tais métodos compreendem: (a) contactar a amostra que compreende ADN com um par de iniciadores que, quando utilizados numa reação de amplificação de ácido nucleico com ADN genómico do evento de milho 3272, produzem um amplicão que é diagnóstico do evento de milho 3272; (b) conduzir uma reação de amplificação de ácido nucleico, desse modo produzindo o amplicão, e (c) detetar o amplicão, em que o amplicão compreende uma sequência de nucleótidos selecionada do grupo que consiste na SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 e seus complementos.

De acordo com outro aspeto descrevem-se métodos de deteção da presença de um ADN correspondente ao evento 3272 numa biológica. Tais métodos compreendem: (a) contactar a amostra compreendendo ADN com uma sonda que hibrida, sob condições de estringência elevada, com ADN genómico do evento de milho 3272 e não hibrida, sob condições de estringência elevada, com ADN

de uma planta de milho de controlo; (b) sujeitar a amostra e sonda a condições de hibridação de estringência elevada, e (c) detetar a hibridação da sonda com o ADN.

Descreve-se um estojo para a deteção de ácidos nucleicos do evento 3272 numa amostra biológica. O estojo inclui pelo menos uma sequência de ADN compreendendo um comprimento suficiente de polinucleótidos que é ou é complementar à SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 ou SEQ ID NO: 4, em que as sequências de ADN são úteis como iniciadores ou sondas que hibridam com ADN isolado do evento 3272 e que, por amplificação ou hibridação com uma sequência de ácido nucleico numa amostra seguido de deteção do amplicão ou hibridação com a sequência-alvo, são diagnóstico da presença de sequências de ácidos nucleicos do evento 3272 na amostra. O estojo inclui adicionalmente outros materiais necessários para permitir a implementação de métodos de hibridação ou amplificação de ácidos nucleicos.

Outro aspeto descrito aqui consiste num método de deteção da proteína do evento de milho 3272 numa amostra biológica, que compreende: (a) extrair proteína de uma amostra de tecido do evento de milho 3272; (b) avaliar a proteína extraída utilizando um método imunológico que compreende anticorpo específico para a proteína inseticida ou de marcador seleccionável produzida pelo evento 3272, e (c) detetar a ligação do referido anticorpo à proteína inseticida ou de marcador seleccionável.

Outro aspeto descrito aqui consiste numa amostra biológica derivada de uma planta, tecido ou semente de milho com o evento 3272, em que a amostra compreende uma sequência de nucleótidos que é ou é complementar a uma sequência selecionada do grupo que consiste na SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2 e em que a sequência é detetável na amostra utilizando um método de amplificação de ácidos nucleicos ou hibridação de ácidos nucleicos. Num elemento deste aspeto, a amostra é selecionada do grupo que consiste em farinha de milho, farelo de milho, xarope de milho, óleo de milho, amido de milho e cereais produzidos, na totalidade ou em parte, para conterem produtos secundários de milho.

Também se descreve um extrato derivado de uma planta, tecido ou semente de milho com o evento 3272 compreendendo uma sequência de nucleótidos que é ou é complementar a uma sequência de nucleótidos selecionada do grupo que consiste na SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2. A sequência é detetável no extrato utilizando um método de amplificação de ácidos nucleicos ou hibridação de ácidos nucleicos. A amostra é selecionada do grupo que consiste em farinha de milho, farelo de milho, xarope de milho, óleo de milho, amido de milho e cereais produzidos, na totalidade ou em parte, para conterem produtos secundários de milho.

Descrevem-se plantas e sementes de milho que compreendem as moléculas de ácidos nucleicos da invenção.

Outro aspeto descrito aqui consiste num método para produzir uma planta de milho resistente a infestação pelo menos pela

lagarta das raízes do milho, que compreende: (a) cruzar de modo sexuado uma primeira planta de milho paterna com uma segunda planta de milho paterna, em que a referida primeira ou segunda planta de milho paterna compreende ADN do evento de milho 3272, desse modo produzindo uma pluralidade de plantas de progenitura de primeira geração; (b) selecionar uma planta de progenitura de primeira geração que é resistente a infestação pelo menos pela lagarta das raízes do milho; (c) autofecundar a planta de progenitura de primeira geração, desse modo produzindo uma pluralidade de plantas de progenitura de segunda geração; (d) selecionar, das plantas de progenitura de segunda geração, uma planta que é resistente a infestação pelo menos pela lagarta das raízes do milho; em que as plantas de progenitura de segunda geração compreendem uma sequência de nucleótidos selecionada do grupo que consiste na SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2.

Outro aspeto descrito consiste num método para produzir semente de milho que compreende cruzar uma primeira planta de milho paterna com uma segunda planta de milho paterna e recolher a semente de milho de primeira geração resultante, em que a primeira ou segunda planta de milho paterna é uma planta de milho endogâmica.

Outro aspeto descrito consiste num método para produzir sementes de milho híbridas, que compreende os passos seguintes: (a) plantar sementes de uma primeira linhagem endogâmica de milho e sementes de uma segunda linhagem endogâmica de milho com um genótipo diferente; (b) cultivar plantas de milho resultantes da referida plantação até ao florescimento; (c) emasculas flores de plantas de milho de uma das linhagens

endogâmicas de milho; (d) permitir a ocorrência da polinização da outra linhagem endogâmica, e (e) recolher a semente híbrida produzida desse modo.

Os aspectos anteriores e outros serão clarificados a partir da seguinte descrição pormenorizada.

DESCRIÇÃO DAS SEQUÊNCIAS NA LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

SEQ ID NO: 1 é a junção 5' genoma-inserto.

SEQ ID NO: 2 é a junção 3' inserto-genoma.

SEQ ID NO: 3 é a sequência 5' genoma + inserto.

SEQ ID NO: 4 é a sequência 3' inserto + genoma.

SEQ ID NO: 5 é genoma do milho flanqueador 5' ao inserto.

SEQ ID NO: 6 é genoma do milho flanqueador 3' ao inserto.

SEQ ID Nos: 7-9 são iniciadores e sonda para *amy797E*.

SEQ ID Nos: 10-12 são iniciadores e sonda para *pmi*.

SEQ ID NO: 13-15 são iniciadores e sonda para *ZmAdh1*.

SEQ ID Nos: 16-27 são iniciadores específicos para ADN do inserto.

SEQ ID NO: 28-31 são iniciadores de PCR TAIL degenerados.

SEQ ID NO: 32 é um iniciador GenomeWalker® externo.

SEQ ID NO: 33 é um iniciador adaptador encaixado.

SEQ ID NO: 34-35 são iniciadores de sequências flanqueadoras 5'.

SEQ ID NO: 36 é um iniciador de sequência flanqueadora 3'.

SEQ ID NO: 37 é a sequência do ADN heterólogo inserido em 3272.

SEQ ID NO: 38 é a sequência de sinal de retenção no ER.

SEQ ID NO: 39 é o iniciador *AmyF1n-5'*.

SEQ ID NO: 40 é o iniciador *AmyF1n-3'*.

SEQ ID NO: 41 é o iniciador *AmyF2-5'*.

SEQ ID NO: 42 é o iniciador AmyF2-3'.
SEQ ID NO: 43 é o amplicão F1.
SEQ ID NO: 44 é o amplicão F2.
SEQ ID NO: 45 é o iniciador direto Es3272-5'.
SEQ ID NO: 46 é o iniciador reverso Es3272-5'.
SEQ ID NO: 47 é a sonda Es3272-5'.
SEQ ID NO: 48 é o iniciador ESPCR0026.
SEQ ID NO: 49 é o iniciador ESPCR0004.
SEQ ID NO: 50-52 são iniciadores e sonda para ZmAdh1.

DESCRIÇÃO BREVE DAS FIGURAS

A Figura 1 é um mapa gráfico que ilustra a organização dos elementos que compreendem as sequências de ácidos nucleicos heterólogos inseridas no genoma do evento de milho 3272 e apresenta as posições relativas onde as sequências de ácidos nucleicos inseridas são ligadas a sequências de ADN genómico de milho que flanqueiam as extremidades das sequências de ADN heterólogo inseridas.

DEFINIÇÕES

Apresentam-se as seguintes definições e métodos para definir melhor a presente invenção e para orientar os peritos na técnica na prática da presente invenção. A menos que notado de outro modo, os termos usados aqui devem ser compreendidos de acordo com a utilização convencional pelos peritos na técnica relevante. Também podem encontrar-se definições de termos comuns em biologia molecular, por exemplo, em Rieger *et al.*,

"Glossary of Genetics: Classical and Molecular", 5ª edição, Springer-Verlag: Nova Iorque, 1994.

Como usado aqui, o termo "amplificado" significa a construção de múltiplas cópias de uma molécula de ácido nucleico ou múltiplas cópias complementares à molécula de ácido nucleico utilizando pelo menos uma das moléculas de ácidos nucleicos como modelo. Sistemas de amplificação incluem o sistema da reação em cadeia de polimerase (PCR), sistema da reação em cadeia de ligase (LCR), amplificação baseada em sequências de ácidos nucleicos (NASBA, Cangene, Mississauga, Ontário), sistemas de Q-Beta Replicase, sistema de amplificação baseada na transcrição (TAS) e amplificação por deslocamento de filamento (SDA). Ver, por exemplo, *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*, D. H. Persing et al., Editores, American Society for Microbiology, Washington, D.C. (1993). O produto de amplificação é denominado amplicão.

Como usado aqui, o termo "gene *amy797E*" refere-se a uma sequência codificadora que codifica a α -amilase 797GL3 termoestável (Lanahan et al., Publicação do Pedido de Patente US N° 20030135885, publicado em 17 de julho, 2003) fundida a uma sequência de sinal de γ -zeína de milho N-terminal com 19 aminoácidos e um sinal de retenção no retículo endoplasmático (ER rs) SEKDEL (SEQ ID NO: 38) C-terminal.

Uma "sequência codificadora" é uma sequência de ácido nucleico que é transcrita em ARN, tal como mARN, rARN, tARN, snARN, ARN sentido ou ARN antissentido. Preferencialmente, o ARN é depois traduzido num organismo para produzir uma proteína.

"Estoque de detecção", como usado aqui, refere-se a um estoque utilizado para detectar a presença ou ausência de ADN de plantas 3272 numa amostra compreendendo sondas e iniciadores de ácidos nucleicos da presente invenção, que hibridam especificamente, sob condições de estringência elevada, com uma sequência de ADN-alvo, e outros materiais necessários para permitir a implementação dos métodos de hibridação ou amplificação de ácidos nucleicos.

Como usado aqui, o termo "evento" transgênico refere-se a uma planta recombinante produzida por transformação e regeneração de uma única célula de planta com ADN heterólogo, por exemplo, uma cassete de expressão que inclui um gene de interesse. O termo "evento" refere-se ao transformante original e/ou progenitura do transformante que incluem o ADN heterólogo. O termo "evento" também se refere à progenitura produzida por um cruzamento exogâmico sexuado entre o transformante e outra linhagem de milho. Mesmo após retrocruzamento repetido com um progenitor recorrente, o ADN inserido e o ADN flanqueador do progenitor transformado estão presentes na progenitura do cruzamento na mesma localização cromossômica. Normalmente, a transformação de tecido de planta produz múltiplos eventos, em que cada um representa a inserção de um constructo de ADN numa localização diferente do genoma de uma célula de planta. Um evento particular é selecionado com base na expressão do transgene ou outras características desejáveis. Assim, "evento 3272" ou "3272", como usado aqui, significa o transformante 3272 original e/ou progenitura do transformante 3272 e/ou

plantas derivadas, de qualquer modo, do transformante 3272 original.

"Cassete de expressão", como usado aqui, significa uma molécula de ácido nucleico capaz de dirigir a expressão de uma sequência de nucleótidos particular numa célula hospedeira apropriada, compreendendo um promotor operavelmente ligado à sequência de nucleótidos de interesse que está operavelmente ligada a sinais de terminação. Também compreende tipicamente sequências requeridas para a tradução apropriada da sequência de nucleótidos. A cassete de expressão também pode compreender sequências não necessárias para a expressão direta de uma sequência de nucleótidos de interesse mas que estão presentes devido a sítios de restrição convenientes para remoção da cassete de um vetor de expressão. A cassete de expressão que compreende a sequência de nucleótidos de interesse pode ser quimérica, significando que pelo menos um dos seus componentes é heterólogo relativamente a pelo menos um dos seus outros componentes. A cassete de expressão também pode ser tal que ocorre naturalmente mas que foi obtida numa forma recombinante útil para expressão heteróloga. No entanto, tipicamente, a cassete de expressão é heteróloga relativamente ao hospedeiro, isto é, a sequência de ácido nucleico particular da cassete de expressão não ocorre naturalmente na célula hospedeira e teve de ter sido introduzida na célula hospedeira ou num antepassado da célula hospedeira por um processo de transformação conhecido na técnica. A expressão da sequência de nucleótidos na cassete de expressão pode estar sob o controlo de um promotor constitutivo ou de promotor indutível que só inicia a transcrição quando a célula hospedeira é exposta a algum

estímulo externo particular. No caso de um organismo multicelular, como uma planta, o promotor também pode ser específico para um tecido ou órgão ou fase do desenvolvimento particular. Uma cassete de expressão, ou seu fragmento, também pode ser referida como "sequência inserida" ou "sequência de inserção" quando transformada numa planta.

Um "gene" é uma região definida que está localizada dentro de um genoma e que, para além da sequência de ácido nucleico codificadora acima mencionada, compreende outras sequências de ácidos nucleicos, maioritariamente reguladoras, responsáveis pelo controlo da expressão, o mesmo é dizer a transcrição e tradução, da porção codificadora. Um gene também pode compreender outras sequências não traduzidas e sequências de terminação 5' e 3'. Elementos adicionais que podem estar presentes são, por exemplo, intrões.

"Gene de interesse" refere-se a qualquer gene que, quando transferido para uma planta, confere à planta uma característica desejada, tal como resistência a antibióticos, resistência a vírus, resistência a insetos, resistência a doença ou resistência a outras pragas, tolerância a herbicidas, valor nutricional melhorado, desempenho melhorado num processo industrial ou capacidade reprodutiva alterada. O "gene de interesse" também pode ser tal que é transferido para plantas para a produção na planta de enzimas ou metabolitos com valor comercial.

"Genótipo", como usado aqui, é o material genético herdado de plantas de milho paternas, sendo que nem todo é necessariamente

expresso nas plantas de milho descendentes. O genótipo de 3272 refere-se ao material genético heterólogo transformado no genoma de uma planta bem como ao material genético que flanqueia a sequência inserida.

Uma sequência de ácido nucleico "heteróloga" é uma sequência de ácido nucleico não naturalmente associada a uma célula hospedeira na qual é introduzida, incluindo múltiplas cópias de ocorrência não natural de uma sequência de ácido nucleico de ocorrência natural.

Uma sequência de ácido nucleico "homóloga" é uma sequência de ácido nucleico naturalmente associada a uma célula hospedeira na qual é introduzida.

"Operavelmente ligado" refere-se à associação de sequências de ácidos nucleicos num único fragmento de ácido nucleico de modo que a função de um afeta a função do outro. Por exemplo, um promotor é operavelmente ligado a uma sequência codificadora ou ARN funcional quando é capaz de afetar a expressão dessa sequência codificadora ou ARN funcional (isto é, a sequência codificadora ou ARN funcional fica sob o controle de transcrição do promotor). Sequências codificadoras na orientação sentido ou antissentido podem ser operavelmente ligadas a sequências reguladoras.

"Iniciadores", como usado aqui, são ácidos nucleicos isolados que são emparelhados com um filamento de ADN-alvo complementar por hibridação de ácidos nucleicos para formar um híbrido entre o iniciador e o filamento de ADN-alvo, depois estendidos ao

longo do filamento de ADN-alvo por uma polimerase, como ADN polimerase. Pares ou conjuntos de iniciadores podem ser utilizados para amplificação de uma molécula de ácido nucleico, por exemplo, pela reação em cadeia de polimerase (PCR) ou outros métodos convencionais de amplificação de ácidos nucleicos.

Uma "sonda" é um ácido nucleico isolado à qual é ligada uma etiqueta detetável ou molécula repórter convencional, como um isótopo radioativo, ligando, agente quimioluminescente ou enzima. Tal sonda é complementar a um filamento de um ácido nucleico-alvo, no caso do presente relatório descritivo, a um filamento de ADN genómico do evento de milho, 3272. O ADN genómico de 3272 pode provir de uma planta de milho ou de uma amostra que inclui ADN do evento. Sondas incluem não só ácidos desoxirribonucleicos ou ribonucleicos mas também poliamidas e outros materiais de sonda que se ligam especificamente a uma sequência de ADN-alvo e podem ser utilizados para detetar a presença dessa sequência de ADN-alvo.

Iniciadores e sondas têm geralmente entre 10 e 15 nucleótidos ou mais de comprimento, Iniciadores e sondas também podem ter pelo menos 20 nucleótidos ou mais de comprimento, ou pelo menos 25 nucleótidos ou mais, ou pelo menos 30 nucleótidos ou mais de comprimento. Tais iniciadores e sondas hibridam especificamente com uma sequência-alvo sob condições de hibridação de stringência elevada. Iniciadores e sondas podem ter complementaridade de sequência completa com a sequência-alvo, não obstante sondas que diferem da sequência-alvo e que

retêm a capacidade de hibridar com sequências-alvo possam ser concebidas por métodos convencionais.

"Condições estringentes" ou "condições de hibridação estringentes" inclui referência a condições sob as quais uma sonda irá hibridar com a sua sequência-alvo num grau detetavelmente maior do que com outras sequências. Condições estringentes dependem da sequência-alvo e irão diferir dependendo da estrutura do polinucleótido. Ao controlar a estringência das condições de hibridação e/ou lavagem podem identificar-se sequências-alvo que são 100% complementares à sonda (sondagem homóloga). Alternativamente, condições de estringência podem ser ajustadas para permitir algum emparelhamento defeituoso em sequências de modo que são detetados graus menores de similaridade (sondagem heteróloga). Sequências maiores hibridam especificamente a temperaturas mais elevadas. Um guia extenso da hibridação de ácidos nucleicos encontra-se em Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Parte I, Capítulo 2 "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays", Elsevier: Nova Iorque, e *Current Protocols in Molecular Biology*, Capítulo 2, Ausubel et al., Editores, Greene Publishing e Wiley-Interscience: Nova Iorque (1995), e também Sambrook et al. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (5ª Edição Cols Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NI).

Especificidade é tipicamente a função de lavagens pós-hibridação, em que os fatores críticos são a força iónica e

temperatura da solução de lavagem final. Em geral, condições de hibridação e lavagem de elevada estringência são selecionadas de modo a serem cerca de 5 °C menores do que o ponto de fusão térmico (T_f) para a sequência específica a uma força iônica e pH definidos. A T_f é a temperatura (sob força iônica e pH definidos) à qual 50% da sequência-alvo hibrida com uma sonda perfeitamente correspondente. Tipicamente, sob condições de estringência elevada, uma sonda irá hibridar com a sua subsequência-alvo mas não com outras sequências.

