

CAVELIER

ABOGADOS

EDIFICIO SISKI

CARRERA 4 No. 72 - 35

BOGOTÁ 8, COLOMBIA

WEB SITE: www.caveller.com

E-MAIL: caveller@caveller.com

TELEFONO: (57) (1) 347-3611

TELEFAX: (57) (1) 217-9211 (57) (1) 310-4995

Señora Jefe de la
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comer
E. S. D.

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 02049630 00000001 Folios: 89
Fecha (AMD): 2002-06-14 17:28:13
Tramite : 002 PATENTES 0 1 REGISTRADO 329 COMPLETADO
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Referencia : Expediente No. 02049630

Solicitante : MONSANTO TECHNOLOGY LLC

Asunto : Solicitud de patente para: "PLANTA
EVENTO DE ALGODÓN MON15985 Y
COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA DETECCIÓN
DEL MISMO"

Fecha de Solicitud : 11 de Junio de 2000

TRÁMITE : 002

EVENTO : 001

ACTUACIÓN: 329

1. Yo, Emilio FERRERO, obrando como apoderado del solicitante en el asunto antes identificado, presento junto con este escrito la traducción en español de la solicitud en referencia.
2. Atentamente solicito que se continúe con el trámite de esta solicitud.

Bogotá 14 JUN 2002
Señora Jefe;


EMILIO FERRERO
T.P.A No. 31.929

COLO 12746-801-002-1
MRE/ID-000007/WPC12746

NIT. 860.041.367-3

**EVENTO DEL ALGODÓN MON 15985 Y COMPOSICIONES Y METODOS
PARA LA DETECCIÓN DE ESTE.**

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional estadounidense 60/297,406, presentada en junio 12, 2001.

CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se encuentra en el campo de la biología molecular vegetal, y en particular con la protección de insectos y la reproducción de plantas, y esta dirigida a un evento de transformación novedoso de plantas de algodón, *Gossypium hirsutum*, que comprende una secuencia de polinucleotido insertada en un sitio específico dentro del genoma de una célula de algodón, dicha secuencia codifica una proteína inhibitoria de insecto lepidóptero Cry2Ab. Adicionalmente, la invención se relaciona con plantas de algodón derivadas de aquel evento de transformación y con ensayos para detectar la presencia del evento en una muestra.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

65
23
148

Esta invención se relaciona con un evento de una planta de algodón resistente al Lepidóptero previamente comercializada, conocida como MON531, que expresa una forma quimérica de una proteína inhibitoria de insectos CryIA. Las plantas de algodón son susceptibles a la infestación por insecto en todas las áreas del mundo en las cuales se cultivan las plantas. La tecnología de ADN recombinante se ha aplicado a las células de la planta de algodón durante aproximadamente una década, y las plantas de algodón que exhiben características mejoradas como resultado de la inserción de las secuencias de ADN heterólogo se han producido utilizando tecnología de ADN recombinante desde aproximadamente el inicio de los años 90. Algunas de las mejoras exhibidas por las plantas de algodón recombinantes incluyen tolerancia a los herbicidas, características de fibra mejorada, y resistencia a la insectación por insectos.

Las primeras plantas de algodón recombinantes protegidas de la infestación de insectos Lepidópteros fueron producidas, aprobadas por las agencias regulatorias para la distribución comercial, y subsecuentemente comercializadas en 1996. Estas plantas de algodón contenían una secuencia de ADN que codifica

una proteína inhibitoria de insectos lepidóptero Cry1A quimérico, primariamente en un evento MON531. Este trato particular, junto con una secuencia de DN ligada adyacente que codifica un marcador seleccionable, se ha transferido mediante reproducción convencional en un número de variedades de algodón, cada una de las cuales son particularmente adecuadas para la producción mejorada de algodón en diversos sitios geográficos a través del mundo. Estas variedades recombinantes han disfrutado de un tremendo éxito comercial por numerosas razones. Una razón es que la producción por acre de producción de algodón ha mejorado el promedio dramáticamente en razón de la infestación de insectos como resultado de la presencia de la proteína inhibitoria de insecto presente dentro de cada célula de planta de algodón. Otra razón principal del éxito comercial ha sido el trabajo y costo reducido debido a la reducción en la aplicación de pesticidas químicos requerida para proteger el cultivo de la infestación de insectos. Además, la reducción en aplicaciones pesticidas mejora la salud total del ambiente al evitar la aniquilación de los insectos o arácnidos y otras especies que no representan amenaza material para los cultivos en el campo, reduce la carga de toxinas de pesticidas químicos aplicada al ambiente,

le permite al finquero evitar los riesgos asociados con los efectos potencialmente dañosos de la exposición a pesticidas químicos.

Será pronto evidente que un producto con un rango más amplio de eficacia contra insectos sería deseable.

Mientras que se vería como simple del punto de vista de la técnica química proporcionar la combinación de proteínas inhibitorias de insectos para este propósito y posiblemente retardar o evitar la resistencia de toxinas desarrolladas por la población de insectos objetivos, en realidad el desarrollo de una planta que cumple estas características es todo problemática, y requiere un gran trato de los recursos, capacidad técnica, y experimentación de cierto error con el fin de obtener un evento de transformación de una planta recombinante simple que de cómo resultado una planta morfológicamente normal que exhiba la combinación deseada de proteínas inhibidores de insectos producidas en niveles suficientes y en momentos adecuados durante la estación de crecimiento de la planta y en los tejidos en los cuales se alimentan las especies de plagas objetivo.

Así, existe necesidad para el desarrollo y caracterización de plantas de algodón que exhiben las características de resistencia mejorada a los insectos como resultado de la frecuencia de dos o más proteínas inhibitorias de los insectos producida por secuencias de ADN incorporadas dentro del genoma de las células de la planta. Adicionalmente, sería deseable para los rasgos inhibitorios de insectos (i) segregarse independientemente una de la otra, (ii) no originar ningún efecto adverso a la fisiología y metabolismo de la planta, y (iii) tener poco o ningún efecto adverso sobre la producción o calidad de la fibra producida de dicha planta.

Es ventajoso ser capaz de detectar la presencia de un evento particular con el fin de determinar si la progenie de un cruce sexual contiene un transgén de interés. Además, un método para detectar un evento particular puede ser de ayuda para cumplir con las regulaciones que requieren la aprobación pre-mercadeo de las ventas de semillas para producir plantas de cosechas transgénicas y alimentos derivados de tales plantas, por ejemplo, o para el uso del monitoreo ambiental monitoreo de los rasgos del cultivo del campo, o monitoreo de

productos derivados de una cosecha de cultivo, así como también para el uso y el aseguramiento del cumplimiento de las partes sometidas a términos regulatorios y contractuales.

Es posible detectar la presencia de un transgen y desde cualquier método de detección de ácido nucleico conocido en la técnica incluyendo pero no estando limitado a la amplificación térmica (PCR™) o hibridización de ADN utilizando sondas de ácido nucleico. Típicamente, por razón de simplicidad y uniformidad de los reactivos y metodologías para el uso y la detección de una construcción de ADN particular que se ha utilizado para transformar varias variedades de planta, estos métodos de detección generalmente se enfocan sobre elementos genéticos frecuentemente utilizados, tales como, promotores, terminadores, genes guardadores, etc., en razón a que para muchas construcciones de ADN, la región de secuencia de codificaciones intercambiable. Como resultado, tales métodos pueden no ser útiles para discriminar entre eventos separados producidos de la misma construcción de ADN o construcciones muy similares. Estos métodos se pueden utilizar, sin embargo, si la secuencia de ADN cromosómico adyacente al ADN insertado

("flanqueo de ADN) es conocido. Un ensayo de amplificación térmica de evento específico (PCR™) se discute, por ejemplo, en Windels et al. (Med.Fac. Landbouww, Univ. Gent 64/5b:459-462, 1999), que identifican eventos de semilla de soya tolerante al glifosato 40-3-2 que utiliza un conjunto de iniciador de amplificación técnica que se extiende sobre la unión entre el inserto y el ADN de flanqueo. Específicamente, una secuencia que incluye el iniciador proveniente del inserto y una segunda secuencia que incluye el iniciador proveniente del ADN de flanqueo. Tal método fue también desarrollado para el evento MON531 y se somete a una solicitud de patente separada. Sería deseable tener tal método que detectara la presencia del nuevo evento de la presente invención aún en la presencia del evento MON531. Es estas y otras del avance ventajoso se han logrado con la presente invención.