Um exemplo de condições de hibridação de estringência elevada para hibridação de ácidos nucleicos complementares que têm mais do que 100 resíduos complementares num filtro numa transferência Southern ou Northern consiste em formamida 50% com 1 mg de heparina a 42 °C, em que a hibridação é efetuada durante a noite. Um exemplo de condições de lavagem de estringência muito elevada consiste em NaCl 0,15 M a 72 °C durante cerca de 15 minutos. Um exemplo de condições de lavagem de estringência elevada consiste numa lavagem com 0,2x SSC a 65 °C durante 15 minutos (ver Sambrook, *infra*, quanto a uma descrição do tampão SSC).

Condições de hibridação exemplificativas para a presente invenção incluem hibridação em SDS 7%, NaPO₄ 0,25 M pH 7,2 a 67 °C durante a noite, seguido de duas lavagens em SDS 5%, NaPO₄ 0,20 M pH 7,2 a 65 °C durante 30 minutos cada lavagem e duas lavagens em SDS 1%, NaPO₄ 0,20 M pH 7,2 a 65 °C durante 30 minutos cada lavagem. Uma lavagem de estringência média exemplificativa para uma hélice dupla, por exemplo, com mais de 100 nucleótidos consiste em 1x SSC a 45 °C durante 15

minutos. Uma lavagem de baixa estringência exemplificativa para uma hélice dupla, por exemplo, com mais de 100 nucleótidos consiste em 4-6x SSC a 40 °C durante 15 minutos.

Para sondas com de cerca de 10 até 50 nucleótidos, condições de elevada estringência envolvem tipicamente concentrações de sal menores do que cerca de 1,0 M de ião Na, tipicamente uma concentração de cerca de 0,01 até 1,0 M de ião Na (ou outros sais) a pH 7,0 até 8,3 e a temperatura é tipicamente pelo menos cerca de 30 °C. Condições de estringência elevada também podem ser obtidas por adição de agentes desestabilizadores, tais como formamida. Em geral, uma razão sinal-ruído de 2x (ou maior) do que a observada para uma sonda não relacionada no ensaio de hibridação particular indica detecção de uma hibridação específica. Ácidos nucleicos que não hibridam uns com os outros sob condições de estringência elevada ainda são substancialmente idênticos se as proteínas que codificam forem substancialmente idênticas. Tal ocorre, por exemplo, quando é criada uma cópia de um ácido nucleico utilizando a degenerescência máxima de códons permitida pelo código genético.

Os seguintes são conjuntos exemplificativos de condições de hibridação/lavagem que podem ser utilizadas para hibridar sequências de nucleótidos que são substancialmente idênticas a sequências de nucleótidos de referência: uma sequência de nucleótidos de referência hibrida preferencialmente com a sequência de nucleótidos de referência em dodecilsulfato de sódio (SDS) 7%, NaPO₄ 0,5 M, EDTA 1 mM a 50 °C com lavagem em 2X SSC, SDS 0,1% a 50 °C, mais desejavelmente em dodecilsulfato

de sódio (SDS) 7%, NaPO₄ 0,5 M, EDTA 1 mM a 50 °C com lavagem em 1X SSC, SDS 0,1% a 50 °C, mais desejavelmente ainda em dodecilsulfato de sódio (SDS) 7%, NaPO₄ 0,5 M, EDTA 1 mM a 50 °C com lavagem em 0,5X SSC, SDS 0,1% a 50 °C, preferencialmente em dodecilsulfato de sódio (SDS) 7%, NaPO₄ 0,5 M, EDTA 1 mM a 50 °C com lavagem em 0,1X SSC, SDS 0,1% a 50 °C, mais preferencialmente em dodecilsulfato de sódio (SDS) 7%, NaPO₄ 0,5 M, EDTA 1 mM a 50 °C com lavagem em 0,1X SSC, SDS 0,1% a 65 °C. As sequências podem ser detetadas utilizando todas as condições acima. Para a finalidade de definir a invenção utilizam-se as condições de elevada estringência.

"Transformação" é um processo para introduzir ácido nucleico heterólogo numa célula ou organismo hospedeiro. Em particular, "transformação" significa a integração estável de uma molécula de ADN no genoma de um organismo de interesse.

"Transformado / transgênico / recombinante" refere-se a um organismo hospedeiro, como uma bactéria ou uma planta, no qual foi introduzida uma molécula de ácido nucleico heterólogo. A molécula de ácido nucleico pode ser integrada de modo estável no genoma do hospedeiro ou a molécula de ácido nucleico também pode estar presente como uma molécula extracromossômica. Tal molécula extracromossômica pode ser autorreplicadora. É entendido que células, tecidos ou plantas transformados abrangem não só o produto final de um processo transformação mas também a sua progenitura transgênica. Um hospedeiro "não transformado", "não transgênico" ou "não recombinante" refere-se a um organismo de tipo selvagem, por exemplo, uma bactéria ou planta, que não contém a molécula de ácido nucleico

heterólogo. Como usado aqui, "transgênico" refere-se a uma planta, célula de planta ou pluralidade de células de planta estruturadas ou não estruturadas que integraram, via técnicas bem conhecidas de manipulação genética e inserção de genes, uma sequência de ácido nucleico que representa um gene de interesse no genoma da planta e tipicamente num cromossoma de um núcleo celular, mitocôndria ou outros organelos que contêm cromossomas, num local diferente ou num número de cópias maior do que o normalmente presente na planta ou célula de planta nativa. Plantas transgênicas resultam da manipulação e inserção de tais sequências de ácidos nucleicos, em oposição a mutações de ocorrência natural, para produzir uma planta que não ocorre naturalmente ou uma planta com um genótipo de ocorrência não natural. Técnicas para a transformação de plantas e células de plantas são bem conhecidas na técnica e podem compreender, por exemplo, eletroporação, microinjeção, transformação mediada por *Agrobacterium* e transformação balística.

Usa-se aqui a nomenclatura de bases de ADN e aminoácidos apresentada em 37 C.F.R. § 1.822.

DESCRIÇÃO PORMENORIZADA

Esta invenção refere-se a uma linhagem de milho geneticamente aperfeiçoada que produz a enzima α -amilase, Amy797E, e uma enzima fosfomanose isomerase (PMI) que permite que a planta utilize manose como fonte de carbono. O relatório descritivo é particularmente dirigido a um evento de milho transgênico designado 3272 que compreende um novo genótipo, bem como a composições e métodos para detetar ácidos nucleicos deste evento numa amostra biológica. O relatório descritivo é

adicionalmente dirigido a plantas de milho que compreendem o genótipo de 3272, a semente transgênica das plantas de milho e a métodos para produzir uma planta de milho que compreende o genótipo de 3272 por cruzamento de uma linhagem endogâmica de milho compreendendo o genótipo de 3272 consigo própria ou outra linhagem de milho. Plantas de milho que compreendem o genótipo de 3272 são úteis no autoprocessamento de amido. Plantas de milho que compreendem o genótipo de 3272 também são capazes de utilizar manose como fonte de carbono.

Numa forma de realização, a presente invenção abrange uma molécula de ácido nucleico isolada que liga uma molécula de ADN heterólogo ao genoma da planta de milho no evento de milho 3272 consistindo em pelo menos uma sequência de nucleótidos de junção do evento de milho 3272 selecionada do grupo que consiste na SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2, em que a sequência de junção abrange a junção entre o ADN heterólogo que compreende a cassete de expressão inserida no genoma do milho e ADN do genoma do milho que flanqueia o sítio de inserção. Também se descreve uma molécula de ácido nucleico isolada que compreende pelo menos 10 ou mais (por exemplo, 15, 20, 25 ou 50) nucleótidos contíguos de uma sequência de ADN heterólogo inserida no genoma da planta de milho do evento de milho 3272 e pelo menos 10 ou mais (por exemplo, 15, 20, 25 ou 50) nucleótidos contíguos do ADN do genoma da planta de milho que flanqueia o ponto de inserção de uma sequência de ADN heterólogo inserida no genoma da planta de milho do evento de milho 3272. Também estão incluídas sequências de nucleótidos que compreendem 10 ou mais nucleótidos da sequência de inserto contígua do evento 3272 e pelo menos um nucleótido de ADN

flanqueador do evento 3272 adjacente à sequência de inserto. Tais sequências de nucleótidos são diagnóstico do evento 3272. A amplificação de ácidos nucleicos de ADN genómico do evento 3272 produz um amplicão que compreende tais sequências de nucleótidos de diagnóstico.

Outro aspeto descrito abrange uma molécula de ácido nucleico isolada compreendendo uma sequência de nucleótidos que compreende pelo menos uma sequência de junção do evento 3272 selecionada do grupo que consiste na SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2 e seus complementos, em que uma sequência de junção abrange a junção entre uma cassete de expressão heteróloga inserida no genoma do milho e ADN do genoma do milho que flanqueia o sítio de inserção e é diagnóstico do evento.

Outro aspeto descrito abrange um ácido nucleico isolado que liga uma molécula de ADN heterólogo ao genoma da planta de milho no evento de milho 3272 compreendendo uma sequência com desde cerca de 11 até cerca de 20 nucleótidos contíguos selecionada do grupo que consiste na SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 e os seus complementos.

Também se descreve uma molécula de ácido nucleico isolada compreendendo uma sequência de nucleótidos selecionada do grupo que consiste na SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 4 e os seus complementos.

Descreve-se um amplicão compreendendo uma sequência de nucleótidos selecionada do grupo que consiste na SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 e os seus complementos. Também se descreve um

amplificação compreendendo uma sequência de nucleótidos selecionada do grupo que consiste na SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 e os seus complementos.

Outro aspeto abrange iniciadores de sequências flanqueadoras para detetar o evento 3272. Tais iniciadores de sequências flanqueadoras compreendem uma sequência de ácido nucleico isolado que compreende pelo menos 10-15 nucleótidos contíguos dos nucleótidos 1-1409 da SEQ ID NO: 3 (arbitrariamente designada aqui sequência flanqueadora 5') ou os seus complementos. Num aspeto deste elemento, os iniciadores de sequências flanqueadoras são selecionados do grupo que consiste na SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 45 e SEQ ID NO: 48 e os seus complementos.

Outro aspeto abrange iniciadores de sequências flanqueadoras que compreendem pelo menos 10-15 nucleótidos contíguos dos nucleótidos 322-1879 da SEQ ID NO: 4 (arbitrariamente designada aqui sequência flanqueadora 3') ou os seus complementos. Num aspeto deste elemento, os iniciadores de sequências flanqueadoras são selecionados do grupo que consiste na SEQ ID NO: 36 e SEQ ID NO: 42 e os seus complementos.

Outro aspeto descrito abrange um par de iniciadores polinucleotídicos compreendendo um primeiro iniciador polinucleotídico e um segundo iniciador polinucleotídico que atuam conjuntamente na presença de um modelo de ADN do evento de milho 3272 numa amostra para produzir um amplificação diagnóstico do evento de milho 3272, em que a primeira sequência iniciadora é ou é complementar a um genoma da planta

de milho que flanqueia o ponto de inserção de uma sequência de ADN heterólogo inserida no genoma da planta de milho do evento de milho 3272 e a segunda sequência de iniciador polinucleotídico é ou é complementar à sequência de ADN heterólogo inserida no genoma da planta de milho do evento de milho 3272.

Num aspeto deste elemento, o primeiro iniciador polinucleotídico compreende pelo menos 10 nucleótidos contíguos das posições 1-1409 da SEQ ID NO: 3 ou seus complementos. Num aspeto adicional deste elemento, o primeiro iniciador polinucleotídico compreende a sequência de nucleótidos apresentada na SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 45 ou SEQ ID NO: 48 ou seus complementos. Noutro aspeto deste elemento, o primeiro iniciador polinucleotídico compreende pelo menos 10 nucleótidos contíguos das posições 322-1879 da SEQ ID NO: 4 ou seus complementos. Noutro aspeto deste elemento, o primeiro iniciador polinucleotídico compreende a sequência de nucleótidos apresentada na SEQ ID NO: 36 ou SEQ ID NO: 42 ou seus complementos. Ainda noutro aspeto deste elemento, o segundo iniciador polinucleotídico compreende pelo menos 10 nucleótidos contíguos da SEQ ID NO: 33 ou seus complementos. Ainda num aspeto adicional deste elemento, o segundo iniciador polinucleotídico compreende a sequência de nucleótidos apresentada na SEQ ID NO: 16 até SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 46 ou SEQ ID NO: 49 ou seus complementos.

Noutro aspeto deste elemento, o primeiro iniciador polinucleotídico, que é apresentado na SEQ ID NO: 34, e o segundo iniciador polinucleotídico, que é apresentado na SEQ ID NO: 21, atuam conjuntamente na presença de um modelo de ADN do evento de milho 3272 numa amostra para produzir um amplicão diagnóstico do evento de milho 3272 como descrito no Exemplo 5. Num aspeto adicional deste elemento, o primeiro iniciador polinucleotídico, que é apresentado na SEQ ID NO: 35, e o segundo iniciador polinucleotídico, que é apresentado na SEQ ID NO: 26, atuam conjuntamente na presença de um modelo de ADN do evento de milho 3272 numa amostra para produzir um amplicão diagnóstico do evento de milho 3272 como descrito no Exemplo 5. Ainda noutro aspeto deste elemento, o primeiro iniciador polinucleotídico, que é apresentado na SEQ ID NO: 39, e o segundo iniciador polinucleotídico, que é apresentado na SEQ ID NO: 40, atuam conjuntamente na presença de um modelo de ADN do evento de milho 3272 numa amostra para produzir um amplicão diagnóstico do evento de milho 3272 como descrito no Exemplo 4. Noutro aspeto deste elemento, o primeiro iniciador polinucleotídico, que é apresentado na SEQ ID NO: 45, e o segundo iniciador polinucleotídico, que é apresentado na SEQ ID NO: 46, atuam conjuntamente na presença de um modelo de ADN do evento de milho 3272 numa amostra para produzir um amplicão diagnóstico do evento de milho 3272 como descrito no Exemplo 8. Ainda noutro aspeto deste elemento, o primeiro iniciador polinucleotídico, que é apresentado na SEQ ID NO: 48, e o segundo iniciador polinucleotídico, que é apresentado na SEQ ID NO: 49, atuam conjuntamente na presença de um modelo de ADN do evento de milho 3272 numa amostra para produzir um amplicão

diagnóstico do evento de milho 3272 como descrito no Exemplo 8.

Noutro aspeto deste elemento, o primeiro iniciador polinucleotídico, que é apresentado na SEQ ID NO: 36, e o segundo iniciador polinucleotídico, que é apresentado na SEQ ID NO: 27, atuam conjuntamente na presença de um modelo de ADN do evento de milho 3272 numa amostra para produzir um amplicão diagnóstico do evento de milho 3272 como descrito no Exemplo 5. Ainda noutro aspeto deste elemento, o primeiro iniciador polinucleotídico, que é apresentado na SEQ ID NO: 42, e o segundo iniciador polinucleotídico, que é apresentado na SEQ ID NO: 41, atuam conjuntamente na presença de um modelo de ADN do evento de milho 3272 numa amostra para produzir um amplicão diagnóstico do evento de milho 3272 como descrito no Exemplo 4.

Obviamente, pertence à perícia na técnica obter sequência adicional penetrando mais na sequência do genoma que flanqueia qualquer uma das extremidades das sequências de ADN heterólogo inseridas para utilização como sequência iniciadora que pode ser utilizada em tais pares de iniciadores para amplificar as sequências que são diagnóstico do evento 3272. Para as finalidades desta revelação, a frase "penetrando mais na sequência do genoma que flanqueia qualquer uma das extremidades das sequências de ADN heterólogo inseridas" refere-se especificamente a um movimento sequencial afastando-se das extremidades das sequências de ADN heterólogo inseridas, os pontos em que as sequências de ADN inseridas são adjacentes à sequência de ADN genómico nativa, e penetrando no ADN genómico

do cromossoma particular onde foram inseridas as sequências de ADN heterólogo. Preferencialmente, uma sequência iniciadora correspondente ou complementar a uma parte da sequência de inserto deve iniciar a extensão da transcrição de um filamento nascente de ADN ou ARN na direção da junção das sequências flanqueadoras mais próxima. Consequentemente, uma sequência iniciadora correspondente ou complementar a uma parte da sequência flanqueadora genómica deve iniciar a extensão da transcrição de um filamento nascente de ADN ou ARN na direção da junção das sequências flanqueadoras mais próxima. Uma sequência iniciadora pode ser ou pode ser complementar a uma sequência de ADN heterólogo inserida no cromossoma da planta, ou uma sequência flanqueadora genómica. O perito na técnica reconhecerá facilmente o benefício de uma sequência iniciadora dever ser ou dever ser complementar à sequência apresentada dentro da sequência de ADN heterólogo inserida ou apresentada na SEQ ID NO: 3 ou SEQ ID NO: 4, dependendo da natureza do produto que se quer obter através da utilização de um conjunto encaixado de iniciadores destinados a utilização na amplificação de uma sequência flanqueadora particular contendo a junção entre a sequência de ADN genómico e a sequência de ADN heterólogo inserida.

Outro aspeto descrito abrange um método de deteção da presença de ADN correspondente ao evento 3272 numa amostra biológica, em que o método compreende: (a) contactar a amostra compreendendo ADN com uma sonda que hibrida, sob condições de estringência elevada, com ADN genómico do evento de milho 3272 e não hibrida, sob condições de estringência elevada, com ADN de uma planta de milho de controlo; (b) sujeitar a amostra e

sonda a condições de hibridação de estringência elevada, e (c) detetar a hibridação da sonda com o ADN. Num aspeto, o amplicão compreende uma sequência de nucleótidos selecionada do grupo que consiste na SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 e seus complementos.

Outro aspeto descrito abrange um método de deteção da presença de um ADN correspondente ao evento 3272 numa amostra biológica, em que o método compreende: (a) contactar a amostra compreendendo ADN com uma sonda que hibrida, sob condições de estringência elevada, com ADN genómico do evento de milho 3272 e não hibrida, sob condições de estringência elevada, com ADN de uma planta de milho de controlo; (b) sujeitar a amostra e sonda a condições de hibridação de estringência elevada, e (c) detetar a hibridação da sonda com o ADN. A deteção pode ser efetuada por qualquer meio bem conhecido na técnica, incluindo mas não se limitando a fluorescente, quimioluminescente, radiológico, imunológico ou outros. No caso de a hibridação se destinar a ser utilizada como meio de amplificação de uma sequência particular para produzir um amplicão que é diagnóstico do evento de milho 3272, pretende-se que a produção e deteção, por qualquer meio bem conhecido na técnica, do amplicão sejam indicadoras da hibridação pretendida com a sequência-alvo onde é utilizada uma sonda ou iniciador, ou sequências onde são utilizadas duas ou mais sondas ou iniciadores. Pretende-se que o termo "amostra biológica" compreenda uma amostra que contém ou que se suspeita conter um ácido nucleico compreendendo entre cinco e dez nucleótidos de cada lado do ponto onde uma ou a outra das duas extremidades terminais da sequência ADN heterólogo inserida contacta a sequência de ADN genómico dentro do cromossoma onde foi

inserida a sequência de ADN heterólogo, aqui também conhecidas como sequências de junção. Além disso, a sequência de junção compreende apenas dois nucleótidos: esses são o primeiro nucleótido dentro do ADN genómico flanqueador adjacente e covalentemente ligado ao primeiro nucleótido dentro da sequência de ADN heterólogo inserida.