RESUMEN DE LA INVENCION

El evento de algodón MON531, descrito atrás, se transformó una segunda vez con una construcción genética denominada PV-GHBK11 que comprende la secuencia de codificación para el Cry2Ab, una proteína inhibitoria de

insectos, y un evento de este esfuerzo de transformación ha sido seleccionado para introducción comercial potencial. Este se denomina como MON15985. En razón a que este es un evento de inserción, este segregará del gen cry1Ac insertado del MON531 en reproducción. Una línea de algodón que contiene solo la inserción de MON15985 se denomina como MON15985X. De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporcionan composiciones de materia para estas líneas de algodón. Estas semillas de algodón comprenden el evento de algodón MON15985 que fueron depositados en septiembre 29, 2000, en la "American Type Culture Collection" y se designaron con el número de acceso ATCC PTA-2516.

En otro aspecto de la invención, se suministran métodos para aceptar la presencia del evento MON15985. Se suministran secuencias de ADN que identifican las secuencias de ADN insertados y las secuencias de flanqueo de algodón nativo del MON15985. De estos iniciadores de secuencias de ADN se pueden designar para uso en un ensayo de diagnostico PCR. Iniciadores de ejemplos se proporcionan cuando son los ampliconos producidos mediante el uso de tales iniciadores cuando se amplifican en la presencia de ADN de MON15985.

Se debe notar que la detección de un diagnóstico de secuencia para la inserción de un evento de algodón MON15985 debe ser insuficiente para responder todas las preguntas acerca de una muestra de semilla particular. La línea de semilla denominada MON15985 contiene tanto aquella inserción como la previa identificada como MON531. De esta manera, en otro aspecto de la invención, se proporciona un método para distinguir entre el MON15985 y el MON15985X, una línea a la que le falta el evento MON531. El método utiliza una o más de los diagnósticos de secuencias previamente conocidas para el MON531.

Una secuencia de unión abarca aquí el punto en el cual el ADN insertado dentro del genoma se une al ADN proveniente del genoma nativo del algodón que flanquea el punto de inserción, la identificación o detección de una o de las otras secuencias de unión en el material genético de la planta que es suficiente para hacer diagnóstico de cualquier evento. Se incluyen las secuencias de ADN que abarcan las inserciones en el evento de algodón MON15985 y longitudes similares de ADN de flaqueo. Ejemplos de tales secuencias de diagnóstico

} obvio

son las secuencias de unión 20-mera de la SEC ID NO:14, SEC ID NO:15, SEC ID NO:16, SEC ID NO:17 y SEC ID NO:18; sin embargo, otras secuencias tan pequeñas como de 15 pares base que traslapan la las uniones de las inserciones de las señales de las inserciones y la secuencia geonómica también son diagnóstico y se pueden utilizar. La amplificación del ácido nucleico del ADN genómico del evento, que utiliza a los iniciadores suministrados aquí o designados por un experto en la técnica, producen un amplicon que comprende tales secuencias de ADN diagnóstico. Además, la detección de la unión de oligonucleotidos que se vienen específicamente a la secuencia de diagnóstico descritas aquí son también diagnósticos para el evento.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se suministran pares de iniciadores de secuencias de oligonucleotidos para distinguir el evento de algodón MON15985 del nativo , no transformado, y secuencias no alteradas. En particular, tales pares de iniciadores de secuencia de flanco comprenden dos moléculas de ácido nucleico aisladas seleccionadas de la SEC ID NO:11 o alternativamente la SEC ID NO:12, el amplicon del cual traslapará una o más secuencias de unión en el ADN

insertado, descritas con el numero de referencia 2, 4, 6, 9, y 11 de la figura 1. Por ejemplo, solo podían seleccionar un ácido nucleico aislado que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de aproximadamente 1-361 posiciones de pares base como se establece en la SEC ID NO:11 que proviene de la secuencia de ADN geonómica del algodón que flanquean extremo 5' de ADN insertado, descrito como referencia 1 en la figura 1, y al menos un ácido nucleico aislado que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos provenientes de aproximadamente 674-1361 posiciones de pares base como se establece en la SEC ID NO:11 que están dentro del ADN insertado, que se describen con el número de referencia 3 y parte del 5 en la figura 1. Los pares iniciadores adicionales útiles para analizar el evento de algodón MON15985 comprende al menos un ácido nucleico aislado de al menos 15 nucleótidos contiguos provenientes de 1-1885 de SEC ID NO:11 pareados con al menos un ácido nucleico aislado de al menos 15 nucleótidos contiguos provenientes de los nucleótidos 362-2267 de SEC ID NO:11 regresado por un experto en la técnica. Sin embargo Similarmente, los pares iniciadores que pueden de los nucleótidos 1-673 de SEC ID NO:12 y nucleótidos provenientes de los

nucleótidos 350-1361 de SEC ID NO:12, teniendo cada iniciador al menos 15 nucleótidos de largo.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporcionan conjuntos de iniciadores específicos que son útiles para la amplificación del ácido nucleico, por ejemplo. Específicamente, la SEC ID NO:26 y la SEC ID NO:27 son uno de tales conjuntos de iniciadores y se pueden utilizar para producir un amplicon que es diagnóstico para la presencia de ADN MON15985 del evento de algodón. La SEC ID NO:28 y la SEC ID NO:29 son otras de tales corrientes iniciadoras. En contraste, la SEC ID NO:26 y SEC ID NO:29 son capaces de producir un amplicon proveniente de muestras de ADN obtenidas de eventos de algodón diferentes al MON15985, y provenientes de genomas hemizigotos que comprenden la secuencia tipo silvestre en el cual la secuencia MON15985 integrada desde el genoma así como también la secuencia integrada MON15985 y dicho amplicon parecería ser diagnóstico para la ausencia del ADN insertado proveniente del evento del algodón MON15985 en una muestra, y no producir amplicon en una muestra que contiene ADN de aquel evento. Se debe tener precaución al interpretar tal resultado, sin embargo, y un experto en la técnica reconocería que cuando esta

presente como un miembro hemizigote de un par de cromosomas, el uso de la SEC ID NO:26 y la SEC ID NO:29 como herramienta de diagnóstico para probar un negativo o un positivo puede ser erróneo.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporcionan métodos para detectar la presencia del ADN correspondiente al evento de algodón MON15985 en una muestra. Tal muestra que comprende: (a) poner en contacto la muestra que comprende el ADN con un conjunto iniciador que, cuando se utiliza en una reacción de amplificación de ácido nucleico con el ADN genómico proveniente del evento de algodón MON15985, produce un amplicon que es diagnóstico para el evento de algodón MON15985, produce un amplicon que es diagnóstico para el evento de algodón MON15985; (b) desarrollar una reacción de amplificación del ácido nucleico, produciendo de esta manera el amplicon; (c) detectar el amplicon.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, los métodos para detectar la presencia de ADN que corresponden al evento de algodón MON15985 en una muestra, tales métodos comprenden: (a) poner en contacto la muestra que comprende ADN con una prueba que se

hibridiza bajo condiciones de hibridización severa con ADN genómico proveniente del evento de algodón MON15985 y que no se hibridiza bajo condiciones de hibridación severas con el ADN proveniente de una planta de control de algodón; (b) someter la muestra y probar las condiciones hibridización severa; y (c) detectar la hibridización de la prueba al ADN.

Otro aspecto de la presente invención son los métodos y composiciones para detectar la presencia del sitio objetivo, es decir, al menos una de las uniones, identificación a detención de las cuales se diagnosticaría para la presencia del ADN integrado con el genómico de la planta de algodón en el evento de algodón MON15985, en una muestra del ácido nucleico derivada preferida del genoma del evento de algodón MON15985, que utiliza una variedad del método de detección que incluyen el TAQMAN (Perkin Elmer) o metodología de fluoróforo /apagador relacionadas, amplificación térmica, reacciones en cadena de ligaza, hibridización del sur, métodos de ELISA y métodos de detección colorimétricos y fluorescentes. En particular, la presente invención proporciona juegos para la detección de la presencia de la secuencia objetivo, es decir, al menos una de las

secuencias unión en el evento de algodón MON15985, en una muestra que contiene ácido nucleico genómico proveniente del evento de algodón MON15985. El juego comprende al menos un polinucleotido capaz de unirse al sitio objetivo o sustancialmente adyacente al sitio objetivo y al menos unos medios para detectar la unión del polinucleotido al sitio objetivo. Los medios de detección se pueden seleccionar del grupo que consiste de métodos fluorescentes, quimioluminiscentes, colorimétricos, o isotópicos y se pueden acoplar, al menos, con métodos inmunológicos para detectar la unión. También se prevé un método que puede detectar la presencia de un sitio objetivo en una muestra, es decir, al menos una de las uniones del ADN inserto con el ADN genómico de la planta de algodón en el evento MON15985, tomando ventaja de dos o más secuencias del polinucleotido que juntas son capaces de unirse a la secuencia del nucleótido adyacente o dentro de aproximadamente 100 pares base, o dentro de aproximadamente 200 pares base, o dentro de aproximadamente 500 pares base, o dentro de aproximadamente 1000 pares base de la secuencia objetivo y se pueden extender una hacia la otra para formar un amplicon que contiene al menos el sitio objetivo.