Também se descreve um estojo para detetar a presença de ácidos nucleicos 3272 numa amostra biológica, em que o estojo compreende pelo menos uma molécula de ácido nucleico de comprimento suficiente de nucleótidos contíguos homóloga ou complementar a uma sequência de nucleótidos selecionada do grupo que consiste na SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 4, que atua como iniciador ou sonda de ADN específico para o evento 3272, e outros materiais necessários para permitir a hibridação ou amplificação de ácidos nucleicos. Pode utilizar-se uma variedade de métodos de deteção incluindo TAQMAN (Perkin Elmer), amplificação térmica, reação em cadeia de ligase, hibridação Southern, métodos ELISA e métodos de deteção colorimétricos e fluorescentes. Em particular, a presente invenção proporciona estojos para detetar a presença da sequência-alvo, isto é, pelo menos uma das junções do ADN de inserto com o ADN genómico da planta de milho em 3272, numa amostra que contém ácido nucleico genómico de 3272. O estojo é compreendido por pelo menos um polinucleótido capaz de se ligar ao sítio-alvo ou substancialmente adjacente ao sítio-alvo e pelo menos um meio para detetar a ligação do polinucleótido ao sítio-alvo. O meio de deteção pode ser fluorescente, quimioluminescente, colorimétrico ou isotópico e pode ser acoplado pelo menos a métodos imunológicos para detetar a

ligação. Também é concebido um estojo que consegue detetar a presença do sítio-alvo numa amostra, isto é, pelo menos uma das junções do ADN de inserto com o ADN genómico da planta de milho em 3272, tirando partido de duas ou mais sequências polinucleotídicas que, em conjunto, são capazes de se ligar a sequências de nucleótidos adjacentes ou dentro de cerca de 100 pares de bases, ou dentro de cerca de 200 pares de bases, ou dentro de cerca de 500 pares de bases ou dentro de cerca de 1000 pares de bases da sequência-alvo e que podem ser estendidas na direção uma da outra para formar um amplicão que contém pelo menos o sítio-alvo.

Também se descreve um método para detetar a proteína do evento 3272 numa amostra biológica, em que o método compreende: (a) extrair proteína de uma amostra de tecido do evento de milho 3272; (b) avaliar a proteína extraída utilizando um método imunológico que compreende anticorpo específico para a proteína inseticida ou de marcador selecionável produzida pelo evento 3272, e (c) detetar a ligação do referido anticorpo à proteína inseticida ou de marcador selecionável.

Também se descreve uma planta de milho, ou suas partes, compreendendo o genótipo do evento transgénico 3272, em que o genótipo compreende a sequência de nucleótidos apresentada na SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 ou SEQ ID NO: 4 ou seus complementos. A planta de milho provém das linhagens de milho endogâmicas CG5NA58, CG5NA58A, CG3ND97, CG5NA01, CG5NF22, CG4NU15, CG00685, CG00526, CG00716, NP904, NP911, NP948, NP934, NP982, NP991, NP993, NP2010, NP2013, NP2015, NP2017, NP2029, NP2031, NP2034, NP2045, NP2052, NP2138, NP2151,

NP2166, NP2161, NP2171, NP2174, NP2208, NP2213, NP2222, NP2275, NP2276, NP2316, BCTT609, AF031, H8431, 894, BUTT201, R327H, 2044BT e 2070BT. No entanto, o perito na técnica reconhecerá que o genótipo de 3272 pode sofrer introgressão em qualquer variedade de planta que possa ser melhorada com milho, incluindo espécies de milho selvagens.

Também se descreve uma planta de milho compreendendo pelo menos uma primeira e uma segunda sequências de ADN ligadas em conjunto para formarem uma sequência de nucleótidos contígua, em que a primeira sequência de ADN está dentro de uma sequência de junção e compreende pelo menos cerca de 11 nucleótidos contíguos selecionados do grupo que consiste nos nucleótidos 1400-1419 da SEQ ID NO: 3; nucleótidos 312-331 da SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6, e os seus complementos, em que a segunda sequência de ADN está dentro da sequência de ADN heterólogo de inserto apresentada na SEQ ID NO: 33 e os seus complementos, e em que a primeira e a segunda sequências de ADN são úteis como iniciadores ou sondas nucleotídicos para detetar a presença de sequências de ácidos nucleicos do evento de milho 3272 numa amostra biológica. Num aspeto, os iniciadores nucleotídicos são utilizados num método de amplificação de ADN para amplificar uma sequência de ADN-alvo a partir do ADN de modelo extraído da planta de milho e a planta de milho pode ser identificada relativamente a outras plantas de milho pela produção de um amplicão correspondente a uma sequência de ADN que compreende a SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 2

Plantas de milho podem ser adicionalmente caracterizadas pelo facto de a digestão do ADN genómico da planta com a endonuclease de restrição *KpnI* originar uma única banda de hibridação *amy797E* utilizando uma sonda específica para *amy797E* sob condições de estringência elevada. Exemplifica-se aqui uma sonda de *amy797E* compreendendo os nucleótidos 889-2771 da SEQ ID NO: 33.

Plantas de milho podem ser adicionalmente caracterizadas pelo facto de a digestão do ADN genómico da planta com a endonuclease de restrição *XmnII* originar uma única banda de hibridação *pml* utilizando uma sonda específica para *pml* sob condições de estringência elevada. Exemplifica-se aqui uma sonda de *pml* compreendendo os nucleótidos 4506-5681 da SEQ ID NO: 33.

Descreve-se adicionalmente uma planta de milho em que o genótipo de 3272 confere à planta de milho uma capacidade de autoprocessamento para hidrolisar amido ou a capacidade de utilizar manose. O genótipo que confere a capacidade de hidrolisar amido pela planta de milho compreende um gene *amy797E*. Noutro aspeto deste elemento, o genótipo que confere à planta de milho a capacidade de utilizar manose compreende um gene *pml*.

Também se descreve uma amostra biológica derivada de uma planta, tecido ou semente de milho com o evento 3272, em que a amostra compreende uma sequência de nucleótidos que é ou é complementar a uma sequência selecionada do grupo que consiste na SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2 e em que a sequência é detetável na amostra utilizando um método de amplificação de ácidos

nucleicos ou hibridação de ácidos nucleicos. Num aspeto deste elemento, a amostra é selecionada de farinha de milho, xarope de milho, óleo de milho, amido de milho e cereais produzidos, na totalidade ou em parte, para conterem produtos de milho.

Descreve-se adicionalmente um extrato derivado de uma planta, tecido ou semente de milho com o evento 3272 compreendendo uma sequência de nucleótidos que é ou é complementar a uma sequência de nucleótidos selecionada do grupo que consiste na SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2. Num aspeto deste elemento, a sequência é detetada no extrato utilizando um método de amplificação de ácidos nucleicos ou hibridação de ácidos nucleicos. Noutro aspeto deste elemento, a amostra é selecionada de farinha de milho, xarope de milho, óleo de milho, amido de milho e cereais produzidos, na totalidade ou em parte, para conterem produtos de milho.

Descreve-se adicionalmente um método para produzir uma planta de milho resistente a infestação pelo menos pela lagarta das raízes do milho, que compreende: (a) cruzar de modo sexuada uma primeira planta de milho paterna com uma segunda planta de milho paterna, em que a referida primeira ou segunda planta de milho paterna compreende ADN do evento de milho 3272, desse modo produzindo uma pluralidade de plantas de progenitura de primeira geração; (b) selecionar uma planta de progenitura de primeira geração que é capaz de autoprocessamento; (c) autofecundar a planta de progenitura de primeira geração, desse modo produzindo uma pluralidade de plantas de progenitura de segunda geração, e (d) selecionar, das plantas de progenitura de segunda geração, uma planta que é resistente a infestação

pelo menos pela lagarta das raízes do milho; em que as plantas de progenitura de segunda geração compreendem uma sequência de nucleótidos selecionada do grupo que consiste na SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2.

Também se descreve um método para produzir sementes de milho híbridas, que compreende: (a) plantar sementes de uma primeira linhagem endogâmica de milho compreendendo uma sequência de nucleótidos selecionada do grupo que consiste na SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 4 e sementes de uma segunda linhagem endogâmica com um genótipo diferente; (b) cultivar plantas de milho resultantes da referida plantação até ao florescimento; (c) emasculas as referidas flores de plantas de uma das linhagens endogâmicas de milho; (d) cruzar de modo sexuado as duas linhagens endogâmicas diferentes entre si, e (e) recolher a semente híbrida produzida desse modo. Num aspeto deste elemento, a primeira linhagem endogâmica de milho proporciona os progenitores femininos. Noutro aspeto deste elemento, a primeira linhagem endogâmica de milho proporciona os progenitores masculinos. O presente relatório descritivo também abrange a semente híbrida produzida pelo método e plantas híbridas cultivadas a partir da semente.

O perito na técnica reconhecerá que o genótipo transgénico descrito aqui pode sofrer introgressão por melhoramento noutras linhagens de milho compreendendo diferentes genótipos transgénicos. Por exemplo, uma linhagem endogâmica de milho compreendendo o genótipo transgénico pode ser cruzada com uma linhagem endogâmica de milho compreendendo o genótipo transgénico do evento Bt11 resistente a lepidópteros, que é

conhecido na técnica, desse modo produzindo semente de milho que compreende tanto o genótipo transgênico descrito aqui quanto o genótipo transgênico de Bt11. Exemplos de outros eventos transgênicos que podem ser cruzados com uma linhagem endogâmica do presente relatório descritivo incluem o evento GA21 tolerante ao glifosato, o evento MON802 tolerante ao glifosato/resistente a insetos lepidópteros, o evento DBT418 resistente a lepidópteros, o evento de esterilidade masculina MS3, o evento tolerante à fosfinotricina B16, o evento resistente a insetos lepidópteros MON 80100, os eventos tolerantes à fosfinotricina T14 e T25, o evento resistente a insetos lepidópteros 176 e o evento resistente a coleópteros MON863, todos os quais são conhecidos na técnica. Será adicionalmente reconhecido que podem ser efetuadas outras combinações com o genótipo transgênico do relatório descritivo.

O perito na técnica também reconhecerá que a semente de milho transgênico compreendendo o genótipo transgênico do presente relatório descritivo pode ser tratada com vários produtos químicos de tratamento de sementes.

Melhoramento

O genótipo transgênico pode sofrer introgressão em qualquer linhagem endogâmica ou híbrido de milho utilizando técnicas de melhoramento reconhecidas na técnica. O objetivo do melhoramento de plantas consiste em combinar numa única variedade ou híbrido várias características desejáveis. Para culturas de campo, estas características podem incluir resistência a insetos e doenças, tolerância a herbicidas, tolerância ao calor e à seca, redução do tempo necessário até

à maturidade da cultura, maior rendimento e melhor qualidade agronómica. Com a recolha mecânica de muitas culturas é importante a uniformidade das características da planta, tais como germinação e estabelecimento da cultura, velocidade de crescimento, maturidade e altura da planta e espiga.

Culturas de campo são melhoradas através de técnicas que tiram partido do método de polinização da planta. Uma planta é autopolinizada se o pólen de uma flor for transferido para a mesma ou para outra flor da mesma planta. Uma planta é polinizada de modo cruzado se o pólen provier de uma flor de uma planta diferente.

Plantas que foram autopolinizadas e selecionadas quanto ao tipo durante muitas gerações tornam-se homozigóticas em quase todos os locais genéticos e produzem uma população uniforme de progenitura de cruzamento verdadeira. Um cruzamento entre duas linhagens homozigóticas diferentes produz uma população uniforme de plantas híbridas que podem ser heterozigóticas quanto a muitos locais genéticos. Um cruzamento de duas plantas em que cada uma é heterozigótica nalguns locais genéticos produzirá uma população de plantas híbridas que diferem geneticamente e não serão uniformes.

Maís (*Zea mays* L.), muitas vezes designado milho, pode ser melhorado por técnicas de autopolinização e polinização cruzada. O milho tem flores masculinas e femininas separadas na mesma planta, localizadas no pendão e na espiga, respetivamente. Ocorre polinização natural em milho quando

vento sopra pólen dos pendões para as barbas que sobressaem dos topos das espigas.

Um método fiável de controlo da fertilidade masculina em plantas oferece a oportunidade de melhoramento aperfeiçoado de plantas. Tal é especialmente verdade para o desenvolvimento de híbridos de milho, que se baseia nalgum tipo de sistema de esterilidade masculina. Os criadores de melhoramento têm várias opções disponíveis para controlar a fertilidade masculina, tais como: emasculação (ou despendoamento) manual ou mecânica, esterilidade masculina citoplasmática, esterilidade masculina genética, gametocidas e semelhantes.

Uma semente de milho híbrida é tipicamente produzida por um sistema de esterilidade masculina que incorpora despendoamento manual ou mecânico. Filas alternadas de duas linhagens endogâmicas de milho são plantadas num campo e os pendões contendo pólen são removidos de uma das linhagens endogâmicas (feminina). Desde que haja um isolamento suficiente de fontes de pólen de milho estranho, as espigas da linhagem endogâmica submetida a despendoamento serão fertilizadas apenas a partir da outra linhagem endogâmica (masculina), e a semente resultante é conseqüentemente híbrida e formará plantas híbridas.

O processo de despendoamento trabalhoso e ocasionalmente não fiável pode ser evitado utilizando um de muitos métodos da técnica para conferir esterilidade masculina genética, cada um com os seus próprios benefícios e desvantagens. Estes métodos empregam uma variedade de abordagens, tais como administrar na

planta um gene que codifica uma substância citotóxica associada a um promotor específico para tecido masculino ou um sistema antissentido no qual é identificado um gene crítico para a fertilidade e um antissentido a esse gene é inserido na planta (ver: Fabinjanski, et al. publicação EPO 89/3010153.8 n° 329,308 e pedido PCT PCT/CA90/00037 publicado como WO 90/08828).

Desenvolvimento de Linhagens Endogâmicas de Milho

A utilização de linhagens endogâmicas de esterilidade masculina é apenas um fator na produção de híbridos de milho. Técnicas de melhoramento de plantas conhecidas na técnica e utilizadas num programa de melhoramento de plantas de milho incluem mas não se limitam a seleção recorrente, retrocruzamento, melhoramento do *pedigree*, seleção intensificada por polimorfismos de comprimento de restrição, seleção intensificada por marcadores genéticos e transformação. O desenvolvimento de híbridos de milho num programa de melhoramento de plantas de milho requer, em geral, o desenvolvimento de linhagens endogâmicas homozigóticas, o cruzamento destas linhagens e a avaliação dos cruzamentos. O melhoramento do *pedigree* e métodos de melhoramento por seleção recorrente são utilizados para desenvolver linhagens endogâmicas a partir de populações de melhoramento. Programas de melhoramento de plantas de milho combinam os contextos genéticos de duas ou mais linhagens endogâmicas ou várias fontes diferentes de plasma germinativo em reuniões de melhoramento a partir das quais são desenvolvidas novas linhagens endogâmicas por autofecundação e seleção de fenótipos desejados. As novas linhagens endogâmicas são cruzadas com

outras linhagens endogâmicas e os híbridos destes cruzamentos são avaliados para determinar quais os que têm potencial comercial. O melhoramento de plantas e desenvolvimento de híbridos, implementados num programa de melhoramento de plantas de milho, são processos dispendiosos e demorados.

O melhoramento do *pedigree* começa com o cruzamento de dois genótipos, cada um dos quais pode ter uma ou mais características desejáveis que estão ausentes no outro ou que complementam o outro. Se os dois progenitores originais não proporcionarem todas as características desejadas podem incluir-se outras fontes na população de melhoramento. No método do *pedigree*, plantas superiores são autofecundadas e selecionadas em gerações sucessivas. Nas gerações que se sucedem, a condição heterozigótica dá origem a linhagens homogêneas devido a autopolinização e seleção. Tipicamente, no método de melhoramento do *pedigree* são criadas cinco ou mais gerações de autofecundação e seleção: $F_1 \rightarrow F_2$; $F_2 \rightarrow F_3$; $F_3 \rightarrow F_4$; $F_4 \rightarrow F_5$; etc.

Pode utilizar-se melhoramento por seleção recorrente, retrocruzamento, por exemplo, para melhorar uma linhagem endogâmica e um híbrido que é preparado utilizando tais linhagens endogâmicas. O retrocruzamento pode ser utilizado para transferir uma característica desejável específica de uma linhagem endogâmica ou fonte para uma linhagem endogâmica desprovida dessa característica. Tal pode ser realizado, por exemplo, primeiramente cruzando uma linhagem endogâmica superior (progenitor recorrente) com uma linhagem endogâmica dadora (progenitor não recorrente) que contém o(s) gene(s)

apropriado(s) para a característica em questão. A progenitura deste cruzamento é depois cruzada de novo com o progenitor recorrente superior, seguido de seleção na progenitura resultante quanto à característica desejada a ser transferida do progenitor não recorrente. Após cinco ou mais gerações de retrocruzamento com seleção quanto à característica desejada, a progenitura será homozigótica quanto a locais que controlam a característica a ser transferida mas será como o progenitor superior quanto a essencialmente todos os outros genes. A última geração de retrocruzamento é depois autofecundada para originar progenitura de melhoramento pura quanto ao(s) gene(s) a ser(em) transferido(s). Um híbrido desenvolvido a partir de linhagens endogâmicas contendo o(s) gene(s) transferido(s) é essencialmente igual a um híbrido desenvolvido a partir das mesmas linhagens endogâmicas sem o(s) gene(s) transferido(s).

Linhagens endogâmicas de elite, isto é, linhagens endogâmicas homozigóticas de melhoramento puro, também podem ser utilizadas como materiais de partida para melhoramento de populações de fonte a partir das quais se podem desenvolver outras linhagens endogâmicas. Estas linhagens endogâmicas derivadas de linhagens endogâmicas de elite podem ser desenvolvidas utilizando o melhoramento do *pedigree* e métodos de melhoramento por seleção recorrente descritos anteriormente. Como exemplo, quando se utiliza melhoramento por retrocruzamento para criar estas linhagens derivadas num programa de melhoramento de plantas de milho, linhagens endogâmicas de elite podem ser utilizadas como linhagem paterna ou material de partida ou população de fonte e podem atuar como dador ou progenitor recorrente.

Desenvolvimento de Híbridos de Milho

Um híbrido de milho de cruzamento único resulta do cruzamento de duas linhagens endogâmicas, cada uma das quais tem um genótipo que complementa o genótipo da outra. A progenitura híbrida da primeira geração é designada F_1 . No desenvolvimento de híbridos comerciais num programa de melhoramento de plantas de milho apenas são pretendidas as plantas híbridas F_1 . Os híbridos F_1 preferenciais são mais vigorosos do que os seus progenitores endogâmicos. Este vigor híbrido, ou heterose, pode manifestar-se em muitas características poligénicas, incluindo crescimento vegetativo aumentado e rendimento aumentado.