El anterior y otros aspectos de la invención serán más evidentes de la siguiente descripción detallada y los dibujos que la acompañan.

DIBUJOS

La figura 1 es una representación gráfica de un alineamiento de secuencia para el ADN que está flanqueando las secuencias insertadas en las secuencias insertadas mismas, que incluyen un gen cry2Ab en el evento de algodón MON15985. El ADN inserto se describe como una simple hebra con 5' de la izquierda hacia 3' a la derecha. Las secuencias de ADN individuales identificadas aquí son etiquetadas como sigue: número de referencia 1 es el extremo 5' que flanquea la secuencia del genoma (SEC ID NO:19) Numero de referencia 2 es la secuencia de unión que traslapa la secuencia número de referencia de traslapo 1 y 3, una secuencia de diagnóstico como se establece en la SEC ID NO:14; el número de referencia 3 es una secuencia relacionada con el cloroplasto de ADN extraño SEC ID NO:20; el número de referencia 4 que es la secuencia de unión que traslapa las secuencias por el número de referencias 3 y 5, una secuencia de diagnóstico como se establece SEC ID NO:15;

el número de referencia 5 es un remanente a la secuencia del genoma del algodón (SEC ID NO:21); el número de referencia 6 es la secuencia de unión que traslapa la secuencia de los números de referencia 5 y 7, una secuencia de diagnóstico como se establece en la SEC ID NO:16; número de referencia 7 es una porción del extremo 5' de la secuencia intencionalmente insertada (SEC ID NO:22); el número de referencia 8 es una porción del extremo 3' de la secuencia intencionalmente insertada (SEC ID NO:23); el número de referencia 9 es la secuencia de unión que traslapa la secuencia de los numerales de referencia 8 y 10, una secuencia de diagnóstico como se establece en la SEC ID NO:17; el número de referencia 10 es otro remanente no insertado intencionalmente de la secuencia genoma del algodón (SEC ID NO:24); el número de referencia 11 es la secuencia de unión que traslapa la secuencia de los números de referencia 10 y 12, una secuencia de diagnóstico como se establece en la SEC ID NO:18; y el número de referencia 12 es la secuencia del genoma del algodón que flanquea la 3', como se establece en la SEC ID NO:25.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS MODALIDADES PREFERIDAS

El algodón, *Gossypium hirsutum*, ha sido genéticamente modificado para resistir las plagas de Lepidópteros, que tienen un impacto negativo sobre la producción del algodón. Esto se logró mediante la inserción de un primer cartucho de ADN que codifica la inserción de la proteína Cry1Ac proveniente del *Bacillus thuringiensis* y un segundo cartucho dado que codifica la proteína insecticida Cry2Ab proveniente del *Basillus thuringiensis*. Esta invención se relaciona preferiblemente con plantas, partes de plantas, plantas de progenie que contienen al menos la secuencia que comprenden el segundo cartucho de ADN, y con métodos y composiciones de material para el uso de la detección de la presencia de dichas secuencias en una muestra.

El primer cartucho de ADN se insertó dentro del genoma del cultivar de algodón Coker 312 a través de *Agrobacterium* sp que se transforma utilizando un segmento de ADN derivado del plasmido PV-GHBK04 (pMON10518 en la patente estadounidense No. 5,500,365) para producir el evento de algodón MON531, que reproducido con muchas diferentes variedades de algodón e introducido exitosamente en los mercados de algodón en todo el mundo. El evento de algodón MON531 se transformó utilizando

tecnología y aceleración de partículas con un fragmento de ADN lineal purificado con gel, es decir, el segundo cartucho indicado aquí y el anterior, proveniente del plasmido PV-GHBK11 (alternativamente denominado pB1579), que contiene el cry2Ab y las regiones que codifican la β -glucuronidasa (uidA). (John, M. E 1997. Cotton Crop Improvement Through Genetic Engineering. Critical Reviews in Biotechnology, 17(3): 185-208) El gel uidA se utilizó como un marcador seleccionable para ayudar en la identificación de células que contenían la región que codifica el cry2Ab. La región que codifica al cry2Ab derivado del plasmido PV-GHBK11 comprende el promotor (CaMV) 35S del virus del mosaico del coliflor con una región mejoradora duplicada (patente U.S 5,530,196; 5,424,200; y 5,359,142) operablemente conectada a una secuencia líder no traducida de una proteína de golpe de calor de petunia (PetHSP70-líder) operablemente conectada o unida al péptido de transito de cloroplasto N-terminal del gen EPSP de la Arabidopsis thaliana (AEPSPS/CTP2) (Van den Broeck, et. Al. 1985. Targeting of a foreign protein to chloroplasts by fusion to the transit peptide from the small subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase. Nature 313, 358-63.). Operablemente conectada o unida a una secuencia sintética que codifica

la proteína Cry2Ab (Widner, W. R. y Whiteley, H.R. 1990. Location of the Dipteran Specificity Region in a Lepidopteran-Dipteran Cristal Protein from *Bacillus thuringiensis*. J Bacteriol. 172, 2826-32) que esta operablemente conectada o unida a la región no traducida 3' del gen sintasa nopalina (NOS) de *Agrobacterium tumifaciens* que termina la trascripción y dirige la poliadenilación (Fraley, R.T., et. al. 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. Proc Natl Acad Sci U,S,A,, 80 (15), 4803-07). La región que codifica la β -glucuronidasa también es controlada por un promotor CaMV 35S mejorado y una secuencia de poliadenilación NOS 3'. La inserción del cartucho, o sustancialmente todo el cartucho, que contiene las secuencias que codifican el cry2Ab y el uidA dentro del evento de algodón MON531 dan origen a un evento designado como MON15985 que comprende tanto la secuencia que codifica el cry1A como también el cartucho que codifica la secuencia que codifica cry2Ab. El análisis genético del evento MON15985 ha demostrado que dos cartuchos insertados se encuentran en cromosomas diferentes y así se pueden segregar en la reproducción, los segregantes al lugar al genotipo del evento original MON531 así como también un segundo genético designado como MON15985X que comprende solo un cartucho insertado

simple que comprende el gen responsable para codificar la proteína cry2Ab. Es el evento de transformación el que da origen al genotipo del algodón MON15985 así como también al genotipo MON15985X que es la materia sujeto de esta invención.

Las siguientes definiciones y métodos se proporcionan para definir mejor la presente invención y para guiar aquellos de experticio ordinario en la practica de la presente invención. A menos que anote otra cosa; los términos deben ser entendidos de acuerdo con el uso convencional por aquellos expertos en la técnica relevante. Las definiciones de los términos comunes en biología molecular también se pueden encontrar en Rieger et al ., Glossary of Genetics: Classical and Molecular, quinta edición, Springer-Verlag: New York, 1991; y Lewin, Genes V, Oxford University Press: New York, 1994. La nomenclatura de las bases de ADN se establecen en 37 CFR § se utiliza 1822.

Que comprende

Como se utiliza aquí, la expresión, "que comprende" significa "que incluye pero no esta limitado a".

EVENTO

Como se utiliza aquí un "evento" transgénico se refiere a una planta recombinante producida mediante la transformación de células vegetales con ADN heterologos, es decir, una construcción de ácido nucleico que incluye un transgen de enteros, regeneración de una población de plantas que resultan de la inserción del transgen dentro del genoma de la planta, y la selección de una planta particular caracterizada por la inserción en una localización del genoma particular. El término "eventos" se refiere al transformante y la progenie originales del transformante que incluye el ADN heterólogo. El término "eventos" también se refiere a la progenia producida mediante cruce sexual entre el transformante y otra variedad que incluye el ADN heterólogo. Aun después de repetido el retro cruzamiento de un padre recurrente, el ADN insertado y el ADN de flaqueo proveniente del padre transformado esta presente en la progenie del cruce lo mismo que el sitio del cromosoma. El término "evento" también se refiere al ADN proveniente del transformante original que comprende el ADN inserto y la secuencia de flaqueo mediatamente adyacente al ADN inserto que se

esperaría fuera transferida a la progenie que recibe el ADN inserto incluyendo el transgen de interés como resultado del cruce sexual de una línea parental que incluye el ADN insertado (por ejemplo el transformante y la progenie originales que resultan de si mismas) y las líneas parentales que no contienen el ADN insertado.

Pruebas e iniciadores

Una "pruebas" es un ácido nucleico aislado el cual esta unido a una etiqueta convencional detectable a una molécula reportera, por ejemplo, un isótopo por radioactivo, ligando agente quimioluminiscente o enzima. Tal prueba es complementaria a una hebra de un ácido nucleico objetivo, en el caso de la presente invención, a una hebra de un ADN genómico proveniente de un evento de algodón MON15985 (sea de una planta de algodón o de una muestra que incluye el ADN del evento). La prueba de acuerdo con la presente invención incluye no solo ácidos deoxiribonucleicos o ácido sino también poliamida y otros materiales de prueba que se unen específicamente a la secuencia de ADN objetivo y se pueden utilizar para detectar la presencia de la secuencia de ADN objetivo.

Los "iniciadores" son ácidos nucleicos aislados que fortalecidos en un hebra de ADN objetivos complementario mediante hibridización de ácido nucleico para formar un híbrido entre el iniciador de la hebra de ADN objetivo, luego extendida junto con la hebra de ADN objetivo mediante una polimerasa, por ejemplo, una polimerasa de ADN. Los pares de iniciadores o conjuntos se pueden utilizar para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico, por ejemplo, mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCRTM), también conocida como métodos de amplificación térmica, y otros métodos de amplificación de ácido nucleico convencionales.

Las pruebas y los iniciadores pueden ser tan pequeñas como diez nucleótidos, pero son generalmente de 15 nucleótidos o más de longitud, preferiblemente 20 nucleótidos o más, más preferiblemente 25 nucleótidos, y más preferiblemente 30 nucleótidos o más. Tales pruebas e iniciadores hibridizan específicamente a una secuencia objetivo bajo altas condiciones de hibridización severa. Preferiblemente, las pruebas y los iniciadores de acuerdo con la presente invención tienen complementariedad de secuencia completa con la secuencia objetivo, aunque pruebas diferentes de la secuencia objetivo y que

requieren la capacidad de hibridizar las secuencias objetivo se pueden se pueden designar mediante métodos convencionales. Cualquier referencia a una secuencia específica para una prueba o iniciador de la secuencia de ADN incluye su secuencia complementaria.

Los métodos para preparar y utilizar pruebas e iniciadores se describen, por ejemplo, en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda ed., vol. 1-3, ed. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 (en lo sucesivo, "Sambrook et al., 1989"); *Currente Protocols in molecular Biology*, ed. Ausubel et al., Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York 1992 (con fechas periódicas) (en lo sucesivo, "usubel et al., 1992"); and Innis et al., *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press: San Diego, 1990. Los pares de iniciadores PCRTM se pueden derivar de una secuencia conocida, Por ejemplo al ignisar programas de computador destinados para este propósito tal como el Primer (versión 0.5, © 1991, Witehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA).

Los iniciadores y las pruebas basadas en el ADN de flanco las secuencias de inserto descritas aquí se pueden utilizar para confirmar (y, si es necesario corregir) las secuencias descritas mediante métodos convencionales, por ejemplo, al reclonar y secuenciar tales secuencias.

Hibridización de ácido nucleico; condiciones severas; específica.

Las sondas e iniciadores de ácido nucleico en la presente invención hibridizan bajo condiciones severas una secuencia de ADN objetivo. Cualquier hibridización de ácido nucleico convencional cuanto método de amplificación se puede utilizar para identificar la presencia del ADN proveniente del evento transgénico de una muestra.

El término "condiciones severas" que define funcionalmente con relación a la hibridización de una sonda de ácido nucleico a un ácido nucleico objetivo (es decir a una secuencia de ácido nucleico particular e interés) mediante el procedimiento

De hibridización específico discutido en Sambrook et al., 1989, a 9.52-955. Ver también, Sambrook et al., 1989 a 9,47-9,52 9.56-9.58; Kanehisa, Nucl. Acids Res. 12:203-213, 1984; y Wetmur y Davidson, J. Mol. Biol. 31:349-370, 1968.

En relación con la amplificación de la secuencia de ácido nucleico objetivo (por ejemplo, mediante PCRTM) utilizando un par iniciador de amplificación, "condiciones severas" son condiciones que le permiten al par iniciador hibridizar solo la secuencia de ácido nucleico objetivo a la cual el iniciador que tiene la correspondiente secuencia tipo silvestre (o su complemento) se uniría y preferiblemente producir un producto de amplificación único. El término "específico para(una secuencia objetivo)" indica que la sonda o el iniciador hibridiza bajo condiciones de hibridización severas solo la secuencia objetivo en una muestra que comprende la secuencia objetivo.

Amplificación del ácido nucleico

Como se utiliza aquí "el ADN amplificado" o "amplicon" se refiere al producto de amplificación del

ácido nucleico de la secuencia de ácido nucleico objetivo que es parte de una plantilla de ácido nucleico. Por ejemplo, para determinar si la planta de algodón que resulta de un cruce sexual contiene un ADN genómico de un evento transgénico proveniente de una planta de algodón puede ser sometido a una amplificación de ácido nucleico utilizando un par iniciador que incluye un iniciador derivado de la secuencia de flaqueo en el genoma de la planta adyacente al sitio de inserción del ADN heterólogo insertado y un segundo iniciador derivado del ADN heterólogo insertado para producir un amplicon que es diagnóstico para la presencia del evento (por ejemplo, el amplicon es de una longitud y tiene una secuencia que es diagnóstica para el evento). Alternativamente, un par iniciador se puede derivar De la secuencia de flaqueo sobre ambos lados del ADN insertado con el fin de producir un amplicon que incluye un inserto completo.

La amplificación del ácido nucleico se puede lograr mediante cualquiera de los varios métodos de aplicación de ácido nucleico conocidos en la técnica, que incluyen la reacción de cadena de polimerasa (PCR™). Una variedad de métodos de amplificación son conocidos en la técnica y son descritos, Inter. alia, en la patente estadounidense

No. 4,683,195 y 4,683,202 y en los protocolos PCR: A Guide to Methods and Applications, ed. Innis et al., Academic Press, San Diego 1990. Cualquier método bien conocido para la amplificación del ácido nucleico se puede utilizar en la práctica de la presente invención.

La secuencia del inserto del ADN heterólogo o secuencia de flanqueo proveniente de un evento de algodón MON15985 se puede verificar (y corregir si es necesario) al amplificar tales secuencias provenientes del evento que utiliza iniciadores derivados de las secuencias suministradas aquí seguidas por una secuenciación de ADN estándar.

Juego de detección.

Como se utiliza aquí, "juego de detección" se refiere a un juego utilizado para detectar la presencia o ausencia de ADN proveniente de un evento MON15985 en una muestra que comprende sondas de ácido nucleico e iniciadores de la presente invención, que hibridizan bajo condiciones severas a una secuencia de ADN objetivo, y otros materiales necesarios para posibilitar la hibridización del ácido nucleico o los métodos de

amplificación. Alternativamente, un juego de detección puede comprender materiales necesarios para posibilitar a un experto en la técnica desarrollar métodos similares a aquellos descritos en la solicitud internacional PCT WO 97/22719, incorporada aquí como referencia, para detectar la presencia o ausencia de ADN proveniente de un evento MON15985 en una muestra.

Ejemplo 1.