O desenvolvimento de um híbrido de milho num programa de melhoramento de plantas de milho envolve três passos: (1) a seleção de plantas de várias reuniões de plasma germinativo para cruzamentos de melhoramento iniciais; (2) a autofecundação das plantas selecionadas dos cruzamentos de melhoramento durante várias gerações para produzir uma série de linhagens endogâmicas que, apesar de serem diferentes umas das outras, exibem melhoramento verdadeiro e são altamente uniformes, e (3) cruzamento das linhagens endogâmicas selecionadas com diferente linhagens endogâmicas para produzir a progenitura híbrida (F_1). Durante o processo de endogamia no milho, o vigor das linhagens diminui. O vigor é restabelecido quando duas linhagens endogâmicas diferentes são cruzadas para produzir a progenitura híbrida (F_1). Uma consequência importante da homozigidade e homogeneidade das linhagens endogâmicas é o facto de o híbrido entre um par definido de linhagens

endogâmicas ser sempre o mesmo. Depois de identificadas as linhagens endogâmicas que originam um híbrido superior, a semente híbrida pode ser reproduzida indefinidamente desde que a homogeneidade dos progenitores endogâmicos seja mantida.

É produzido um híbrido de um único cruzamento quando duas linhagens endogâmicas são cruzadas para produzir a progenitura F_1 . É produzido um híbrido de um cruzamento duplo a partir de quatro linhagens endogâmicas cruzadas em pares (A X B e C X D) e depois os dois híbridos F_1 são novamente cruzados (A X B) X (C X D). É produzido um híbrido de um cruzamento de três vias a partir de três linhagens endogâmicas em que duas das linhagens endogâmicas são cruzadas (A X B) e depois o híbrido F_1 resultante é cruzado com a terceira linhagem endogâmica (A X B) X C. Muito do vigor híbrido exibido pelos híbridos F_1 é perdido na geração seguinte (F_2). Consequentemente, sementes de híbridos não são utilizadas para lote de plantações.

A produção de sementes híbridas requer a eliminação ou inativação de pólen produzido pelo progenitor feminino. A remoção ou inativação incompleta do pólen proporciona o potencial de autopolinização. Esta semente inadvertidamente autopolinizada pode ser recolhida e embalada de modo não intencional com semente híbrida.

Depois de a semente ser plantada, é possível identificar e selecionar estas plantas autopolinizadas. Estas plantas autopolinizadas serão geneticamente equivalentes à linhagem endogâmica feminina utilizada para produzir o híbrido.

Tipicamente, estas plantas autopolinizadas podem ser identificadas e selecionadas devido ao ser vigor diminuído. As autofecundações femininas são identificadas pela sua aparência menos vigorosa quanto a características vegetativas e/ou reprodutivas, incluindo menor altura das plantas, menor tamanho das espigas, forma das espigas e grãos, cor dos sabugos ou outras características.

Estas linhagens autopolinizadas também podem ser identificadas através de análises de marcadores moleculares. Ver "The Identification of Female Selfs in Hybrid Maize: A Comparison Using Electrophoresis and Morphology", Smith, J. S. C. e Wych, R. D., *Seed Science and Technology* 14, páginas 1-8 (1995). Através destas tecnologias é possível verificar a homozigotidade da linhagem autopolinizada analisando a composição alélica em vários locais ao longo do genoma. Aqueles métodos permitem a identificação rápida da invenção revelada aqui. Ver também "Identification of Atypical Plants in Hybrid Maize Seed by Postcontrol and Electrophoresis" Sarca, V. et al., *Probleme de Genetica Teoritica si Aplicata* Vol. 20 (1) páginas 29-42.

Como é claro para o perito na técnica, os anteriores são apenas alguns dos vários modos pelos quais a linhagem endogâmica do presente relatório descritivo pode ser obtida pelos que pretendem a introgressão do genótipo transgénico noutras linhagens de milho. Estão disponíveis outros meios.

EXEMPLOS

O relatório descritivo será adicionalmente descrito com referência aos seguintes exemplos pormenorizados. Estes exemplos são proporcionados para fins ilustrativos. Técnicas comuns de ADN recombinante e clonagem molecular utilizadas aqui são bem conhecidas na técnica e são descritas por Ausubel (editor), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Inc. (1994); J. Sambrook, et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3ª Edição, Cold Spring Harbor, NI: Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001), e por T.J. Silhavy, M.L. Berman e L.W. Enquist, "Experiments with Gene Fusions", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NI (1984).

Exemplo 1. Transformação e Seleção do Evento 3272

O evento 3272 foi produzido por transformação mediada por *Agrobacterium* de uma linhagem endogâmica de milho (*Zea mays*) registada. Embriões imaturos foram transformados essencialmente como descrito em Negrotto et al. (*Plant Cell Reports* 19: 798-803, 2000), utilizando um fragmento de ADN do plasmídeo pNOV7013 (SEQ ID NO: 33). O plasmídeo pNOV7013 compreende cassetes de expressão em série. A primeira cassete de expressão é compreendida por uma sequência promotora de γ -Zeína (Nº de Acesso do Genbank X56117) operavelmente ligada a um gene de α -amilase *amy797E*, que também é operavelmente ligado ao Intrão Nº 9 de *Zea mays* do gene da fosfoenolpiruvato carboxilase (Matsuoka et al. 1989, *Euro. J. Biochem.* 181: 593-598), que também é operavelmente ligado a uma sequência de terminação da transcrição e poliadenilação na extremidade 3' etiquetada com 35S (Franck et al. 1980, *Cell* 21: 285-294). A segunda cassete de expressão é compreendida por um promotor ZmUbiInt de *Zea mays* (Christensen et al. 1992, *Plant Mol. Biol.*

18: 675-689) operavelmente ligado a uma sequência codificadora de *pmi* (N° de Acesso do Genbank M15380), também operavelmente ligada a uma sequência terminadora do gene da nopalina sintase de *Agrobacterium tumefaciens* (N° de Acesso do Genbank V00087).

Embriões imaturos foram excisados de espigas com 8 - 12 dias de idade e enxaguados com meio fresco na preparação para a transformação. Os embriões foram misturados com a suspensão de células de *Agrobacterium* albergando o vetor de transformação pNOV7013, foram submetidos a vórtice durante 30 segundos e deixados incubar durante mais 5 minutos. A solução de *Agrobacterium* em excesso foi aspirada e embriões foram depois deslocados para placas que continham um meio de cultura não seletivo. Os embriões foram cocultivados com a *Agrobacterium* remanescente a 22 °C durante 2-3 dias no escuro. Os embriões foram transferidos para meio de cultura suplementado com cefotaxima (250 mg/mL) e nitrato de prata (1,6 mg/L) e incubados no escuro durante 10 dias. Os embriões que produziram calo embriogénico foram transferidos para meio de cultura de células que continha manose.

As plântulas regeneradas foram testadas por análise de PCR TAQMAN® (ver Exemplo 2) quanto à presença de ambos os genes *pmi* e *amy797E*, bem como quanto à ausência do gene de resistência a antibióticos espectinomicina (*spec*). Plantas positivas para ambos os transgenes e negativas para o gene *spec* foram transferidas para a estufa para propagação adicional. Eventos positivos foram identificados e rastreados utilizando bioensaios de inseto contra a lagarta das raízes do milho. Os eventos inseticidas foram caracterizados quanto ao número de

cópias por análise TAQMAN. 3272 foi escolhido para análise adicional com base no facto de ter uma única cópia dos transgenes, boa expressão proteica identificada por ELISA e boa atividade enzimática.

A T₀ de 3272 foi cruzada com as linhagens endogâmicas de milho NP911x e NP2222x, criando populações T₁. As plantas T₁ foram autopolinizadas para criar a geração BC1 e este processo foi repetido para criar uma geração BC3 ou BC4, respetivamente. Empregou-se teste da progenitura das plantas retrocruzadas para identificar famílias homozigóticas (convertidas). As linhagens endogâmicas convertidas de 3272 foram cruzadas com outras linhagens endogâmicas de elite para criar híbridos utilizados em estudos adicionais.

Exemplo 2. Deteção de 3272 por PCR TAQMAN

A análise TAQMAN foi realizada essencialmente como descrito em Ingham *et al.* (*Biotechniques*, 31: 132-140, 2001). Em resumo, ADN genómico foi isolado de folhas de plantas de milho transgénicas e não transgénicas utilizando o Estojo de Extração de ADN Genómico Puregene® (Gentra Systems, Minneapolis, MN) essencialmente de acordo com a instrução do fabricante, com a exceção de todos os passos terem sido conduzidos em placas de 96 cavidades de 1,2 mL. O grânulo de ADN seco foi novamente suspenso em tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM).

Reações de PCR TAQMAN foram realizadas em placas de 96 cavidades. Para o controlo genético de milho endógeno, iniciadores e sondas foram especificamente concebidos para o gene da álcool desidrogenase (*adh1*) de *Zea mays* (nº de acesso

da Genbank AF044295). Será reconhecido pelo perito que podem ser utilizados outros genes de milho como controlos endógenos. As reações foram submetidas a multiplex para amplificar simultaneamente *amy797E* e *adh1* ou *pmi* e *adh1*. Para cada amostra gerou-se uma mistura-mãe combinando 20 µL de ADN genómico extraído com 35 µL de 2x TAQMAN Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) suplementado com iniciadores para uma concentração final de 900 nM cada, sondas para uma concentração final de 100 nM cada e água para um volume final de 70 µL. Esta mistura foi distribuída em três repetições de 20 µL cada em placas de amplificação de 96 cavidades e selada com filme de selagem térmica ópticamente transparente (Marsh Bio Products). Conduziu-se PCR num instrumento ABI Prism 7700 utilizando os seguintes parâmetros de amplificação: 2 min a 50 °C e 10 min a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 15 s a 95 °C e 1 min a 60 °C.

Os resultados da análise TAQMAN demonstraram que o evento 3272 tinha uma cópia do gene *amy797E* e uma cópia do gene *pmi*.

Exemplos de combinações adequadas de sequências de iniciador/sonda que foram utilizadas são:

Nome do Iniciador	Sequência do Iniciador	SEQ ID
<u>NO:</u>		
synAmyl-direto	5'- CAAGCAGGAGCTCATCAACATG -3'	SEQ ID NO: 7
synAmyl-reverso	5'- GCCCTGTGGTTGATCACGAT -3'	SEQ ID NO: 8
synAmyl-sonda	5'- TCCGCGATGACCTTGATGCCGTA -3'	SEQ ID NO: 9
	(Etiqueta 5' = FAM, etiqueta 3' = TAMRA)	
PMI-direto	5'-CCGGGTGAATCAGCGTTT-3'	SEQ ID NO: 10
PMI-reverso	5'-GCCGTGGCCTTTGACAGT-3'	SEQ ID NO: 11
PMI-sonda	5'-TGCCGCCAACGAATCACCGG-3'	SEQ ID NO: 12

(Etiqueta 5' = FAM, etiqueta 3' = TAMRA)

ZmADH-267direto 5'-GAACGTGTGTTGGGTTTGCAT-3' SEQ ID NO: 13

ZmADH-337 reverso 5'-TCCAGCAATCCTTGACACCTT-3' SEQ ID NO: 14

ZmADH-316 sonda 5'-TGCAGCCTAACCATGCGCAGGGTA-3' SEQ ID NO: 15

(Etiqueta 5' = TET, etiqueta 3' = TAMRA)

Exemplo 3. Detecção de 3272 por Transferência Southern

ADN genómico utilizado para a análise Southern foi isolado de tecido foliar reunido de dez plantas representando a geração de retrocruzamento seis (BC4) de 3272 utilizando essencialmente o método de Thomas *et al.* (*Theor. Appl. Genet.* 86: 173-180, 1993). Todas as plantas utilizadas para o isolamento de ADN foram individualmente analisadas utilizando PCR TAQMAN (como descrito no Exemplo 2) para confirmar a presença de uma única cópia do gene *amy797E* e do gene *pmi*. Para os controlos segregantes negativos, ADN foi isolado de tecido foliar reunido de cinco plantas representando a geração BC4 do evento 3272. Estas plantas segregantes negativas foram analisadas individualmente utilizando PCR TAQMAN e os ensaios foram negativos quanto à presença do gene *amy797E* e do gene *pmi* mas foram, como esperado, positivos para o controlo interno do ensaio, o gene de milho endógeno *adh*.

Conduziu-se análise Southern utilizando técnicas convencionais de biologia molecular. ADN genómico (7,5 µg) foi digerido com enzimas de restrição *KpnI* ou *XmnI*, que têm um único sítio de reconhecimento dentro do inserto de T-ADN de 3272. Esta abordagem permite determinar o número de cópias dos elementos, correspondentes à sonda específica utilizada para cada Southern, que foram incorporados em 3272. Tal origina uma banda de hibridação por cópia do elemento presente em 3272. Após

eletroforese em gel de agarose e transferência alcalina para uma membrana Nytran® realizaram-se hibridações utilizando sondas completas geradas por PCR específicas para elementos. A sonda utilizada nas transferências Southern de *amy797E* e *pmi* compreendem os nucleótidos 889-2771 da SEQ ID NO: 33 e nucleótidos 4506-5681 da SEQ ID NO: 33, respectivamente. As sondas foram etiquetadas com ³²P via iniciação aleatória utilizando o sistema Rediprime™ II (Amersham Biosciences, N° do Cat. RPN1633).

Utilizaram-se as seguintes condições de hibridação: Adicionam-se 1-2 milhões de cpm/mL a PerfectHyb (Sigma) suplementado com ADN de Timo de Vitelo (Invitrogen) 100 µg/mL pré-aquecido para 65 °C. A hibridação foi realizada a 65 °C durante 3 horas. [Ocorre pré-hib na mesma solução de acima, mesma temp O/N ou durante pelo menos uma hora], seguido de lavagem 2X em 2X SSC, SDS 0,1% durante 20 minutos a 65 °C e 2X em 0,1X SSC, SDS 0,1% durante 20 minutos a 65 °C.

Em cada Southern incluíram-se três amostras de controlo: (1) ADN de um segregante negativo (não transformado) utilizado para identificar quaisquer sequências endógenas de *Zea mays* que possam hibridar de modo cruzado com a sonda específica para elementos; (2) ADN de um segregante negativo no qual é introduzida uma quantidade de pNOV7013 digerido com *KpnI* ou *XmnI* que é igual a um número de cópias com base no comprimento da sonda, para demonstrar a sensibilidade da experiência na deteção de uma única cópia de genes dentro do genoma de *Zea mays*, e (3) plasmídeo pNOV7013 digerido com *KpnI* ou *XmnI* que é igual a um número de cópias com base no comprimento da sonda,

como controlo positivo da hibridação bem como para demonstrar a sensibilidade da experiência.

Os dados da hibridação proporcionam evidências confirmatórias que suportam a análise de PCR TAQMAN segundo a qual 3272 contém uma única cópia dos genes *amy797E* e *pmi* e segundo a qual 3272 não contém nenhuma das sequências vetoriais da cadeia principal presentes em pNOV7013. Como esperado para ambas as sondas *amy797E* e *pmi*, o dígito com *KpnI* e *XmnI*, respetivamente, originou uma única banda de hibridação, demonstrando que uma única cópia de cada gene está presente no evento 3272. Adicionalmente, para a sonda da cadeia principal, a ausência de hibridação demonstra a ausência de quaisquer sequências da cadeia principal do vetor pNOV7013 incorporadas em 3272 durante o processo de transformação.

Exemplo 4. Sequenciação do Inseto de T-ADN

Determinou-se a sequência de nucleótidos de todo o inserto de ADN transgénico presente no evento 3272 para demonstrar a integridade global do inserto, a contiguidade dos elementos funcionais e para detetar quaisquer alterações de pares de bases individuais. O inserto 3272 foi amplificado a partir de ADN derivado da geração BC4 na forma de dois fragmentos individuais sobrepostos. Cada fragmento foi amplificado utilizando um iniciador polinucleotídico homólogo a sequências genómicas de planta que flanqueiam o inserto 3272 e um iniciador polinucleotídico homólogo à sequência de inserto. Para gerar o fragmento 5', um primeiro iniciador polinucleotídico homólogo à sequência flanqueadora 5', AmyFln-5' (SEQ ID NO: 39), foi combinado com um segundo iniciador

polinucleotídico homólogo ao ADN inserido dentro do promotor ZmUbiInt, AmyFln-3' (SEQ ID NO: 40). Para gerar o fragmento 3', um primeiro iniciador polinucleotídico homólogo à sequência flanqueadora 3', AmyF2-3' (SEQ ID NO: 42), foi combinado com um segundo iniciador polinucleotídico homólogo ao ADN inserido dentro do promotor ZmUbiInt, AmyF2-5' (SEQ ID NO: 42).

Conduziu-se amplificação por PCR utilizando o sistema de PCR Expand High Fidelity (Roche, N° Cat. 1732650) sob as condições seguintes: 95 °C durante 5 min, 94 °C durante 30 s, 50-60 °C durante 30 s durante 35 ciclos, 72 °C durante 2 min, 72 °C durante 10 min e terminando a 4 °C. O amplicão resultante da amplificação por PCR utilizando a SEQ ID NO: 39 e SEQ ID NO: 40 está apresentado na SEQ ID NO: 43 e compreende a sequência de junção 5' (SEQ ID NO: 1). O amplicão resultante da amplificação por PCR utilizando a SEQ ID NO: 42 e SEQ ID NO: 41 está apresentado na SEQ ID NO: 44 e compreende a sequência de junção 3' (SEQ ID NO: 2). Cada fragmento de sequenciação foi individualmente clonado no vetor pCR -XL-TOPO® (Invitrogen, N° Cat. K4700-20) e três clones separados para cada fragmento foram identificados e sequenciados. A sequenciação foi efetuada utilizando um analisador ABI3730XL utilizando química de dGTP ABI BigDye® 1.1 ou Big Dye 3.1 (para modelos ricos em GC). A análise de sequência foi efetuada utilizando o pacote Phred, Phrap e Consed da Universidade de Washington e foi realizada com uma taxa de erro menor do que 1 em 10 000 bases (Ewing e Green, 1998). Determinou-se a sequência de consenso final combinando os dados de sequência dos seis clones individuais (três para cada fragmento de sequenciação) para gerar uma sequência de consenso do inserto 3272. Procedeu-se ao

alinhamento utilizando o programa ClustalW com os seguintes parâmetros: matriz de pontuação Blosun55, penalidade por abertura de intervalo 15, penalidade por extensão de intervalo 6,66 (Thompson *et al*, 1994, *Nucleic Acids Research*, 22, 4673-4680).

Os dados da sequência de consenso para o inserto de T-ADN 3272 demonstraram que a integridade global do inserto e contiguidade dos elementos funcionais dentro do inserto como pretendido em pNOV7013 haviam sido mantidas. A análise de sequência revelou que ocorreu algum truncamento nas extremidades da borda direita (RB) (nucleótidos 1-2 da SEQ ID NO: 33) e borda esquerda (LB) (nucleótidos 6083-6100 da SEQ ID NO: 33) do inserto de T-ADN durante o processo de transformação que originou o evento 3272. A porção RB do inserto de T-ADN foi truncada por 23 pb e a extremidade LB do inserto de T-ADN foi truncada por 7 pb. Estas deleções não têm nenhum efeito na eficácia do inserto de T-ADN e este fenômeno foi previamente observado em transformação mediada por *Agrobacterium* (Tinland & Hohn, 1995. *Genetic Engineering*, 17: 209-229).