El algodón, *Gossypium hirsutum* ha sido genéticamente modificado para resistir las plagas de lepidópteros, que tienen un impacto negativo sobre la producción del algodón. Esto se logra como se indicó aquí mediante la inserción de un cartucho de ADN que codifica en la proteína cryAc insecticida proveniente del bacillus thuringiensis dentro del genoma del cultivar de algodón Coker 312 a través de la transformación del *Agrobacterium* sp que utiliza un fragmento del ADN derivado del plasmido PV-GHBK04 (pMON10518 en la patente estadounidense No. 5,500,365). Esta transformación da como resultado tres inserciones separadas dentro del genoma del algodón. La primaria, inserto funcional responsable por la expresión de la proteína cry1Ac en el evento del algodón 531

comprende el promotor 35S mejorado descrito anteriormente, la región codificante cry1Ac, y la secuencia de terminación unida a una secuencia que codifica un marcador seleccionable antibiótico. Un segundo inserto adyacente y e inmediatamente corriente arriba de la primer secuencia insertada comprende una región que codifica el CRY1Ac parcial y la secuencia de terminación. El tercer inserto comprende solo una secuencia de terminación parcial y ha sido mostrada para segregarse independientemente de las primeras dos secuencias indicadas anteriormente. La primera y las segundas secuencias insertadas están estrechamente unidas y por lo tanto no se segregan una de la otra. Los flancos de la secuencia del genoma del algodón los extremos 5' y 3' de todos los tres insertos. Por lo tanto, las seis únicas uniones del genoma/inserto del algodón fueron creadas como resultado del proceso de transformación. Cualquiera de las seis uniones puede ser analizada para determinar si el evento MON531 esta presente en una muestra de semillas de algodón.

El análisis molecular se desarrollo sobre el evento de algodón MON531 para definir el extremo de una de las inserciones de ADN transgen e identificar el ADN gnómico

del algodón que flanquea los insertos de ADN transgen. Los estudios que avanzan del genoma combinados con la secuenciación de nucleótidos produce las secuencias de ADN de dos de dichas uniones de genoma/inserto de algodón para el inserto primario SEC ID NO:1 y SEC ID NO:2 y sus complementos. Las secuencias de flaqueo y el diagnóstico de las secuencias del inserto para el MON531 fueron entonces identificadas como sigue: SEC ID NO:3, la secuencia del extremo 5' del inserto primario; SEC ID NO:4, la secuencia del genoma del algodón que flanquea el extremo 5'; SEC ID NO:5, la secuencia del inserto en el extremo 3'; y la SEC ID NO:6, la secuencia del genoma que flanquea ese extremo 3'. Como se discutió anteriormente, los iniciadores se pueden derivar de estas secuencias para utilizar métodos de amplificación de ADN. Los ejemplos de SEC ID NO:7 Y SEC ID NO:8. El SEC ID NO:9 es la secuencia de la sección del DNA que traslapa el ADN del genoma del algodón y un extremo del ADN insertado; la SEC ID NO:10 es la secuencia de una sección del ADN que traslapa el ADN del genoma del algodón y el extremo opuesto del ADN insertado.

Lo siguiente proporciona un ejemplo no limitante de cómo uno podría utilizar estas secuencias de ácido

nucleico novedosas para detectar el evento de algodón MON531 en una muestra, incluyendo la, línea de semilla denominada MON15985, y revisar su ausencia en la línea de semilla denominada MON15985X.

Aislamiento del ADN para análisis PCR™.

El ADN proveniente del evento de algodón MON531 se extrajo del tejido de la semilla. El ADN se extrajo tanto de los tejidos de semilla como de hoja provenientes de las sustancias de control (semilla de algodón no transgénica y tejido de hoja). El ADN proveniente de la semilla se aisló al procesar la semilla hasta convertirse en un polvo fino que utiliza un mezclador comercialmente disponible. Aproximadamente 2g de la semilla procesada se transfirió a un tubo cónico de 50n ml, y ~ 16 ml de amortiguador de extracción CTAB [1,5% (P:P)CTAB, 75 mM Tris-HCL pH 8.0, 100mM EDTA pH 8,0, 1,05 M NaCL y 0,75% (p:p)PVP (MW 40,000)] se agregaron a la semilla procesada. Las muestras fueron incubadas a 65° C durante aproximadamente 30 minutos con una mezcla intermitente y luego se le permitió enfriarse a su temperatura ambiente. Un volumen igual (~16 ml) de alcohol cloroformo: isoamilo (24:1 (v/v)) o cloroformo se agrego a las muestras a

temperatura ambiente. La suspensión se mezcló mediante inversión, y las dos fases se separaron mediante centrifugación a $\sim 16.000 \times g$ durante 5 minutos. La capa acuosa (superior) se removió utilizando una pipeta de transferencia y se ubicó dentro de un tubo cónico limpio de 50 ml. Aproximadamente UN volumen de 1/10 (~ 16 ml) de un amortiguador CTAB al 10% [10% (p:p) CTAB y 0,7 M de NaCl] se agregaron a la fase acuosa, que luego se mezcló mediante inversión. Las muestras se centrifugaron a ($\sim 16.000 \times g$ durante 5 minutos para separar las fases. La fase acuosa (superior) se removió, mezcló con un volumen igual (~ 15 ml) del amortiguador de precipitación CTAB [1% (p:p)CTAB, 50 mM Tris pH 8,0 y 10 mM EDTA pH 8,0] y se le permitió permanecer a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora. Las muestras se centrifugaron a $\sim 10.000 \times g$ hasta peletizar el ADN, el supernadante se decantó, y el glóbulo se disolvió en aproximadamente 2 ml de TE de sal alta [10mM Tris-HCL pH 8,0, 10 mM EDTA pH 8,0 y 1M NaCl] al incubar a $37^{\circ} C$ con girado suave durante aproximadamente 2 horas. La centrifugación se desarrollo $\sim 23.000 \times g$ hasta peletizar cualquiera de las impurezas remanentes. Se movió el supernadante, se ubicó en un tubo limpio de 15 ml, y aproximadamente 1/10 de volumen ($\sim 150 \mu$) de 3 M NaOAc, pH 5,2 y dos volúmenes

(~ 4 ml en relación con el supernadante) de etanol congelado al 100% que fueron agregados para precipitar el ADN. El ADN precipitado se devanó en un tubo microfugo que contenía aproximadamente 1 ml de 70% de etanol. El ADN se peletizo en un microfugo a una velocidad máxima (14.000 rpm) durante 5 minutos se seco, y se redisolvió en TE, pH 8,0 en un refrigerador a 4° C durante toda la noche.

El ADN genómico del algodón no transgénico utilizado como control se aisló del tejido de la hoja que se congeló en nitrógeno líquido y se molió hasta convertirse en un polvo fino utilizando un mortero y un macerados. Aproximadamente un g del tejido de hoja molido se transfirió a un tubo centrífugo de 13 ml y 6 ml de amortiguador de extracción [2,5 ml de amortiguador de extracción de ADN (350 mM de sorbitol, 100 mM Tris pH 7,5, 5 mM EDTA, 0,38% (P/v) de bisulfito de sodio), 2,5 ml de un amortiguador de lisis de núcleos (200 mM Tris pH 7,5, 50 mM EDTA, 2 M NaCl, 2% (p/v) CTAB), y 1 ML de sarcosilo (solución al 5% (p/v))] se agregó. Las muestras se incubaron a 65° C durante aproximadamente 30 minutos con una mezcla intermitente. Se agregaron cuatro y medio milímetros de alcohol y cloroformo: isoamilo (24:1 v/v)

a temperatura ambiente a las muestras. La suspensión se mezcló durante 2 3 minutos, y las dos fases se separaron mediante centrifugación durante 15 minutos a $\sim 2.00 \times g$ a 4°C . La capa acuosa (superior) se removió utilizando una pipeta de transferencia y se ubicó dentro de un tubo centrífugo de 13 ml. Cinco mililitros de isopropanol al 100% se agregaron, y los tubos se mezclaron mediante inversión para precipitar el ADN, el ADN precipitado se lavó en un tubo microfugo que contenía 500 μl de etanol al 70%, el ADN se peletizó en un microfugo a una velocidad máxima de (14.000 rpm) durante 2 minutos. El ADN se secó y se disolvió en un amortiguador TE en un refrigerador a 4°C durante toda la noche.

Verificación del PCRTM de uniones de genoma de inserto de algodón único en el evento de algodón MON531.

Las secuencias de ADN de cuatro uniones de genoma/inserto de algodón se identificaron utilizando el PCRTM basado en el "Universal Genome Walker KitTM" de acuerdo con el protocolo del fabricante seguido por secuenciación del nucleótido de los productos PCRTM. Luego, los ensayos PCRTM se desarrollaron utilizando un iniciador complementario al ADN genómico del algodón y otro

iniciador complementario al ADN del transgen insertado. Por ejemplo, un iniciador designado en el extremo 3' del primario, inserto funcional complementario a la secuencia del flaqueo genómico (por ejemplo SEC ID NO:6) pareado con un segundo iniciador en el extremo 3' del primario, inserto funcional complementario a la secuencia del transgen insertado (por ejemplo SEC ID NO:5). Los ensayos PCRTM se desarrollaron utilizando 10-100 ng de la plantilla de ADN geonómico del evento de algodón MON531 en un volumen de reacción de 50µ que contienen una concentración final de 1.1 mM Mg²⁺, 0,4 µM de cada iniciador, 200 µM de cada dNTP, y 2,5 unidades de polimerasa de ADN Taq. Las reacciones para los ensayos PCRTM se desarrollaron bajo las siguientes condiciones cíclicas: 1 ciclo a 94° C durante 3 minutos; 38 ciclos de 94° C durante 30 segundos, 60° C durante 30 segundos, 72° C durante 90 segundos; 1 ciclo a 72° C durante 10 minutos. Los productos PCRTM se separaron utilizando la técnica electroforesis con gel de agarosa, visualizada mediante manchado con bromuro de etidio sacado el gel, y sometido a secuenciación de ADN utilizando química de tinte terminador para confirmar las secuencias.

En el ejemplo anterior, como se esperaba, las reacciones de control sin el ADN de plantilla y el ADN de color negativo no transgénico coker 312 no generaron un producto PCRTM. Las muestras MON531 del evento de algodón generaron el tamaño esperado de los productos PCRTM DE 264 bp para la secuencia de flanqueo 3'. Por lo tanto, las secuencias de ácido nucleico novedosas y la unión del ADN insertado y el ADN geonómico de algodón en el evento de algodón MON531 son útiles para detectar el ADN derivado del evento de algodón MON531 en una muestra.

El MON531 en el trasfondo de la variedad coker 312 se cruzaron con a variedad DP50 (Delta & Pine Land Company) para producir una variedad que contiene el evento MON531 que codifica la proteína Cry1Ab, que se designó como DP50B.

EJEMPLO 2

Este ejemplo describió la producción de una planta de algodón transformada designada como MON15985 derivada del DP50B que contenía un evento de inserción adicional que codifica una proteína inhibitoria de insecto Cry2Ab y

el aislamiento y caracterización de las secuencias del ADN 5' y 3' que flanquean los extremos 5' y 3' del MON15985.

Las células vegetales DP50B objetivo se transformaron utilizando tecnología de aceleración de partícula con un segmento de ADN lineal derivado del plásmido PV-GHBK11. El segmento de ADN lineal se preparó mediante la digestión del plásmido PV-GHBK11 con la enzima de restricción KpnI, separación de los fragmentos del plásmido mediante electroforesis con gel de agarosa y aislamiento del segmento de ADN que contiene el cartucho que comprende la secuencia de codificación del cry2Ab y la secuencia de codificación del uidA (GUS). Ninguna estructura de plásmido está contenida dentro del segmento o secuencia aislada y purificada y preparada para el bombardeo del tejido de algodón. El cartucho de expresión consiste de una región de codificación cry2Ab regulada mediante un promotor expresable en planta CaMV 35S mejorado y una terminación de transcripción NOS3' de *Agrobacterium Tumefaciens* y la secuencia de poliadenilación. La secuencia de codificación del cry2Ab se designa para ser blanco de producto de expresión como una proteína precursora para importar cloroplasto en las

células vegetales (según se describe en la WO 0026371 y la solicitud de patente estadounidense serie N0. 09/186,002, presentada en noviembre 4, 19998, cuyos contenidos completos se incorporan aquí como referencia).

La variedad dl algodón DP50B se transformo con el cartucho de ADN descrito anteriormente mediante el bombardeo con partículas de oro recubiertas con ADN utilizando un método de descarga electrostática (John, M.E., Cotton Crop Improvement Through Genetic Engineering. Critical Reviews in Biotechnology, 17:185-208 (1997). Los deferentes eventos fueron tamizados para la eficacia contra plagas de insectos, fenotipo, y segregación genética para la expresión de la proteína Cry2Ab. Basado en estos criterios, se escogieron 6 líneas para caracterización adicional del evento de inserción. La mancha del sur fue utilizada como el método primario para evaluar la presencia de uno o más números de copias de inserción y complementariedad del evento de inserción. Una línea, 15985, se escogió para caracterización molecular completa del evento de inserción que se insertó en el genoma DP50B. El ADN que circunda el evento de inserción se aisló y se caracterizó.

Aislamiento del ADN que flanquea el evento de inserción: El ADN se extrajo de hojas jóvenes de algodón mediante un método Fito-Pure® modificado de Amersham que se designó para extraer ADN de las plantas con grandes cantidades de carbohidratos contaminantes. Con el fin de determinar la secuencia del ADN alrededor de la secuencia codificante cry2Ab insertada, el protocolo de Genome Walker® de Clone Tech, Inc. Se utilizó. Los fabricantes recomendaban condiciones que eran seguidas con solo una Modificación: en lugar de utilizar extracción con fenol para purificación del ADN después de la división de endonucleasa de restricción, el ADN se purificó con una columna de giro Qiagen QIAquick® de acuerdo con el manual de instrucciones del fabricante.

Las enzimas utilizadas para cortar el ADN geonómico antes de la ligazón del ligador fueron Dral, PvuII, Scal and StuI. Luego del procedimiento suministrado por Qiagen, se extrajo el ADN en 5 volúmenes de amortiguador PB, unido a la columna. Lavado con 0,75 ml de PE y luego eluido de la columna en 20 mL, 10mM Tris pH 8,5. Este ADN se utilizó entonces como fuente de las bibliotecas ligadoras. Las posiciones del iniciador fueron deliberadamente escogidas de los extremos de donde el ADN

fue linealizado para permitirle una cierta cantidad de supresión en su extremo. Los primeros iniciadores (SEC ID NO:30 y SEC ID NO:31) se designó para fortalecer las secuencias que eran únicas a la secuencia codificante cry2Ab en razón de la presencia de los elementos de ADN repetidos en el genoma del algodón. Los productos PCR™ resultantes se sometieron a una segunda reacción PCR™ utilizando iniciadores anidados directamente en forma adyacente a aquellos utilizados en la primera reacción (SEC ID NO:32 y SEC ID NO:33). Los parámetros PCR™ utilizados fueron aquellos recomendados por Clone Tech. Los parámetros de amplificación primaria fueron como sigue: 7 ciclos 94° C 2 seg, 72° C 3 min, 32 ciclos 94° C 2 seg, 68° C 3 minutos, y parámetros de amplificación secundaria fueron como sigue: 5 ciclos 94° C 2 seg, 72° C 3 min, 20 ciclos 94° C 2 seg, 68° C 3 minutos, y 68° C 4 minutos en el último ciclo. Todas las reacciones PCR™ se desarrollaron en una máquina Perkin-Elmer 9700.

Los productos PCR™ resultantes provenientes de la segunda amplificación se clonaron en el vector pBS(SK+)proveniente de Stratagene el cual había sido cortado con SmaI para generar un extremo despuntado y tratar con fosfatasa alcalina para evitar autoligación.

Los fragmentos de ADN que fueron generados en la reacción PCR™ secundaria se trataron con quinaza T4 de ADN para agregar un fosfato 5' y luego ligarla al vector de extremo despuntado bajo condiciones De ligación estándar.

Protocolo de Genome Walker®: Las reacciones de PCR™ secundarias utilizando los pares iniciadores anidados produjeron múltiples fragmentos sintetizados de ambos extremos 5' y 3'. Estos fragmentos independientes para el extremo 5' se clonaron y secuenciaron utilizando métodos bien conocidos en la técnica, mientras que dos fragmentos fueron clonados y secuenciados del extremo 3'. Para cada fragmento individual, al menos se obtuvieron dos clones independientes.

La secuencia de los clones de cada conjunto iniciador se comparó una con la otra. Las secuencias entre los clones respectivos se determinaron como siendo la misma, y conteniendo la misma unión de transgen de planta.

EJEMPLO 3

Este ejemplo ilustra como las secuencias de ADN de flanco del evento de inserción MON15985 se pueden utilizar para determinar sigosidad.