Exemplo 5. Análise da Sequência de ADN Flanqueadora

Determinou-se a sequência de ADN do genoma de milho que flanqueia o ADN heterólogo inserido no genoma da planta de milho do evento 3272 na borda direita (designada sequência flanqueadora 5') utilizando o método de PCR entrelaçado assimétrico térmico (TAIL) como descrito por Liu *et al*. (1995, *The Plant Journal* 8: 457-463). Este método emprega três iniciadores encaixados específicos para o inserto, CT RB-1 5'-TGCGGTTCTGTCAGTTCCAAACGTA-3' (SEQ ID NO: 18), CT RB-2 5'-

AACGTGACTCCCTTAATTCTCCGCTCATGATCA-3' (SEQ ID NO: 19) e CT RB-3: 5'-GATTGTCGTTTCCCGCCTTCAGTTTA-3' (SEQ ID NO: 20), em três reações sucessivas juntamente com uma mistura de iniciadores arbitrários degenerados (iniciadores AD). A mistura de iniciadores AD compreendeu os seguintes iniciadores: MZEAD1: 5'-WGTGNAGSANCGNAGA-3' (SEQ ID NO: 28), MZEAD2: 5'-WCAGNTGSTNGTNCTG-3' (SEQ ID NO: 29), MZEAD6 5'-STGGNTCSANCTNTGC-3' (SEQ ID NO: 30) e MZEAD8 5'-NCCGASTSTSGSGTT-3' (SEQ ID NO: 31), em que W= A ou T, N=A, T, C ou G e S=C ou G. Todas as reações de PCR continham 0,5 µM de iniciadores específicos para T-ADN e 2 até 4 µM de iniciadores AD em reagente de PCR 2X Jumstrat Readymix Red (Sigma Chemical Co.).

Para a reação de PCR TAIL primária utilizaram-se dez ng de ADN genómico de 3272, iniciadores CT RB-1 e mistura de AD numa reação de 10 µL. As condições de PCR foram as seguintes: 4 °C durante 2 min, 93 °C durante 1 min, 95 °C durante 1 min, 94 °C durante 30 s, 62 °C durante 1 min, 72 °C durante 2 min e 30 s, 94 °C durante 30 s durante mais 4 ciclos, 94 °C durante 30 s, 25 °C durante 3 min, Subida a 0,2 °C por segundo para 72 °C, 72 °C durante 2 min e 30 s, 94 °C durante 10 s, 68 °C durante 1 min, 72 °C durante 2 min e 30 s, 94 °C durante 10 s, 68 °C durante 1 min, 72 °C durante 2 min e 30 s, 94 °C durante 10 s, 44 °C durante 1 min, 72 °C durante 2 min e 30 s, 94 °C durante 10 s durante mais 14 ciclos, 72 °C durante 5 min, terminando a 4 °C.

Para a reação de PCR TAIL secundária, um µL do produto de PCR da reação primária foi diluído 100 vezes com água destilada.

Utilizaram-se cinco μL do produto diluído como modelo numa reação de 50 μL utilizando os iniciadores CT RB-2 e mistura de AD. As condições para a reação de PCR TAIL secundária foram as seguintes: 4 °C durante 2 min, 94 °C durante 10 s, 64 °C durante 1 min, 72 °C durante 2 min e 30 s, 94 °C durante 10 s durante mais 4 ciclos, 94 °C durante 10 s, 64 °C durante 1 min, 72 °C durante 2 min e 30 s, 94 °C durante 10 s, 64 °C durante 1 min, 72 °C durante 2 min e 30 s, 94 °C durante 10 s, 44 °C durante 1 min, 72 °C durante 2 min e 30 s, 94 °C durante 10 s durante mais 14 ciclos, 94 graus durante 10 s, 44 graus durante 1 min, 72 graus durante 3 min, 94 °C durante 10 s durante mais 4 ciclos, 72 °C durante 5 min, terminando a 4 °C.

Para a terceira reação de PCR TAIL utilizaram-se 5 mL de uma diluição 100 vezes do produto de PCR secundário como modelo numa reação de 50 mL utilizando os iniciadores CT RB-3 e a mistura de AD. As condições para a terceira reação de PCR TAIL foram as seguintes: 4 °C durante 2 min, 94 °C durante 10 s, 44 °C durante 1 min, 72 °C durante 2 min 30 s, 94 °C durante 10 s durante mais 19 ciclos, 72 °C durante 5 min, terminando a 4 °C.

Depois de completadas todas as reações de PCR conduziu-se eletroforese em gel de agarose nos produtos de amplificação resultantes. O amplicão foi excisado e purificado com o Estojó de Extração em Gel QiaAquick (Cat #: 28706) e sequenciado utilizando o iniciador de T-ADN correspondente. Confirmou-se a sequência flanqueadora 5' utilizando um iniciador localizado na sequência flanqueadora 5', 15B13RB1F: 5'-TGCCAAGCCATGCCCATGCAAGTCG-3' (SEQ ID NO: 34) e um iniciador

específico para T-ADN, RB-Pr1a: 5'-GCGGTTCTGTCAGTTCCAAACG-3' (SEQ ID NO: 21) para conduzir PCR. A reação de PCR gerou um amplicão de 461 pb compreendendo os nucleótidos 1081-1541 da SEQ ID NO: 3, que compreende a sequência de junção 5' apresentada na SEQ ID NO: 1.

Sequência de ADN flanqueadora mais 5', penetrando mais no genoma para além do que foi descrito acima, e a sequência de ADN do genoma do milho que flanqueia o ADN heterólogo na borda esquerda (designada sequência flanqueadora 3') foram obtidas utilizando a tecnologia GenomeWalker™ (Clontech Laboratories, Inc.) de acordo com as instruções do fabricante. Preparou-se uma biblioteca digerindo 2,5 µg de ADN genómico do evento 3272 com a endonuclease de restrição *StuI*. Os fragmentos de ADN genómico resultantes foram depois ligados ao adaptador GenomeWalker™ proporcionado, que contém as sequências dos iniciadores adaptadores externos e encaixados. Cada ligação foi depois amplificada numa reação de PCR primária utilizando o iniciador GenomeWalker™ externo (5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'; SEQ ID NO: 32) e um iniciador específico para o inserto para a sequência da borda direita (5'-GTTGCGGTTCTGTCAGTTCCAAACGTAAA-3'; SEQ ID NO: 22) ou sequência da borda esquerda (5'-TTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCT-3'; SEQ ID NO: 23). A mistura de produtos da PCR primária foi depois diluída e utilizada como modelo para uma PCR secundária ou encaixada utilizando o iniciador adaptador encaixado (5'-ACTATAGGGCACGCGTGGT-3'; SEQ ID NO: 33) proporcionado por GenomeWalker™ e um iniciador encaixado específico para o inserto para a sequência da borda direita (5'-CTCCGCTCATGATCAGATTGTCGTTTC-3'; SEQ ID NO: 24) ou

sequência da borda esquerda (5'-TTACTAGATCTGCTAGCCCTGCAGGAAA-3'; SEQ ID NO: 25). Utilizaram-se as seguintes condições de PCR para as reações primária e secundária: 94 °C, 25 s; 72 °C, 3 min, 7X; 94 °C, 25 s; 67 °C, 3 min, 32X; 67 °C, 7 min, 1X.

A sequência flanqueadora 5' foi confirmada utilizando um iniciador localizado na região flanqueadora 5' (SEQ ID NO: 35) combinado com um iniciador da sequência de inserto (SEQ ID NO: 26) numa reação de PCR sob as seguintes condições: 95 °C durante 5 min, 94 °C durante 30 s, 50-60 °C durante 30 s durante 35 ciclos, 72 °C durante 2 min, 72 °C durante 10 min e terminando a 4 °C. A sequência do amplicão resultante está apresentada na SEQ ID NO: 3, que compreende a sequência de junção 5' apresentada na SEQ ID NO: 1. A sequência flanqueadora 5' compreendida na SEQ ID NO: 3 está apresentada na SEQ ID NO: 5.

A sequência flanqueadora 3' foi confirmada utilizando um iniciador localizado na região flanqueadora 3' (SEQ ID NO: 36) combinado com um iniciador específico para o inserto (SEQ ID NO: 27) numa reação de PCR sob as seguintes condições: 95 °C durante 5 min, 94 °C durante 30 s, 50-60 °C durante 30 s durante 35 ciclos, 72 °C durante 2 min, 72 °C durante 10 min e terminando a 4 °C. A sequência do amplicão resultante está apresentada na SEQ ID NO: 4, que compreende a sequência de junção 3' apresentada na SEQ ID NO: 2. A sequência flanqueadora 3' compreendida na SEQ ID NO: 4 está apresentada na SEQ ID NO: 6.

Exemplo 6. Análise de semente de plantas de milho 3272 expressando a α -amilase Amy797E

Obteve-se semente de plantas de milho 3272 transformadas com pNOV7013 como descrito no Exemplo 1. A acumulação de amido nestes grãos aparentou ser normal, com base em inspeção visual e coloração normal quanto a amido com uma solução de iodo antes de qualquer exposição a temperatura elevada. Os grãos imaturos foram dissecados e endospermas purificados foram colocados individualmente em tubos de microcentrifugação e imersos em 200 μ L de tampão NaPO_4 50 mM. Os tubos foram colocados num banho de água a 85 °C durante 20 minutos, depois foram arrefecidos em gelo. Adicionaram-se a cada tubo vinte microlitros de uma solução de iodo 1% e o sistema foi misturado. Aproximadamente 25% dos grãos segregantes coraram normalmente quanto ao amido. Os restantes 75% não exibiram coloração, indicando que o amido havia sido degradado em açúcares de baixo peso molecular que não ficam corados com iodo. Verificou-se que os grãos de 3272 procederam a auto-hidrólise do amido de milho. Não se observou nenhuma redução detetável do amido após incubação a 37 °C.

A expressão da amilase foi adicionalmente analisada por isolamento da fração proteica hipertermofílica do endosperma seguido de coloração por PAGE/Coomassie. Observou-se uma banda proteica segregante com o peso molecular apropriado (50 kD). Estas amostras são sujeitas a um ensaio de α -amilase utilizando amilose corada comercialmente disponível (AMYLZYME, da Megazyme, Irlanda). Níveis elevados de atividade de amilase hipertermofílica estão correlacionados com a presença da proteína de 50 kD.

Grãos de plantas do tipo selvagem ou plantas 3272 foram aquecidos a 100 °C durante 1, 2, 3 ou 6 horas e depois corados quanto ao amido com uma solução de iodo. Detetou-se pouco ou nenhum amido em grãos maduros após 3 ou 6 horas, respetivamente. Assim, o amido presente em grãos maduros de milho transgénico que expressam α -amilase hipertermofílica que é dirigida para o retículo endoplasmático foi hidrolisado quando incubado a temperatura elevada.

Noutra experiência, amido parcialmente purificado de grãos maduros de plantas 3272 que foram macerados a 50 °C durante 16 horas foi hidrolisado após aquecimento a 85 °C durante 5 minutos. Tal ilustrou que a α -amilase dirigida para o retículo endoplasmático se liga a amido após trituração do grão e é capaz de hidrolisar o amido por aquecimento. A coloração com iodo indicou que o amido permanece intacto em sementes maduras após a maceração durante 16 horas a 50 °C.

Noutra experiência, grãos maduros segregantes de plantas 3272 foram aquecidos a 95 °C durante 16 horas e depois foram secos. Em sementes que expressam a α -amilase hipertermofílica, a hidrólise do amido em açúcar originou uma aparência enrugada após a secagem.

Exemplo 7. Fermentação de grão de plantas de milho que expressam α -amilase

Milho 3272 transgénico que contém uma α -amilase termoestável tem bom desempenho na fermentação sem adição de α -amilase exógena, requer muito menos tempo para a liquefação e origina

solubilização mais completa do amido. Realizaram-se fermentações à escala laboratorial empregando um protocolo com os seguintes passos (pormenorizados abaixo): 1) trituração, 2) análise da humidade, 3) preparação de uma pasta que contém amido triturado, água, vinhaça ("backset") e α -amilase, 4) liquefação e 5) sacarificação e fermentação simultâneas (SSF). Neste exemplo, a temperatura e tempo do passo de liquefação foram variados como descrito abaixo. Adicionalmente, o milho transgénico foi liquefeito com e sem α -amilase exógena e o desempenho na produção de etanol foi comparado com milho de controlo tratado com α -amilase comercialmente disponível.

O milho foi seco para 11% de humidade e armazenado à temperatura ambiente. O teor de α -amilase da farinha de milho 3272 foi 95 unidades/g em que 1 unidade de enzima gera 1 micromole de extremidades reductoras por min a partir de farinha de milho a 85 °C em tampão MES pH 6,0. O milho de controlo que foi utilizado consistiu num milho amarelo dentado que se sabe ter bom desempenho na produção de etanol. 1) Trituração: Milho transgénico (1180 g) foi triturado num moinho de martelos Perten 3100 equipado com um crivo de 2,0 mm, deste modo gerando farinha de milho transgénico. Milho de controlo foi triturado no mesmo moinho após limpeza extensa para prevenir a contaminação pelo milho transgénico. 2) Análise de humidade: Amostras (20 g) de milho transgénico e de controlo foram pesadas em recipientes de pesagem de alumínio e aquecidas a 100 C durante 4 h. As amostras foram novamente pesadas e o teor de humidade foi calculado a partir da perda de peso. O teor de humidade da farinha transgénica foi 9,26%; o da farinha de controlo foi 12,54%. 3) Preparação de pastas: A composição de

pastas foi concebida para originar um mosto com 36% de sólidos no início da SSF. Prepararam-se amostras de controlo em garrafas de plástico de 100 mL que continham 21,50 g de farinha de milho de controlo, 23 mL de água desionizada, 6,0 mL de vinhaça (8% de sólidos por peso) e 0,30 mL de uma α -amilase comercialmente disponível diluída 1/50 com água. A dose de α -amilase foi escolhida como representativa da utilização industrial. Por avaliação sob as condições descritas acima para o ensaio da α -amilase transgénica, a dose de α -amilase de controlo foi 2 U/g de farinha de milho. O pH foi ajustado para 6,0 por adição de hidróxido de amónio. Prepararam-se amostras transgénicas do mesmo modo mas continham 20 g de farinha de milho devido ao menor teor de humidade da farinha transgénica. Prepararam-se pastas de farinha transgénica com α -amilase à mesma dose das amostras de controlo ou sem α -amilase exógena.

4) Liquefação: As garrafas que continham pastas de farinha de milho transgénico foram imersas em banhos de água a 85 °C ou 95 °C durante períodos de tempo de 5, 15, 30, 45 ou 60 min. As pastas de controlo foram incubadas durante 60 min a 85 °C. Durante a incubação a temperatura elevada, as pastas foram manualmente misturadas de modo vigoroso a cada 5 min. Após o passo a temperatura elevada, as pastas foram arrefecidas em gelo.

5) Sacarificação e fermentação simultâneas: O mosto produzido por liquefação foi misturado com glicoamilase (0,65 mL de uma diluição 1/50 de uma glicoamilase L-400 comercialmente disponível), protease (0,60 mL de uma diluição 1 000 vezes de uma protease comercialmente disponível), 0,2 mg de Lactósido & ureia (0,85 mL de uma diluição 10 vezes de Licor de Ureia 50%). Fez-se um orifício na tampa da garrafa de 100

mL contendo o mosto para permitir a ventilação de CO₂. O mosto foi depois inoculado com levedura (1,44 mL) e incubado num banho de água fixado a 90 F. Passadas 24 horas da fermentação, a temperatura foi diminuída para 86 F; às 48 horas foi fixada em 82 F.

A levedura para inoculação foi propagada preparando uma mistura que continha levedura (0,12 g) com 70 gramas de maltodextrina, 230 mL de água, 100 mL de vinhaça, glicoamilase (0,88 mL de uma diluição 10 vezes de uma glicoamilase comercialmente disponível), protease (1,76 mL de uma diluição 100 vezes de uma enzima comercialmente disponível), ureia (1,07 gramas), penicilina (0,67 mg) e sulfato de zinco (0,13 g). A cultura de propagação foi iniciada no dia antes de ser necessária e foi incubada com mistura a 90 °F.

Às 24, 48 & 72 horas recolheram-se amostras de cada reator de fermentação, que foram filtradas através de filtros de 0,2 µm e analisadas por HPLC quanto a etanol & açúcares. Às 72 h, amostras foram analisadas quanto aos sólidos dissolvidos totais e quanto a amido residual.

A análise de HPLC foi realizada num sistema de gradiente binário equipado com detetor do índice de refração, aquecedor de coluna & coluna Bio-Rad Aminex HPX-87H. O sistema foi equilibrado com H₂SO₄ 0,005 M em água a 1 mL/min. A temperatura da coluna foi 50 °C. O volume de injeção de amostras foi 5 µL; a eluição foi efetuada no mesmo solvente. A resposta de RI foi calibrada por injeção de padrões conhecidos. Etanol e glicose foram ambos medidos em cada injeção.

O amido residual foi medido do modo seguinte. Amostras e padrões foram secos a 50 °C num forno, depois triturados num pó num moinho de amostras. O pó (0,2 g) foi pesado num tubo de centrifugação graduado de 15 mL. O pó foi lavado 3 vezes com 10 mL de etanol aquoso (80% v/v) por sujeição a vórtice seguido de centrifugação e desperdício do sobrenadante. Adicionou-se DMSO (2,0 mL) ao grânulo seguido de 3,0 mL de uma alfa-amilase termoestável (300 unidades) em tampão MOPS. Após mistura vigorosa, os tubos foram incubados num banho de água a 85 °C durante 60 min. Durante a incubação, os tubos foram misturados quatro vezes. As amostras foram arrefecidas e adicionaram-se 4,0 mL de tampão de acetato de sódio (200 mM, pH 4,5) seguido de 0,1 mL de glicoamilase (20 U). As amostras foram incubadas a 50 °C durante 2 horas, foram misturadas, depois centrifugadas durante 5 min a 3 500 rpm. O sobrenadante foi filtrado através de um filtro de 0,2 µm e analisado quanto à glicose pelo método de HPLC descrito acima. Empregou-se um tamanho de injeção de 50 µL para amostras com pouco amido residual (<20% de sólidos).

Milho com o evento 3272 teve bom desempenho na fermentação sem α -amilase adicionada. O rendimento de etanol às 72 horas foi essencialmente o mesmo com ou sem α -amilase exógena. Estes dados também mostram que se obtém um rendimento mais elevado de etanol quando a temperatura de liquefação é maior; a presente enzima expressa no milho transgénico tem atividade a temperaturas mais elevadas do que outras enzimas utilizadas comercialmente, como a α -amilase de *Bacillus liquefaciens*.

Exemplo 8. Ensaio TAQMAN Específico para o Evento 3272

Este exemplo descreve um método de PCR TAQMAN quantitativo em tempo real específico para eventos para a determinação do teor relativo de ADN do Evento 3272 para ADN de milho total numa amostra. O ensaio de PCR foi otimizado para utilização num sistema de deteção de sequências ABI Prism® 7900. O equipamento que pode ser utilizado neste procedimento inclui mas não se limita ao seguinte: sistema de deteção de sequências ABI Prism® 7000 (Applied Biosystems Parte N° 4339940); "Software": Sistema de Deteção de Sequências versão 1.1 (Applied Biosystems Parte N° 4349157); sistema de deteção de sequências ABI Prisma^{1m} 7900HT (Applied Biosystems Parte N° 4329002 ou 4329004); "Software": Sistema de Deteção de Sequências versão 2.0 (Applied Biosystems Parte N° 4329002); "Software": Sistema de Deteção de Sequências versão 2.1 (Applied Biosystems Parte N° 43195666); placas de reação de 96 cavidades óticas MicroAmp® (Applied Biosystems Parte N° N801-0560); tampas óticas MicroAmp® (8 tampas/tira) (Applied Biosystems Parte N° N801-0935); coberturas adesivas óticas ABI Prisma® (Applied Biosystems Parte N° 4311971); estojo iniciador de cobertura adesiva ótica ABI Prism® (Applied Biosystems Parte N° 4313663); almofadas de compressão de cobertura ótica ABI Prism® (Applied Biosystems Parte N° 4312639).

Para a deteção específica de ADN genómico do Evento 3272 amplificou-se um fragmento de 94 pb da região que abrange a junção inserto-planta no Evento de milho 3272 utilizando dois iniciadores específicos. Os produtos de PCR foram medidos durante cada ciclo (tempo real) através de uma sonda oligonucleotídica específica para o alvo etiquetada com dois corantes fluorescentes: FAM como corante repórter na sua

extremidade 5' e TAMRA como corante extintor na sua extremidade 3'. Explora-se a atividade de 5'-nuclease da Taq ADN polimerase que origina a clivagem específica da sonda, conduzindo a fluorescência aumentada que depois é monitorizada.

Para a quantificação relativa de ADN do Evento 3272, um sistema de referência específico para milho que amplifica um fragmento de 136 pb de Álcool Desidrogenase (*Adh1*), um gene endógeno de milho, utilizando um par de iniciadores específicos para o gene *Adh1* e uma sonda específica para o gene *Adh1* etiquetada com VIC como corante repórter na sua extremidade 5' e TAMRA como corante extintor na sua extremidade 3' como descrito acima.

Exemplos de combinações adequadas de sequências de iniciador/sonda que foram utilizadas neste procedimento incluem:

Nome do Iniciador	Sequência do Iniciador	SEQ ID
<u>NO:</u>		
Es3272-5'	5'- TCATCAGACCAGATTCTCTTTTATGG -	SEQ ID NO: 45
Direto	3'	
Es3272-5'	5'- CGTTTCCCGCCTTCAGTTTA -3'	SEQ ID NO: 46
Reverso		
Es3272-5'	5'- ACTGCTGACGCGGCCAAACACTG -3'	SEQ ID NO: 47
Sonda	(etiqueta 5' = 6-FAM, etiqueta 3' = TAMRA)	
ESPCR0026 F	5'-CATGATGAGTGCGTGATGAGGGCTCTT-3'	SEQ ID NO: 48
ESPCR0004 R	5'-GTATGATCTCGGCATGACTCACCGTGTT-	SEQ ID NO: 49
	3'	

ZmAdh1 Direto 5'-CGTCGTTTCCCATCTCTTCCTCC-3' SEQ ID NO: 50
 ZmAdh1 5'-CCACTCCGAGACCCTCAGTC-3' SEQ ID NO: 51
 Reverso
 ZmAdh1 Sonda 5'-AATCAGGGCTCATTTTCTCGCTCCTCA-3' SEQ ID NO: 52
 (etiqueta 5' = VIC, etiqueta 3' =
 TAMRA)

Para análise de amostras de milho utilizaram-se aproximadamente 250 ng de ADN modelo por reação.

Todos os reagentes foram deixados descongelar, foram bem misturados e armazenados em gelo. Prepararam-se duas misturas reacionais, uma para PCR do Evento 3272 e uma para PCR de *Adh1* de *Zea mays*. As misturas-mãe consistiram em todos os componentes da PCR, excetuando modelo de ADN, em quantidade suficiente para realizar todas as reações (incluindo para soluções de ADN padrão). Tipicamente preparou-se um excesso de cada mistura-mãe para tomar em consideração perdas durante a transferência repetida de líquido.

Mostra-se nas Tabelas 1-5 uma listagem de reagentes, tampões e soluções utilizados neste procedimento.

Tabela 1. Lista de reagentes.

Reagente	Número/Especificação
EDTA 0,5 M	Sigma N° Cat. E-7889
Água sem nucleases	Sigma N° Cat. W-4502
Iniciadores de PCR (10 µM) e sondas oligonucleotídicas fluorescentes (5 µM)	Sintetizados pela Applied Biosystems

Mistura-mãe para PCR Sigma Jumpstart RedTaq (2X) requer Suplemento (ver abaixo)	Sigma Aldrich Ltd P-2893
Tris-HCl 1 M, pH 8,0	Sigma N° Cat. T-3038
MgCl ₂ 1 M	
Sulforrodamina 101	Sigma N° Cat. S-7635

Tabela 2. 50x lote de ensaio de Zm Adh1 endógeno.

50x Lote de Ensaio de Zm Adh1 Endógeno
1X concentração de iniciadores e sonda D 300 nM, R 300 nM, Sonda 200 nM
Para 1 mL de 50X concentração, num tubo de estilo Amber Eppendorf, misturar:
• 15 µL de Iniciador Direto (1000 pmol/µL),
• 15 µL de Iniciador Reverso (1000 pmol/µL),
• 100 µL I de Sonda (100 pmol/µL) e
• 870 µL de água sem nucleases
Sujeitar bem a vórtice & Armazenar a 4 °C até 1 ano.

Tabela 3. 50x lote de ensaio do Evento 3272.

50x Lote do Ensaio do Evento 3272
1X concentração de iniciadores e sonda D 50 nM, R 900 nM, Sonda 200 nM
Para 1 mL de 50X concentração, num tubo de estilo Amber Eppendorf, misturar:
• 2,5 µL de Iniciador Direto (1000 pmol/µL),
• 45 µL de Iniciador Reverso (1000 pmol/µL),

• 100 μL de Sonda (100 pmol/ μL) e
• 852,5 μL de água sem nucleases
Sujeitar bem a vórtice & Armazenar a 4 °C até 1 ano.

Tabela 4. 1000x Lote de sulforrodamina 101.

10000x Lote de sulforrodamina 101
• Ressuspender 100 mg de Sulforrodamina 101 in 360 mL de água sem nucleases
Sujeitar bem a vórtice & Armazenar a -20 °C.

Tabela 5. 2x Jumpstart Readymix Suplementado.

2x Jumpstart Readymix Suplementado
50 mL
A 2x Mastermix, Adicionar:
• 550 μL de MgCl_2 1 M,
• 10 μL de 10000x Sulforrodamina 101
Sujeitar bem a vórtice & Armazenar a 4 °C até 1 ano.

Aquando da preparação de cada mistura reacional, os reagentes foram tipicamente adicionados na ordem listada nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6. Preparação da reação para o ensaio do gene de referência Zm *Adh1*

Componente	Concentração na reação	Volume por reação (μL)
Sigma Jumpstart Readymix 2X	1x	12,5

50x Lote de Ensaio de ZmAdh 1 Endógeno (1x concentração = D 300 nM, R 300 nM, Sonda 200 nM)	1x	0,5
Água sem nucleases	#	7
ADN modelo (máximo 250 ng)	#	5
Total volume:		25

Tabela 7. Preparação da reação para o ensaio do Evento 3272

Componente	Concentração final em PCR	Volume por reação (μL)
Sigma Jumpstart Readymix 2X	1x	12,5
50x Lote de Ensaio do Evento 3272 (1x concentração = D 50 nM, R 900 nM, Sonda 200 nM)	1x	0,5
Água sem nucleases	#	7
ADN modelo (máximo 250 ng)	#	5
Total volume:		25

Foi conduzida PCR utilizando as condições de aplicação de ciclos listadas na Tabela 8 para ambos os ensaios do Evento 3272 e Zm Adh1.

Tabela 8. Condições de Aplicação de Ciclos de PCR

Passo	Etapa	T °C	Tempo (s)	Recolha de dados	Cic- los
1	UNG	50 °C	120"	não	1x
2	Desnaturação inicial	95 °C	600"	não	1x

3	Amplifi- cação	Desnaturação	95 °C	15"	não	40x
4		Emparelha- mento & Extensão	60 °C	60"	sim	

A curva padrão foi definida pela linha de regressão gerada a partir da média de sete pontos de dados, marcados S1 até S7. O primeiro ponto de dados utilizado para estabelecer a curva padrão foi o ponto S1 e foi derivado de um modelo que continha 100% do ADN genómico (gADN) do Evento 3272. Os pontos S2 - S7 da curva padrão foram obtidos por diluições do padrão 100% de gADN transgénico (GM), S1, em 100% de gADN não GM. A gama de % de concentração de GM utilizada para estabelecer a curva padrão abrange 0% até 100%. O esquema de diluição e a quantidade correspondente do teor de gADN do Evento 3272 em cada padrão estão pormenorizados na Tabela 9.

Tabela 9. Esquema de Diluição e Quantidade de gADN do Evento 3272.

	PADRÕES						
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7
Teor de gADN total por reação (ng)	250	250	250	250	250	250	250
Teor de gADN do Evento 3272 total por reação (ng)	250	25	12,5	2,5	1,25	0,25	0
Teor de %de GM relativo por reação	100	10	5	1	0,5	0,1	0
Fator de Diluição	1	10	20	100	200	1000	n/a

Os resultados da análise TAQMAN demonstraram que ADN do evento 3272 pôde ser seletivamente detetado e quantificado.

Todas as publicações e pedidos de patentes mencionados neste relatório descritivo são indicadores do nível de perícia dos peritos na técnica à qual pertence esta invenção.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Syngenta Participations AG

Johnson, Brian

Markham, Tanya

Samoylov, Vladimir

Meghji, Moez

<120> Evento de milho 3272 e Métodos para a Sua Deteção

<130> 70648WOPCT

<150> US 60/662,410

<151> 2005-03-16

<150> US 60/773,847

<151> 2006-02-16

<160> 52

<170> PatentIn versão 3.2

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Zea mays

<220>

<221> característica_mista

<222> (1)..(20)

<223> sequência de junção 5'

<400> 1

ctgacgaggc caaacactga

20

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

<213> Zea mays

<220>

<221> característica_mista

<222> (1)..(20)

<223> sequência de junção 3'

<400> 2

cacaatatat tcaagtcac

20

<210> 3

<211> 1600

<212> ADN

<213> Zea mays

<220>

<221> característica_mista

<222> (1)..(463)

<223> 5' flanqueadora + inserto

<400> 3

```

agccaatcac ggcaaaatac gcaagcataa cgcgcggetc acgtctcccc acccgatccc      60
cggccccatg ctaccattta tgaagctctt tcattcatgt taegtatgca taaacgcccg      120

taccctgcgg cggtafacc accacctgcc acgtcgaccc gcggccccca cacctagcca      180
cgccgggggc cgggctcttc tetagtaatg gaagcccigc gettccatta cctcgtccct      240
gcgctgcagct ctcttctgta ctaagatttc atccctgac ctgcgcgggc catcatcaat      300
acgagacggc catcttatgc atcctctctc ctctccgatr cctgatctga tggatcattc      360
caacaatatt taatafacra ctctactage gctctgtgta catgtgccct gtagtactgt      420
actgtacage tagctageta getccgagca gcaaagcagg ctacaggcta ggcagggctt      480
gaagtcgcat tgcattgcat tgcattgcca tcgtagcatg catcaattcc tgeccagaga      540
gcgaagtggg ttaattaatt agcaccaagg actgtgggtac gtactgctgc taaaaactaa      600
aaaggtttga aatgctgaga gagagagaaa gagagagagt acatgcatgc aatgcaatgc      660
acctatgcatc ttcaattcc atggcgccgt agcatctctc tctctctata gccttctctt      720
tccatcaacc tgagcaaaag aaagctgggt tccctgcaggc tgcgtgcgcc cggcgccgct      780
ctctgctgct tgratgcatc agcatgcccg cagtaactcc acacagccag cctctctctc      840
aaaagacatg tactacagta ccgctaccga gctagtacta ggtacacaca gtgtgtgtgt      900
gtgctgtggt actagtggtt ctctttgaa cagtaaatata cagcacaatc ctctgtctct      960
cttgcctctg ctcttgcgct gcatgctctt ccttccccgc actccctaat agctaggcat      1020
gcattgtcca tgaattgaa gctctctctc tctctctctc tctctctctc tctctctctc      1080
tgccaagcca tgcccatgca agtcgtctgc tctgttccag ctgaattcat gcccatgcaa      1140
atgcaagtgc tacgtctctc ttccagaat tcagcagcag tactctccac gcactgatcg      1200
ccgtcagaga gctaggtcag tggctgcagt gagtgggcat gatgagtgcg tgatgagggc      1260
tcttttgag ctactactac tagcgtgtgt attcattcac tctcactggc cgataaactg      1320
accatctatt tatttccaat cgatcgaatt catcagacca gattctcttt taiggccggc      1380
cggccggccc tgcctgactgc tgaccgggac aaacactgat agttfaaact gaaggcggga      1440
aacgacaatc tgatcatgag cggagaatta agggagtcac gttatgacc cggccgatga      1500
cgcgggacaa gccgttttac gtttggaaact gacagaaccg caacgctgca ggaattggcc      1560
gcagcggcca tttaaatcaa ttgggegcgc cgaattcgag      1600

```

<210> 4

<211> 1878

<212> ADN

<213> Zea mays

<220>

<221> característica_mista

<222> (1)..(1878)

<223> 3' inserto + flanqueadora

<400> 4

```
gaatcctggt gccggctctg ccatgattat catataattt ctgttgaatt acgttaagca    60
tgcataaatt aacatgiaat gcatgacgtt atttatgaga tgggttttta tgattagagt    120
cccgaatta tacatftaat acgcgataga aaacaaxata tagcgcgcaa actaggataa    180
```



```

attatcgcgc ggggtgcat ctatgttact agatctgcta gccctgcagg aaatttaccg 240
gtgccccggc gggcagcatg gccgtatccg caatgtgta ttaagttgtc taagcgtcaa 300
tttgittaca ccacaatata ttcaagtcac ctgcatgtga aataaacatc ttgtccctcc 360
tcgatgatcc acctctctct ctctctctct ctctctctct ctctctctct ctctctctca 420
tgctcaattg ctcatgcata tgcacgcgag cgtttgctcg cccattgttt gtttgcittt 480
gcttttatgt tcgatcgatg gatglatgig tatataggcg agaaggggca ccagctgctg 540
catgctgttt tcttacagtc ttgtattgta tgcattgcaa agagagaagc tagactagac 600
cagacaacac tagcgattct gacaggctga cttttgagca gttgactact cgctctacat 660
acagccttgt attattgtat agttttcttt aatgcctgac gttcaegtgt tcctatgcac 720
tgcagtgtat agcgacctgc ctatcgtgga cttttgittt ttttcaatc tattgtttt 780
atcagatact gtacagtaaa gatgcagact cacaaataaa caccatgaa aaaaaagggtg 840
ctatccgtct gaacttctga tctacactag tacacagaag ccttatagtg gcagttgaaa 900
acgtatttac actggcgitt ttcagttccg ccagtgctag gggccagtgg aatcagcat 960
ttccactgsc ggttattttg gaaccgccag tggaaagrgc attttactg gcggttttct 1020
taaggaaaac gccagtgaaa agtgcatttt caaccgccag tgaaaatgca ctttactctg 1080
gggtttctct ttataaaaac gccagtgaaa atgcactttt cactggcggg tttctttatt 1140
tagccgccag tggaaagttt cccgcccttt ttcaaaattt caaaccaaac tgaattatag 1200
atataattat ttaacacac acaaacatat atatafatag atctatattg atattgaaa 1260
caacatggaa ttaaattcta tcatacattt atatacatca aagtattctg tttaaacca 1320
tatalgcttc atgcatteta tacatcaaaa gttttcactt aagttetaat aactatctcg 1380
gctaagagat aatctactaa tttttgrrag tattctaaa cctggcaag cxaatgttcc 1440
ggaagcatcg tgatattttt cttctccggg aatgacctct ttcaatatga atgtgcagag 1500
gtcctcgaet atgccatata atgcagcttc ggtcaagttc tccgggtttc ctcgttgaaa 1560
ttgtgtaaa ggaattttat aaacatcacc tatttatact caafaataac acatttgcac 1620
ctttaatgac ataaatcac acttgactat tactaataat accttgcag ggttcgtgat 1680
gtatcgtccg ttcactctca tgaactcgca cgcatagaat ccacatagga ccgactcttg 1740
tggttgcttg tggcactaca taacgggaga ttggttattt agttgcaaca ttgtgtatga 1800
tatgtattca taaaatcaca tacttaccgg ccagtgatga tggatgtcta gggccatgcg 1860
ttgtttcgac aggtcgta 1878

```

<210> 5

<211> 1409

<212> ADN

<213> Zea mays

<220>

<221> característica_mista

<222> (1) .. (1409)

<223> sequência 5' flanqueadora

<400> 5

```

agccaatcac ggcaaaatac gcaagcataa cgcgeggctc acgtctcccc acccgatccc      60
cggccccacg ctaccattta tgaagctctt icattcatgt tacgtatgca taaacgccgg      120
taactgcgag cggatataccc accacctgcc acgctgaccc ggggeecgca caccatagcca      180
egccgggggc cggggctctc tctagtaatg gaagcctctg gettecatta cctcgtacct      240
gctgtcagct ctctctgta ctaagatttc atccttgatc ctgcygggt catcatcaat      300
acgagacggc catctcatgc atcctctc ctctccgatc cctgatctga tggatcattc      360
caacaatatt taataatac ctctactagc gtcgtgtgta catgtgectt gtagractgt      420
actgtacagc tagctagcta gctccgagca gcaaagcagg ctacaggcta ggcagggett      480
gaagtcgcat tgcattgcat cgcattgcga tgcagcagtg catcaattcc tgcacagaga      540
gcaagtgga ttaattaatt agcaccagg actgtggtac gtaactgtgc taaaaactaa      600
aaaggtttga aatgctgaga gagagagaaa gagagagagt acatgcatgc aatgcaatgc      660
accatgcate ttcaattcc atggcgccgt agcatctctc tctctctata gccctctctt      720
tccatcaacc tgagcaaaag aaagctggtt tccctgaggc tgcgtgcgcc cggcgccgt      780
ctctgtctcg tgcattgcat agcatgcgag cagtaactcc acacagccag cctctctctc      840
aaaagacatg tactacagta ccgctactga gctagtacta ggtacacaca gtgtgtgtgt      900
gtggtggtt actagtgtt ctctctgaa gatgaatata cagcacaatc ctctgtctct      960
cttctctctg ctcttgcctt geatgtctct cctteccgcg actccctaata agctaggcat      1020
gcattgtcca ttgaattgaa gctctctctc tctctctctc tctctctctc tctctctctc      1080
tgccaagcca tgcctatgca agtctctctc tctgttccag ctgaattcat gcccatgcaa      1140
atgcaagtcg tacgtctctc ttccagaat ccagcagcag tactctctac gcactgatcg      1200
ccgtcagaga gctaggtcag tggctgcagt gaggggcat gatgagtcg tgatgagggc      1260
tctttggag ctactactac tagcgtgtgt attcattcac tctactggc cgataaactg      1320
accatctatt tatctctaat cgtatgaaat catcagaaca gattctcttt tatggccggc      1380
cgcccgccc tgcctactgc tgacgcggc      1409