Diseño y desarrollo de un PCR™ basado en ensayos para homocigosidad del evento de inserción MON15985: La secuencia de ADN de las dos regiones de flanco del evento de inserción MON15985 se utilizaron para diseñar un ensayo de homocigosidad basado en PCR™. Tal ensayo sería considerado útil si fuera capaz de detectar tanto el evento de inserción MON15985 específico como el cromosoma tipo silvestre. Para ensayar la factibilidad de desarrollar un ensayo que también detecte el cromosoma tipo silvestre, se diseñaron iniciadores provenientes de la secuencia directamente adyacente al evento de inserción para ensayar si ellos pudieran ser utilizados para sintetizar un fragmento de ADN en algodón no transgénico así como también en la línea 15985. Los iniciadores escogidos fueron capaces de sintetizar el evento de inserción MON15985 total pero no se observó ningún producto en los controles no transgénicos. Estos resultados indicaron que el evento de inserción no era una simple ruptura en el ADN y la inserción de la secuencia de SADN del cartucho que codifica la proteína

Cry2Ab. Este resultado, sin embargo establecido que los dos extremos están de hecho conectados y flanquean un cartucho de gen intacto que contiene cry2Ab.

Los cebadores fueron diseñados para la secuencia de ácido nucleico que flanquea el extremo 3' del inserto para los fragmentos de amplificación por medio del protocolo Genome Walker® en librerías de enlaces hechos a partir de ADN de algodón no transgénico. Un fragmento de par de bases 620 fue clonado y secuenciado a partir de un algodón no transgénico. Esta secuencia fue entonces usada para diseñar los cebadores para el tipo silvestre de cromosoma que estaría presente en el individuo en el heterocigotodo. Varios conjuntos de cebadores fueron hechos y ensayados juntos para poder encontrar un conjunto que trabajara en una reacción única y siempre que no existieran bandas de antecedentes. Un conjunto de cebador que comprende la secuencia la SEC ID NO:34 (secuencia que flanquea la planta de algodón 3') y SEC ID NO:35 (secuencia que flanquea la planta de algodón 5') fue encontrada que producía un amplicon de par de base 800 a partir de un tipo silvestre, o un ADN de algodón no transgénico. Sin embargo, si por lo menos un inserto, está presente el cebador comprende la SEC ID NO:36 la

111

cual anillará en cry2Ab en las secuencias específicas de cry2Ab y genera un amplicon de 1,5 kb con un anillado de cebador en la secuencia de flaqueo de planta de algodón 3' (SEC ID NO:34). Por lo tanto, el ensayo resultante usando cebadores PCRTM comprende SEC ID NO:36, SEC ID NO:34, y SEC ID NO:35 como sigue: si un individuo es homocigoto para la inserción MON15985 en el evento entonces solamente una banda de 1,5 kb estaría presente; pero si es heterocigoto entonces una banda adicional de 0,8kb estaría también presente.

Juntas de estas bandas (1,5kb y 0,8 kb) fueron clonadas y secuenciadas para confirmar su identidad. La secuencia del ADN del fragmento de par base 800 generada en los individuos heterocigotados es idéntica a la secuencia del fragmento Genome Walker® generado por los cebadores tomados del extremo 3' y del ADN no transgénico.

Confirmación del PCRTM con ensayo de zigocidad: para verificar la precisión del ensayo de zigocidad una serie de experimentos fueron conducidos utilizando progenia transgénica homocigotada, heterocigotada y negativa del MON 15985.

R2:

Fenotipo: 15 plantas R2 individuales a partir de 3 genotipos R1 sospechosos fueron caracterizadas en cuanto a la presencia o ausencia de la proteína cry2Ab por medio de ELISA. Las plantas de interés que fueron positivas para el estudio incluyeron MON15985-2 y MON15985-34. La planta MON15985-71 fue identificada como negativa para la proteína cry2Ab.

R3:

Fenotipo: 15 semillas R3 individuales de cada una de las plantas R2 seleccionadas fueron plantadas en tarros de 4" y subsecuentemente tamizadas en cuanto a la presencia de la proteína cry2Ab a través del cualitativo de ELISA. Los resultados ELISA reportados para todas las plantas R3 de MON15985-2 fueron positivas, así dando a los padres R2 una designación de ser homocigotos para el gen cry2Ab. La progenia R3 de MON15985-34 fueron una mezcla de plantas positivas y negativas dando a la pariente R2 una designación de ser heterocigota para el gen cry2Ab. Todas las plantas R3 de MON15985-71 fueron negativas y confirmaron que la pariente R2 fue negativa también.

Genotipo: El ensayo de zigocidad con base en APCRTM fue llevado a cabo en cinco plantas R3 MON15985-2 y MON15985-71. Los cebadores y técnicas fueron utilizados como se describió previamente. Los resultados de este ensayo dio los patrones de bandas esperadas. Toda la progenie de MON15985-2 produjo solamente la banda única de 1,5 kb soportando los datos Elisa que, indicaron que la línea MON15985-2 es positiva homozigotoda para el gen cry2Ab. Toda la progenia de MON15985-71 produjo solamente la banda única de 0,8 kb encontrada en el tipo silvestre, soportando así los resultados Elisa al demostrar que esta línea es homozigotoda negativa para el gen cry2Ab. Cinco progenies de cada una de los catorce familias individuales R2 de MON15985-34 fueron tamizadas lo mismo que dando combinaciones de plantas homozigotodas, heterozigotodas y negativas.

R4:

Cinco plantas individuales de todas las tres poblaciones R3 se les permitió auto polinizarse y fueron cosechadas. Quince progenies R4 de cada una de las plantas R3 ensayadas por medio de PCRTM fueron plantadas

en tarros de 4" para confirmar los resultados sobre las plantas R3. Así, si los resultados en R3 PCR™ fueron homocigotados entonces todas las progenies R4 deberían ser homocigotadas, lo mismo que si los resultados en R3 por medio de PCRTM eran heterocigotados la progenie R4 debería ser una mezcla de plantas homocigotadas, heterocigotadas y negativas. Todas Las familias de progenie R4 suministraron los resultados esperados con base en el ensayo PCRTM en R3. Por lo tanto, los ensayos con base en PCR™ suministran un método durable para genotipiar plantas en cuanto a zigocidad.

EJEMPLO 4

Este ejemplo ilustra las secuencias de ADN flanqueadas en los extremos 5' y 3' del inserto en un evento de algodón MON15985.

El ADN de MON15985 fue extraído de tejido de hojas que fueron congeladas en nitrógeno líquido y molidas hasta un polvo fino usando un mortero y un martinete. Aproximadamente 1 g del tejido de hojas molido fue transferido a un tubo centrífugo de 13 ml y una carga de extracción de 6 ml [2,5 ml de carga de extracción de

ADN(350 mM de sorbitol, 100 mM de Tris pH 7,5 mM EDTA 0,38% (P/v) de bisulfito de sodio), 2,5 ml de carga de lisis de núcleo (200mM Tris pH 7,5, 50 mM EDTA, 2 M NaCl, 2% (p/v) CTAB), y un ml de sarcosil [5% (p/v) en solución]] las muestras fueron incubadas a 65° C durante aproximadamente 35 minutos. Cuatro y medio mililitros de cloroformo: alcohol isoamilo [24:1 (v/v)] a temperatura de cuarto fueron agregados a las muestras. La suspensión fue mezclada durante 2 o 3 minutos, y las dos fases fueron separadas por centrifugación durante 15 minutos a ~ 2000 x g a 4° C. La capa acuosa (superior) fue removida y colocada en un tubo centrífico de 13 ml. Cinco mililitros de 100% de isopropanol fueron agregados, y los tubos fueron mezclados por inversión para precipitar el ADN. El ADN precipitado fue bobinado en un tubo de micro fuga que contenía 500 µl de 70% de etanol. El ADN fue convertido en pepitas en un micro fuga a una velocidad máxima (14000 rpm) durante 2 minutos. El ADN fue secado y disuelto en carga de TE en una refrigeradora 4° C durante la noche.