```

<210> 6

<211> 1557

<212> ADN

<213> Zea mays

<220>

<221> característica_mista

<222> (1)..(1557)

<223> sequência 3' flanqueadora

<400> 6

tcaagtcatc tgcattgtaa ataaacatct tgtccctcct cgatgatcca cctctctctc 60

tctctctctc tctctctctc tctctctctc tctctctcat gctcaattgc tcatgcatat 120

```

gcacgcgcgc gtttgcctgc ccattgcttg ttgcttttg cttttatggt cgatcgatgg 180
atgtatgtgt atatagggca gaaggggcar cagctgctgc atgectgitt cttacagtct 240
tgtattgtat gcatgcaaaa gagagaagct agactagacc agacaacact agcgattctg 300
acaggetgac tttgagcag ttgactactc gctctacata cagccttgta ttattgtata 360
gttttcttta atgectgacg ttcacgtgtt cctatgcatt gcagtgtata ggcacctgcc 420
tatcgtggac ctttgtttt tttcaattct atttgtttta tcagatactg tacagttaaag 480
atgcagactc acaaataaac argeatgaaa aaaaagggtc tatecgrctg aactrcrgat 540
ctacactagt acacagaagc tetatagtgg cagttgaaaa cgtattitaca ctggcgittt 600
tcagttccgc cagtgcctagg ggccagtgga aatcagcatt tccactggcg gttattttgg 660
aaccgccagt ggaagtgca ttttcactgg cggttttctt aaggaaaccg ccagtgaaaa 720
gtgcattttc aaccgccagt gaaaatgcac tttacactgg cggtttccct tataaaccg 780
ccagtgaaaa tgcacttttc actggcgggt tttttattt agccgccagt ggaagtttc 840
ccgccitttt tcaaaatttc aaacaatact gaattataga tatatttatt tacacacaca 900
caaacatata tatatataga tctatattga tattgaaagc aacatggaat taaattctat 960
catacattta tatacatcaa agtattctgt ttacaacct atatgcttca tgcattctat 1020
acatcaaaag ttttcaacta agttctaata actatctcgg cttaagagata atctactaat 1080
ttttgttagt atttcaact ctggcaaagc taatgtttcg gaagcctcgt gatattttcc 1140
ttctccggga atgacctctt tcaatatgaa tgtgcagagg tctctgacta tgccatacaa 1200
tgcagcttcc gtcaagttct cgggtttcc tggttgaaat tgcctgaaag gaattttata 1260
aacatcater atttatactc aataataaca cttttgcate tttaatgaca taaatacata 1320
cttgactatt actaataata ctttgcagg gttcgtgatg tatcgtccgt tcaactctat 1380
gaactcgcac gcatagaafc cacataggac cgatcctgtt ggttgcttgt ggcactacat 1440
aacgggagat tggttattta gttgcaacat tgtgtatgat argtattcat aaaatcacat 1500
acttaccggc cagtgatgat ggatgtctag tggcacgctt tgtttcgaca ggtcgta 1557

```

<210> 7

<211> 22

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> synAmyl-iniciador direto

<400> 7

caagcaggag ctcacccaaca tg

22

<210> 8

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> synAmyl-iniciador reverso

<400> 8

gcccctgfggt tgatcacgat

20

<210> 9

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sonda synAmyl

<400> 9

tccgcgatga ccttgatgcc gta

23

<210> 10

<211> 18

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador Direto pmi TAQMAN

<400> 10

~~ccgggtgaat tagcgtt~~

~~18~~

<210> 11

<211> 18

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador Reverso pmi TAQMAN

<400> 11

~~gccgtggcct ttgacagt~~

~~18~~

<210> 12

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sonda pmi TAQMAN

<400> 12

~~tgccgccaac gaatcaccgg~~

~~20~~

<210> 13

<211> 21

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador Direto ZmADH TAQMAN

<400> 13

~~gaacgtgtgt tgggtttgca t~~

21

<210> 14

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador Reverso zmADH TAQMAN

<400> 14

~~tccagcaatc cttgcacctt~~

20

<210> 15

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sonda ZmADH TAQMAN

<400> 15

~~tgcagcctaa ccctgcgcag ggta~~

24

<210> 16

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> iniciador synAmyl 1894

<400> 16

atctccgga tctggatacc

20

<210> 17

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> iniciador synAmyl-2933

<400> 17

ccggaggag acacgtactt

20

<210> 18

<211> 25

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> iniciador CT RB-1

<400> 18

tgccggttctg tcagttccaa acgta

25

<210> 19

<211> 33

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador CT RB-2

<400> 19

aacgtgactc ccttaattct ccgctcatga tca

33

<210> 20

<211> 26

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador CT RB-3

<400> 20

gattgtctgtc tcccgccttc agttta

26

<210> 21

<211> 22

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador RB-Pr1a

<400> 21

~~gcggttctgt cagttccaaa cg~~

22

<210> 22

<211> 29

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador RB GW-inserto

<400> 22

~~gttgcggttc tgcagttcc aaacgtaaa~~

28

<210> 23

<211> 30

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador LB GW-inserto

<400> 23

~~tctcttaaga ttgaatcttg tgcggtct~~

30

<210> 24

<211> 27

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador Encaixado RB

<400> 24

ctccgctcat gatcagattg tggtttc

27

<210> 25

<211> 28

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador Encaixado LB

<400> 25

ttactagatc tgctagcctt gcaggaaa

28

<210> 26

<211> 18

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> AmyRBflank-3'

<400> 26

gcgcgcccac ttgattta 18

<210> 27

<211> 19

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> iniciador AmyLBflank-5'

<400> 27

gaatcctgrr gccggttt 19

<210> 28

<211> 16

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> iniciador MZED1

<220>

<221> característica_mista

<222> (1)..(16)

<223> W = A ou T; N = A, C, T ou G; S = C ou G

<400> 28

wgtgnagsán cynaga 16

<210> 29

<211> 16

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> iniciador MZEAD2

<220>

<221> característica_mista

<222> (1)..(16)

<223> W = A ou T; N = A, T, C ou G; S = C ou G

<400> 29

~~wtcgnigtstn gtactg~~

~~16~~

<210> 30

<211> 16

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> MZEAD6 Iniciador

<220>

<221> característica_mista

<222> (1)..(16)

<223> S = C ou G; N = A, T, C ou G

<400> 30

~~stgnicsan cnttgc~~

~~16~~

<210> 31
<211> 15
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Iniciador MZEAD8

<220>
<221> característica_mista
<222> (1)..(15)
<223> S = C ou G; N = A, T, C ou G

<400> 31
nccgaststs gsgtt 15

<210> 32
<211> 22
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador GenomeWalker externo

<400> 32
gtaatcgcac tcactatagg gc 22

<210> 33
<211> 19

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador Adaptador Encaixado

<400> 33

actatagggc acgcgtggt

19

<210> 34

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> iniciador 15B13RB1F

<400> 34

tgccaagcca tgccatgcaa gtcg

24

<210> 35

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> iniciador AmyRBflank-5'

<400> 35

agccaatcac ggcasaatac

20

<210> 36
<211> 20
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> iniciador AmyLBflank-3'

<400> 36
~~tacgacctgt cgaacaacg~~ 20

<210> 37
<211> 6100
<212> ADN
<213> Zea mays

<220>
<221> característica_mista
<222> (1)..(2)
<223> Borda direita

<220>
<221> característica_mista
<222> (203)..(879)
<223> promotor de GZeína

<220>
<221> característica_mista
<222> (889)..(2271)

<223> amy797E

<220>

<221> característica_mista

<222> (2413)..(2482)

<223> terminador 35S

<220>

<221> característica_mista

<222> (2501)..(4493)

<223> promotor ZmUbiInt

<220>

<221> característica_mista

<222> (4506)..(5681)

<223> pmi

<220>

<221> característica_mista

<222> (5742)..(5994)

<223> terminador NOS

<220>

<221> característica_mista

<222> (6083)..(6100)

<223> Borda esquerda

<400> 37

caaacactga tagttraaac tgaaggcggg aaacgacaat ctgatcatga ggggagaatt 60
 aaggagatca cgttatgacc cccgcccgatg acgcccggaca agccgtttta cgtttggaac 120
 tgacagaacc gcaacgctgc aggaattggc cgcagcggcc attfaaatca artgggcgcg 180
 crgaattcga gctcggtaea agcttcgatc atccaggtgc aaccgtataa gtccataaagt 240
 ggtgaggaaac acgaaacaac catgcattgg catgtaaagc tccaagaatt tgttgtatcc 300
 ttaacaactc acagaacatc aaccaaaatt gcacgtcaag ggtattgggt aagaaacaat 360
 caaacaatec ctctctgtgt gcaaagaaac acggtgagtc atgccgagat catactcacc 420
 tgatatacat gcttacagct cacaagacat tacaacaac tcatattgca ttacaagat 480
 cgtttcatga aaaataaaat aggccggaca ggacaaaaat ccttgacgtg taaagtaaat 540
 ttacaacaaa aaaaaagcca tatgtcaagc taaatcta atcgttttacg tagatcaaca 600
 acctgtagaa ggcaacaaaa ctgagccacg cagaagtaca gaatgattcc agatgaacca 660
 tcgacgtgct acgtaagag agtgacgagt catatacatt tggcaagaaa ctatgaagct 720
 gccacagcc gtctcgggtg cataagaaca caagaaattg tgttaattaa tcaaagetat 780
 aaataacgct cgcatyctg tgcactctc catcaccacc actgggtctt cagaccatta 840
 gctttateta ctccagagcg cagaagaacc cgatcgacag gaccaccat gagggtgttg 900
 ctcgttgcc tcgctctctt ggtctctgct gcgagcggca ccagcgetaa gtacctggag 960
 ctggaggagg pggcgctgat catgcaggcg tctactggg acgtcccag cggaggcacc 1020
 tgggtggaca ccaccgccca gaagatccc gagtggtagc acgcccggat ctccgggatc 1080
 tggataccgc cagcttccaa gggcatgtcc gggggctact cgatgggcta cgaccctac 1140
 gactacttcg acctcggcga gtactaccag aagggcaagg tggagacgg cttcgggtcc 1200
 aagcaggagt tcatcaacat gatcaacacg gcgcacgctt acggcatcaa ggtcatcgg 1260
 gacatcgtga tcaaccacag ggcggcggc gacctggagt ggaaccctt cgtcggcgac 1320
 taraectgga cggactctc caaggtcgc tccggcaagt acaccgcaa ctacctcgac 1380
 ttcacccea acgagctgca cgtggcgac tccggcacgt tgggggcta cccggacatc 1440
 tgcacgaca agtctggga tcagtactgg ctctggcct cgtaggagt ctaccggcc 1500
 tacctggct ccateggcat cgaacgtgg cgttcgact acgtcaagg etaccgggccc 1560
 tgggtggca aggactggct caactgggtg ggcggctgg cgtggggca gtactgggac 1620
 accaacgtcg acgcgctct caactgggccc tattcctccg ggcacaagg gticgacttc 1680
 cccctgtact acaagatgga cggggccctc gacaacaaga acatcccgg ctcctcggag 1740
 gccctgaaga acggcggcac ggtggtctcc cggaccctt tcaaggccgt gacctctgc 1800
 gccaacacg acacggacat catctggaac aagtaccgg cgtacgctt catctcacc 1860
 tacgagggcc agcccacgat cttctaccgc gactacgagg agtggctgaa caaggacaag 1920

ctcaagaacc tgatctggat tcacgacaac ctccgccccg gctccaactag tategtgtac 1980
 tacgactccg acgagatgat ctccgtcccg aacggctacg gctccaagcc eggcctgac 2040
 acgtacatca acctgggctc ctccaagggtg ggccgcctgg tctacgtccc gaagttccgc 2100
 ggccgctgca tccacgagta caccggcaac ctccggcggct ggggtggacaa gtacgtgtac 2160
 tccctccgct gggctctacct ggaggccccg gcctacgacc ccgccaacgg ccagtagggc 2220
 tactccgtgt ggtcctactg cggcgtccgc tccgagaagg acgagctgtg ataggtaacg 2280
 aaactagagc tctagatctg ttctgcacaa agtggagtag tcagtcctcg atcaggaacc 2340
 agacaccaga cttttattca tacagtgaag tgaagtgaag tgcagtgcag tgagttgctg 2400
 gttttgttac aacttagtat gtatttgtat ttgtaaaata ctctatcaa taaaattctt 2460
 aattcctaaa accaaaatcc aggggtacca gcttgcctgc ctgcagtgca gctgaccccg 2520
 gtcgtgcccc tctctagaga taatgagcat tgcattgctc agttataaaa aattaccaca 2580
 tatttttttt gtcacacttg ttggaagtgc agtttatcta tctttataca tatattttaa 2640
 cttactcta cgaataatat aatctatagt accacaataa tctcagtytt ttagagaatc 2700
 atataaatga acagtttagc atggctctaa ggacaarrga gtattttgac aacaggactc 2760
 racagtttta tctttttagt gtgcattgtt tctcttttt ttttgcaaat agcttacctt 2820
 atataatact tcatccattt tattagtaca tccatttagg gtttagggtt aatggttttt 2880
 atagactaat ttttttagta catctatttt attctatttt agcctctaaa ttaagaaaac 2940
 taaaactcta ttttagttrt tttatttaaf aatttagata taaaatagaa taaaataaag 3000
 tgactaaaaa ttaacaaat accctttaag aaattaaaaa aactaaggaa acatttttct 3060
 tgittcgagt agataatgac agcctgttaa acgccgtcga cgagtctaac ggacaccaac 3120
 cagcgaacca gcagcgtcgc gtcgggcccga gcgaagcaga cggcacggca tctctgtcgc 3180
 tgccctctga cccctctcga gagttccgct ccaccgttg accttgctccg ctgtcggcat 3240
 ccagaaattg cgtggcggag cggcagactt gayccggcac ggcaggcggc ctctctctcc 3300
 tctcacggca cggcagcta cgggggattc ctttccacc gctccttgc tttcccttcc 3360
 tcgcccccg taataaatag acacccctc cacacccctt tcccccaacc tctgtttgtt 3420
 cggagcgcac acacacacaa ccagatctcc cccaaatcca cccgtcggca cctccgcttc 3480
 aaggtagcc gctcgtctc ccccccccc cctctctacc tctcttagat cggcgttccg 3540
 gtcctatggt agggcccggf agttctactt ctgttcatgt ttgtgttaga tccgtgtttg 3600
 tgtttagatc gtgctgctag cgttcgtaca cggatgcgac ctgtacgtca gacacgttct 3660
 gattgctaac ttgccagctt tctcttttg ggaatcctgg gatggctcta gccgttccgc 3720
 agacgggatc gatttcatga tttttttgt ttcgttgcac agggtttggf ttgccctttt 3780
 cctttatttc aatataatgc gtgcacttgt ttgtcgggtc atcttttcat gctttttttt 3840
 gctttggttg tgatgatgt gtctgtgtgg gccgtcttc tagatcggag tagaattctg 3900
 tttcaacta cctgggtggat ttattaatit tggatctgta tgtgtgtgcc atacatatcc 3960

atagttacga attgaagatg atggatggaa atatcgatct aggataggta tacatggtga 4020
 tgcgggtttt actgaigcat atacagagat gctttttgtt cgcrtggtrg tgatgatgtg 4080
 gtgtggttgg gcggtcgttc attcgttcta gatcggagta gaatactgtt tcaaacctacc 4140
 tgggtgtattt attaatlttg gaactgtatg tgtgtgtcat acatcttcat agttacgagt 4200
 ttaagatgga tggaaatatt gatctaggat aggtatacat gttgatgtgg gttttactga 4260
 tgcatafata tgatggcata tgcagratct attcatatgc tetaaccttg agtacctatc 4320
 tattataata aacaagatg ttttataatt atttgatctt tgatatactt gpatgatggc 4380
 atatgcagca gctatatgtg gattttttta gccctgcctt cctacgctat ttatttgcct 4440
 ggtactgttt cttttgtcga tgcctacctt gttgtttggt gttacttctg cagggatccc 4500
 cgatcatgca aaaacictatt aactcagtgc aaaactatgc ctggggcagc aaaacggcgt 4560
 tgactyaact ttatggtagt gaaaatccgt ccagccagcc gatggccgag ctgtggatgg 4620
 gcgcacatcc gaaaagcagt tcacgagtgc agaatgccgc cggagatata gtttcactgc 4680
 gtgatgtgat tgagagtgat aaatcgactc tgcctggaga ggcctgtgcc aaacgctttg 4740
 gcgaactgcc tttctgttc aaagtattat gcgcagcaca gccactctcc attcaggttc 4800
 atccaacaa acacaattct gaaatcggtt ttgccaaaga aaatgccgca ggtatcccga 4860
 tggatgccgc cgagcgtaac tataaagatc ctaaccacaa gccggagctg gtttttgcgc 4920
 tgacgccttt ccttgcgatg aacgcgtttc gtgaattttc cgagattgfc tccctactrc 4980
 agccggctgc aggtgcacat ccggcgattg ctacttttt acaacagcct gatgccgaac 5040
 gtttsagcga actgttcgcc agcctgttga atatgcaggg tgaagaaaaa tccccgcgcg 5100
 tggcgatttt aaaatcggcc ctcgatagcc agcaggggtg accgtggcaa acgattcgtt 5160
 taatttctga attttaccg gaagacagcg gtctgttctc cccgctattg ctgaatgtgg 5220
 tgaaitgaa ccttggcgaa gcgatgttcc tgttcgctga aacaccgcac gtttacctgc 5280
 aaggcgtggc gctggaaagt atggcaaaact ccgataacgt cctgcgtgcg ggtctgaagc 5340
 ctaaatatcat tgatattccg gaactcgttg ccaatgtgaa attcgaagcc aaaccggcta 5400
 accagttggt gaccagccg gtgaaacaag gtgcagaact ggacttcccg attccagtgg 5460
 atgattttgc ctctcgtg catgacctta gtgataaaga aaccaccatt agccagcaga 5520
 gtgcgcccat ttgttctgc gtcgaaggcg atgcaacgtt gtggaaaggt tctcagragt 5580
 tacagcttaa accgggtgaa tcagcgttta ttgcccctaa cgaatcaccg gtgactgtca 5640
 aaggccacgg ccgtttagcg cgtgtttaca acaagctgta agagcttact gaaaaaatta 5700
 acatctcttg ctaagctggg agctcgatcc gtgcacctgc agatcgttca aacatttggc 5760
 aataaagttt ctaagattg aatcctgttg ccggctttgc gatgattatc atataatttc 5820
 tgttgaatta cgttaagcat gtaataarta acatgtaatg catgacgtta tttatgagat 5880
 gggtttttat gattagagtc ccgcaattat acatttaata cgcgatagaa aacaaaatat 5940
 agcgcgcaaa ctaggataaa ttatcgcgcg cgggtgtcatc tatgttacta gatctgctag 6000

ccctgcagga aatttaccgg tgcccggggc gccagcatgg ccgtatccgc aatgtgttat 6060
 taagttgtct aagcgtcaat ttgtttacac cacaatatat 6100

<210> 38

<211> 6

<212> PRT

<213> Zea mays

<400> 38

Ser Glu Lys Asp Glu Leu
 1 5

<210> 39

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> iniciador AmyFln-5'

<400> 39

ccatgcasaat gcaagtcgta 20

<210> 40

<211> 27

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> iniciador AmyFln-3'

<400> 40

~~aaaggtatc tcttaatt ttagca~~ 27

<210> 41

<211> 19

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> iniciador AmyF2-5'

<400> 41

~~aatccaggg taccagctt~~ 19

<210> 42

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> iniciador AmyF2-3'

<400> 42

~~gctcaaaagt cagcctgca~~ 20

<210> 43

<211> 3304

<212> ADN

<213> Zea mays

<400> 43

```

ccatgcaaat gcaagtcgta cgtctctctt tccagaattc agcagcagta ctctccacgc      60
actgatcgcc gtcagagagc taggtcagtg gctgcagtga gtgggcatga tgagtgcgtg    120
atgagggctc ttttgagct actactacta gcgtgtgtat tcattcactc tcactggccg    180
ataaactgac catctattta tctccaatcg atcgaattra ttagaccaga ttctctttta    240
tgccctggcg gccggccctg ctgactgctg acggcgccaa acactgatag tttaaactga    300
aggcgggaaa cgacaatctg atcatgagcg gagaattaag ggagtcacgt tatgaccccc    360
gccgatgacg cgggacaagc cgttttactg ttggaactga cagaaccgca acgctgtagg    420
aattggccgc agcggccatt taaatcaat gggcgcgccg aattcgagct cggtaaacgc    480
ttgatcctc caggtgcaac cgtataagtc ctaaagtggg gaggaacacg aaacaacctat    540
gcattggcat gtaagctcc aagaattgt tgtatcctt acaactcaca gaacatcaac    600
caaaattgca cgtcaagggt attgggtaag aaacaatcaa acaaactctc tctgtgtgca    660
aagaaacacg gtgagtcatg ccgagatcat acicactcga tatacatgct tacagctcac    720
aagacattac aaacaactca tattgcattt caaagatcgt ttcattgaaa ataaaatagg    780
ccggacagga caaaaatcct tgactgttaa agtaaattta caacaaaaaa aaagccatat    840
gtcaagctaa atctaattcg ttttatgtag atcaacaacc tgtagaaggc aacaaaactg    900
agccacgcag aagtacagaa tgattccaga tgaaccatcg acgtgctatg taaagagagt    960
gacgagtcct atacatttgg caagaaacca tgaagctgcc tacagccgtc tgggtggcat   1020
aagaacacaa gaaattgtgt taattaatca aagctataaa taacgctcgc atgcttgtgc   1080
actctccat caccaccact gggctctcag accattaget ttatctactc cagagcgcag   1140
aagaaccgga tcgacaggat ccaccatgag ggtgttgcctc gttgccctcg ctctcctggc   1200
tctcgtcgcg agegccacca gcgctaagta cctggagctg gaggagggcg gctgtatcat   1260
gcaggcgctc tactgggacg tcccgagcgg aggcactctg tgggacacca ttcgccagaa   1320
gatccccgag tggtagcagc ccggcatctc cgcgafctgg ataccgccag ctccaaggg    1380
catgtccggg ggctactcga tgggctacga cccgtaagac tacttcgacc tgggcgagta   1440
ctaccagaag ggcacggctg agacgcgctt cgggtctaag caggagctca tcaacatgat   1500
caacacggcg cacgcctacg gcattcaaggf catcgcggac atcgtgatca accacagggc   1560
cggcggcgac ctggagtgga atccgttctg cggcgaetac acctggacgg acttctccaa   1620
ggtcgcctcc ggcaagtaca ccgcaacta cctcgacttc caccccaacg agctgcacgc   1680
ggcgcactcc ggcacgttcg gcggtactcc ggacatctgc cagacaagt cctgggacca   1740
gtactggctc tgggctctgc aggagtccta cgcggctac ctgctctca tggcatcga   1800
cgcgtggctc ttcgactacg tcaagggcta cggggcttgg gtggtcaagg actggtctaa   1860
ctggtggggc ggctggggcg tgggcagta ctgggacacc aactgcgacg cgtctctcaa   1920
ctgggectac tctctcggcg ccaagggtgtt cgacttcccc ctgtactaca agatggacgc   1980

```

```

ggccttgcac aacaagaaca tcccggcgct cgtcggagcc ctgaagaatg gcggcacggt 2040
ggtctccgac gacccgttca aggcccgtgac ctccgctgcc aaccatgaca cggacatcat 2100
ctggaacaag taccgggctg acgcttctat cctcacctac gagggccagc ccacgatctt 2160
ctaccgagac tacgaggagt ggctgaacaa ggacaagctc aagaacctga tctggattca 2220
cgacaacctc ggggggggct ccactagtat cgtgtactac gactccgagc agatgatctt 2280
cgtccgcaac ggctacggct ccaagcccgg cctgatcagc tacatcaacc tgggctcctc 2340
caaggctggc cgtctgggtg acgtcccga gttccgggc gegtgcctc accgatacac 2400
cggcaacctc ggcggctggg tggacaagta cgtgtactcc tccggetggg tctacctgga 2460
ggccccggcc tacgacctcg ccaacggcca gtacggctac tccgtgtggc cctactgagg 2520
cgtcggctcc gagaaggagc agctgtgata ggtaacgaaa ctgagctctc agatctgttc 2580
tgcacaaagt ggagtagtca gtcactgac aggaaccaga caccagactt ttattcatac 2640
agtgaagtga agtgaagtgc agtgcagtga gttgctgggt tttgtacaac ttagtatgta 2700
tttgtatttg taaaataact ctatcaataa aatttctaat tctaaaacc aaaatccagg 2760
ggaccagct tgcctgcctg cagtgcagcg tgaccgggtc gtgcccctct ctgagagataa 2820
tgagcattgc atgtetaagt tataaaaaat taaccacat tttttttgtc acacttggtt 2880
gaagtgcagt ttatctatct ttatacatat atttaactt tactctacga ataataaat 2940
ctatagtaet acaataatat cagtgtttta gagaactata taaatgaaca gttagacatg 3000
gtctaaagga caattgagta ttttgacaac aggactctac agttttatct ttttagtggt 3060
catgtgttct cctttttttt tgcaaatagc ttcacctata taatacttca tccattttat 3120
tagtacatcc atttagggtt tagggtraat ggtttttata gactaatttt rttagtaeat 3180
ctattttatt ctatttttag ctctaaatta agaaaactaa aactctattt tagttttttt 3240
atttaataat ttagatataa aatagaataa aataaagtga ctaaaatta aacaaatacc 3300
cttt 3304

```

<210> 44

<211> 3943

<212> ADN

<213> Zea mays

<400> 44


```
aatccagggg taccagcttg catgcctgra gtgcagcgtg acccggkgt gccctctctt 60
agagataatg agcattgcat gtctaagrra taaaaaaffa ccacataitt ttttctcac 120
acttgtttga agtgcagtrr atctatcitt atacatata ttaaacttta cctctaggar 180
aatataatct atagtactac aataatatca ggttrrraga gaaccatata aatgascagt 240
tagacatggt ctaaaggaca attgagtatt ttgacaacag gactctacag ttttatcttt 300
ttagtgtgca tgtgttctcc ttttttttgg caaatagcitt cacctatata atacttcatc 360
cattttatta glacatccat ttagggttia gggttaatgg ttttrrtraga ctaatttttt 420
```

```

tagtacatct atcttattct atcttagcct cttaattaag aaaactaaaa ctctatttta 480
gtrrrrrtat ttaarsattt agatataaaa tagaataaaa taaagtgact aaaaattaaa 540
caaataccct ttaagaaatt aaaaaaacta aggaaacatt tttcttgttt cgagtagata 600
atgccagcct gttaaacgce gtcgacgagt ctaacggaca ccaaccageg aaccagcage 660
gtcgcgtcgg gccaaagcga gcagacggca cggcatctct gtcgctgect ctggaccctt 720
ctcgagagtt cegetccacc gttggacttg ctccgctgtc ggcatccaga aattgctgg 780
cggagcggca gacgtgagcc ggcacggcag ggggectctt cctcctctca cggcaccggc 840
agctacgggg gatlccttcc ccaccgctcc ttgccttcc cttcctegcc cgcegraata 900
aatagacacc cctccacac cctctttccc caacctcgtg ttgttcggag cgcacacaca 960
cacaaccaga tctcccccaa atccaccctg cggcaectcc gcttcaaggc acgccgctcg 1020
tctccccccc cccccctct ctacctctct tagatcggcg ttccggctca tggttagggc 1080
ccggtagttc taacttctgt catgtttgtg ttagatcctg gtttgtgta gatcctgct 1140
gctagcgttc gtacacggat gcgaectgta cgtcagacac gttctgattg ctaacttgcc 1200
agtgtttctc ttgggggaat cctgggatgg ctctagcctt tccgcagacg ggatcgattt 1260
catgattttt ttgtttctgt tgcatagggg ttggtttgc ctttctctt atttcaatat 1320
atgccgtgca ctgtttgtc gggccatctt ttcattgctt ttttctctt ggttgggatg 1380
atgtggctcg gttgggcggg cgttctagat cggagtagaa ttctgctca aactacctgg 1440
tggatrratt aattttggat ctgtatgtgt gtgccatca tattcatagt tacgaattga 1500
agatgatgga tggaaatct gatctaggat aggtatacat gttgatgctg gttttactga 1560
tgcataaca gayatgctt ttgttctgt ggttgtgat atgtgggtg gttggggcgt 1620
cgttcattcg tctagatcg gagtagaata ctgtttcaaa ctacctggg tatttattaa 1680
ttttggaact gtatgtgtgt gtcatacatc ttcatagtta cgagttaag atggatggaa 1740
atatcgatct aggatagga tacatgttga tgtgggrrtt actgatgcat atacatgatg 1800
gcataatgag catctattca tatgetctaa ccttgagtac ctatctatta taataaaca 1860
gtatgtttta taattatttt gatcttgata taactggatg atgcatatg cagcagctat 1920
atgtggaltt ttttagcctt gccctcacac gctatttatt tgcttggtag tgttctttt 1980
gtcgatgctc accctgrrgt ttggtgttac ttctgcaggg atccccgac atgcaaaaac 2040
tcattaaact agtgcaaaac tatgcctggg gcagcaaac ggcgttgact gaactttatg 2100
gtatggaaaa tccgtccagc cagccgatgg ccgagctgtg gatgggcgca catccgaaaa 2160
gcagttcacg agtgagaat gccgcggag atatcgtttc actgcgtgat gtgattgaga 2220
gtgataaatc gactctgctc ggagaggccg ttgccaaatg ctttggcga ctgccttccc 2280
tgttcaaagt attatgcga gcacagccac tctccattca ggttcatcca aacaaacaca 2340
attctgaaat cggttttgct aaagaaaatg ccgcaggtat cccgatggat gccgccgagc 2400
gtaactataa agatcctaac cacaagccgg agctggtttt tgcgctgacg cctttccttg 2460

```

```

cgatgaacgc gtttcgtgaa ttttccgaga ttgtctccct actccagctg gtcgcaggig 2520
cacatccggc gattgctcac tttttacaac agcctgargc cgaacgttta agcgaactgt 2580
tcgccagcct gttgaatatg caggggtgaag aaaaatcccg cgcgctggcg attttaaaat 2640
cggccctcga tagccagcag ggtgaaccgt ggcaaacgat tcgtttaatt tctgaatttt 2700
acccggaaga cagcggctctg tictccccgc tattgctgaa tgtggtgaaa ttgaaccctg 2760
gcgaagcgat gttcctgttc gctgaaacac cgcacgctta cctgcaaggc gtggcgctgg 2820
aagtgatggc aaactccgat aacgtgctgc gtgcgggctc gacgcctaaa tacattgata 2880
ttccggaact ggttgccaat gtgaaattcg aagccaancc ggctaaccag ttgtygacct 2940
agccggtgaa acaagggtgca gaactggact tcccgatccc agtgatgat tttgccttct 3000
cgctgcatga cctfagtgat aaagaaacca ccattagcca gcagagtgcc gccattttgt 3060
tctgcgtcga aggcgatgca acgttgtgga aaggttctca gcagttacag cttaaaccgg 3120
gtgaatcagc gtttattgct gccaacgaat caccggtgac tgtcaaaaggc cacggccgtt 3180
tagcgcgtgt tiacaacaag ctgtaagagc ttactgaaaa aattaacatc tcttgctaag 3240
ctgggagctc gatccgtcga cctgcagatc gttcaaacat ttggcaataa agtttcttaa 3300
gattgaatcc tgttgccggg ctggcgatga ttaatcatata atttctgttg aattacgtta 3360
agcatgtaat aattaacatg taatgcatga cgttatitat gagatgggtt tttatgatta 3420
gagtccccga attatacatt taatacgcga tagaaaaaaa aatatagcgc gcaaacctagg 3480
ataaattatc gcgcgcggty tcatctatgt taetagarct getagccctg caggaaattt 3540
accggtgccc gggcgccag catggccgta tccgcaatgt gttattaagt tgtctaagcg 3600
tcaatrtgtt tacaccacaa tatattcaag tcatctgcat gtgaaataaa catctgtgcc 3660
ctcctegatg atccacctct ctctctctct ctctctctct ctctctctct ctctctctct 3720
ctcatgctca attgctcatg catatgcacg cgcgcgtttg ctgcccatt gtttgtttgc 3780
ttttgctrit atgttcgate gatggatgta tgtgtatata ggcgagaagg ggcaccagct 3840
gctgcatgcc tgtttcttac agtcttgrat tgtatgcatg caaadagagag aagctagact 3900
agaccagaca acactagcga ttctgacagg ctgaertttg agc 3943

```

<210> 45

<211> 26

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador Direto Es3272-5'

<400> 45

tcctcagacc agattctctt ttatgg

26

<210> 46

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador Reverso Es3272-5'

<400> 46

cgtttcccg cttcagttta

20

<210> 47

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sonda Es3272-5'

<400> 47

actgctgacg cggccaasaca ctg

23

<210> 48

<211> 27

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador ESPCR0026

<400> 48

catgatgagt gctgatgag ggctctt

27

<210> 49

<211> 28

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador Reverso ESPCR0004

<400> 49

gtatgatctc ggcgatgactc accgtgtt

28

<210> 50

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador Direto Zm Adh1

<400> 50

cgtcgtrtcc catctcttcc tcc

23

<210> 51

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador Reverso Zm Adh1

<400> 51

ccattccgag accctcagtc

20

<210> 52

<211> 27

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sonda Zm Adh1

<400> 52

aatcagggct catctctcgc ctctca

27

Lisboa, 27 de abril de 2018

REIVINDICAÇÕES

- 1.** Uma molécula de ácido nucleico isolada que liga uma molécula de ADN heterólogo ao genoma da planta de milho no evento de milho 3272 que consiste em pelo menos uma sequência de nucleótidos de junção do evento de milho 3272 selecionada do grupo que consiste na SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2, em que a sequência de junção abrange a junção entre o ADN heterólogo que compreende a cassete de expressão inserida no genoma do milho e ADN do genoma do milho que flanqueia o sítio de inserção.
- 2.** Um amplicão que compreende a molécula de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 1.
- 3.** Um par de iniciadores polinucleotídicos que compreende um primeiro iniciador polinucleotídico e um segundo iniciador polinucleotídico que atuam conjuntamente na presença de um modelo de ADN do evento de milho 3272 numa amostra para produzir um amplicão diagnóstico do evento de milho 3272, em que o primeiro iniciador é um iniciador de sequência flanqueadora compreendendo uma sequência de nucleótidos que compreende pelo menos 10 nucleótidos contíguos das posições 1-1409 da SEQ ID NO: 3 ou um iniciador de sequência flanqueadora compreendendo uma sequência de nucleótidos que compreende pelo menos 10 nucleótidos contíguos das posições 322-1879 da SEQ ID NO: 4, em que o segundo iniciador compreende uma sequência de nucleótidos que compreende pelo menos 10 nucleótidos contíguos da sequência de inserto de ADN heterólogo adjacente à sequência de ADN flanqueadora genómica da planta apresentada na SEQ ID

NO: 3 das posições de nucleótidos 1410-1600 ou na SEQ ID NO: 4 das posições de nucleótidos 1-321, e em que o amplicão compreende uma sequência de nucleótidos selecionada do grupo que consiste na SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2.

4. Um método de detecção da presença de ADN correspondente ao evento de milho 3272 numa amostra biológica, o método compreendendo:

(a) contactar a amostra compreendendo ADN com um par de iniciadores que, quando utilizados numa reação de amplificação de ácido nucleico com ADN genómico do evento de milho 3272, produzem um amplicão que é diagnóstico do evento de milho 3272, em que o par de iniciadores é o par de iniciadores polinucleotídicos de acordo com a reivindicação 3;

(b) conduzir uma reação de amplificação de ácido nucleico, desse modo produzindo o amplicão, e

(c) detetar o amplicão;

em que o amplicão compreende uma sequência de nucleótidos selecionada do grupo que consiste na SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2.

5. Um método de detecção da presença de ADN do evento de milho 3272 numa amostra biológica, que compreende:

(a) contactar a amostra com uma primeira sequência de iniciador polinucleotídico e uma segunda sequência de iniciador polinucleotídico que atuam conjuntamente numa reação de amplificação de ácidos nucleicos na presença de um modelo de ADN do evento de milho 3272 para produzir um amplicão diagnóstico do evento de milho;

(b) conduzir uma reação de amplificação de ácido nucleico,

desse modo produzindo o amplicão, e

(c) detetar o amplicão;

em que

i) o amplicão compreende a SEQ ID NO: 1 e em que se utiliza um primeiro iniciador polinucleotídico selecionado do grupo que consiste na SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 45 e SEQ ID NO: 48 e um segundo iniciador polinucleotídico selecionado do grupo que consiste na SEQ ID NO: 16 até SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 46 e SEQ ID NO: 49, ou

ii) o amplicão compreende a SEQ ID NO: 2, e em que se utiliza um primeiro iniciador polinucleotídico selecionado do grupo que consiste na SEQ ID NO: 36 e SEQ ID NO: 42 e um segundo iniciador polinucleotídico selecionado do grupo que consiste na SEQ ID NO: 16 até SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 40 e SEQ ID NO: 41.

6. Um método de deteção de ADN do evento de milho 3272 numa amostra biológica, que compreende:

(a) contactar uma amostra que compreende ADN com uma sonda polinucleotídica que hibrida, sob condições de hibridação e lavagem de elevada estringência, com o ADN 3272 e que não hibrida, sob condições de hibridação e lavagem de elevada estringência, com ADN de uma planta de milho diferente de 3272, em que a sonda é derivada de uma molécula de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 1;

(b) sujeitar a amostra e a sonda às condições de elevada estringência, e

(c) detetar a hibridação da sonda com o ADN do evento 3272;

em que a sonda polinucleotídica compreende uma sequência de

nucleótidos seleccionada do grupo que consiste na SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2.

Lisboa, 27 de abril de 2018