El ADN tomado del control DP50 fue extraído a partir del tejido de semilla. El ADN de la semilla fue aislado por medio de procesar la semilla hasta convertirla en

polvo fino usando un mezclador disponible comercial. Aproximadamente 2 g de la semilla procesada fue transferido a un tubo cónico de 50 ml, y ~ 16 ml de carga de extracción de CTAB [1,5% (p/v)CTAB, de 75 mM Tris pH 8,0, 100 mM EDTA pH 8,0, 1.05 M de NaCl. Y 0,75% (p/v) PVP(MV 40000)] fueron agregados a la semilla procesada. Las muestras fueron encubadas a 65° C durante aproximadamente 30 minutos con mezclado intermitente y luego se les permitió enfriarse a temperatura de ambiente. Un volumen igual de(~ 15 ml) de cloroformo a temperatura ambiente: alcohol isoamilo [24:1(p/v)] fueron agregados a las muestras. La suspensión fue mezclada durante cinco minutos, y las dos fases fueron separadas por centrifugación a ~16000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. La capa acuosa (superior) fue removida y colocada en un tubo cónico de 50 ml limpio. Aproximadamente 1 /10 en volumen (~1,5 ml) de carga de CTAB al [10%(p/v)CTAB Y 0,7 M NaCl] y un volumen igual de cloroformo: alcohol isoamilo [24:1 (v/v)] fueron agregados a la fase acuosa, la cual fue entonces mezclada por inversión durante 5 minutos. Las muestras fueron centrifugadas a ~16000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente para separar las fases. La fase acuosa (superior) fue removida, mezclada, con un volumen

igual (~15 ml) de carga de precipitación CTAB [1% (p/v)] CTAB, 50mM Tris pH 8,0 y 10 mM EDTA pH 8,0] y se les permitió permanecer a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora. Las muestras fueron centrifugadas a ~10000 x g hasta volverlas pepitas del ADN, el sobrenadante fue decantado, y las pepitas fueron disueltas en aproximadamente 2 ml de TE de alta sal [10 mM Tris-HCL pH 8,0, 10 mM EDTA pH 8,0 y 1 M NaCL] por medio de incubar a 37° C con un batido suave durante aproximadamente 2 horas o por medio de asentarlos en un refrigerador a 4° C durante la noche. La centrifugación fue llevada a cabo ~23000 x g para peletizar cualquier impureza remanente. El sobrenadante fue removido, colocado en un tubo de 15 ml limpio, y aproximadamente 1/10 en volumen (~150 µl) de 3M NaOAc, pH 5,2, y 2 volúmenes (~4 ml relativo al sobrenadante) de 100% de etanol fueron agregados al precipitado de ADN. El precipitado de ADN fue bobinado dentro de un tubo micro fuga que contenía aproximadamente 1 ml de 70% de etanol. El ADN fue peletizado en un micro fuga a velocidad máxima (14000 rpm) durante 5 minutos secado, y redissuelto en TE, pH, 8 en un refrigerador a 4° C durante la noche.

El ADN de cada uno DP50 y MON15985 fue cuantificado antes de la iniciación del estudio dentro del estudio para el cual ellos fueron derivados. La cuantificación del ADN fue conducida usando un Fluorometro Hoefer DyNA Quant 200 usando un marcador de tamaño molecular IX de Boehringer Mannheim como un estándar de calibración de ADN.

El análisis PCR de la secuencia genómica de flanco del extremo 5' del inserto que codifica la proteína cry2Ab en el evento de algodón MON15985 fue llevada a cabo usando un cebador derivado de la secuencia de flanco genómico de 5' apareada con un segundo cebador localizado en el inserto de ADN cercano al extremo 5' en la secuencia de promotor CaMV 35S mejorada, abarcando una región de 1894 (SEC ID NO:26 Y SEC ID NO:27). El análisis PCR para la secuencia genómica que flanquea el extremo 3' del inserto que codifica la proteína cry2Ab en el evento de algodón MON 15985 se condujo utilizando un iniciador localizado en la secuencia de poliadenilación NOS 3' cerca al extremo 3' del inserto pareado con un segundo iniciador derivado de la frecuencia de flanco genómico 3', que abarca una región de 763 bp (SEC ID NO:28 Y SEC ID NO:29).

Los análisis PCR fueron conducidos usando ADN genómico del evento de algodón MON15985 o de la línea de algodón transgénica DP50. El análisis PCR fue conducido usando 35 a 50 ng del evento de algodón MON15985 o la línea no transgénica DP50 de la plantilla ADN genómica en una reacción en volumen de 50 μ l que contenía una concentración final de 1,5 mM Mg^{2+} , 0,2 μ M de cada cebador, 200 μ M de cada Dntp, Y ,5 unidades de platino de polimeraza de ADN Taq (Gibco BRL). Las reacciones para el extremo 5' del inserto fueron llevadas a cabo bajo las siguientes condiciones de ciclado: 1 ciclo a 94° C a durante 3 minutos ; 35 ciclos de 94° C durante 1 minuto, 56°C durante 1 minuto, 72°C durante 2 minutos; un ciclo de 72°C durante 10 minutos. Las reacciones para el extremo 3' del inserto fueron llevadas a cabo bajo las siguientes condiciones de ciclado: 1 ciclo a 94°C durante 3 minutos; 35 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 53°C durante 1 minuto, 72°C durante 45 segundos; 1 ciclo a 72°C durante 10 minutos. Los productos PCR fueron separados en un gel de agarosa al 1,0%. La electroforesis fue conducida durante aproximadamente 1,5 a 2 horas a 100 V y visualizado por el estañado de bromuro de etidio.

Los productos PCR de los tamaños esperados que contenían las secuencias de flanqueado de los extremos 5' y 3' del inserto que codifica la proteína Cry2Ab en el evento de algodón MON15985 generado con dos pares de cebadores fueron aislados por electroforesis de gel de 20 µl de los productos PCR sobre geles de agarosa al 1,0%. Los productos de PCR que representan las secuencias de flanqueado 5' o 3' fueron cortadas a partir de un gel y purificadas usando un kit QIAquick Gel Extracción (Qiagen) seguido por el procedimiento suministrado por el fabricante. Para ambos análisis, los productos PCR purificados fueron entonces secuenciados con cebadores PCR usando la química de tintura determinación. Debido a la longitud de los productos PCR, el secuenciado fue llevado a cabo tanto con los cebadores usados para generar los productos lo mismo que cebadores diseñados internamente a la secuencia amplificada.

Los análisis PCR fueron llevados a cabo sobre ADN genómico extraído del evento de algodón MON15985 y la línea de algodón no trasgénico DP50 para verificar las secuencia de flanqueado de ADN de los extremos 5' y 3' del inserto en el evento de algodón MON15985. La reacción de control no contenía ninguna plantilla de ADN lo mismo

que la reacción contenía un ADN de algodón no transgénico DP50 que no generó un producto PCR como se esperaba. El análisis PCR del evento de algodón MON15985 en el ADN generó el producto de tamaño esperado de 1984 bp representando la secuencia de flanco 5' y una porción del extremo 5' en el inserto que codifica la proteína Cry2Ab.

La reacción de control no contenía una plantilla de ADN lo mismo que la reacción que contenía el ADN de algodón no transgénico DP50 que no generó un producto PCR como se esperaba. El análisis PCR del evento de algodón MON15985 ADN generó el producto de tamaño esperado de 763 bp representando la secuencia de flanco 3' y una porción del extremo 3' del inserto. Estos resultados demostraron que un tamaño predicho del producto PCR es generado desde ambos extremos del inserto que codifica el Cry2Ab en el evento de algodón MON15985.

La secuencia de consenso representando la secuencia de ADN genómica de algodón que flanquea el extremo 5' del inserto, lo mismo que el ADN en el extremo 5' del inserto, esta representada por la sec id no:11. Los datos de secuencia de consenso del 5' contienen 1877 bp de ADN

que flanquea el inserto seguido por 390 bp de la secuencia del inserto que contienen el promotor CaMV 35S mejorado. Pares de base 362-750 muestran homología en el ADN de cloroplasto. La secuencia de consenso que representa la secuencia genómica de algodón que flanquea el extremo 3' del inserto, lo mismo que el ADN en el extremo 3' del inserto, se representa por la SEC ID NO:12. Los datos de secuencia de consenso 3' contienen 349 bp de la secuencia de inserto que contiene el extremo 3' del NOS de la secuencia de poliadenilación 3' y la secuencia de polienlazador seguida por 1012 bp de ADN de algodón genómico que flanquea el inserto. Las secuencias de consenso reportadas 5' y 3'' presentadas aquí son la combinación de reacciones de secuenciado múltiple y son más cortas que aquellas de los productos PCR usados para generar las secuencias. Estos datos delinear los extremos 5' y 3' del inserto en el evento de algodón MON15985 y muestran el ADN que inmediatamente flanquea el inserto en ambos extremos.

Estos datos demuestran que el evento de algodón MON15985 contiene un inserto de ADN único que contiene (1) una secuencia que codifica UidA (GUS) regulada por el promotor 35S CaMV mejorado (carente aproximadamente de

260 bp en el extremo 5') y la secuencia NOS 3' de poliadenilación; y (2) una secuencia de codificación que codifica el Cry2Ab regulado por el promotor 35S CaMV mejorado y la secuencia de poliadenilación NOS 3' (figura 1). El PCR y los análisis de secuencia llevados a cabo en este ejemplo confirman que la secuencia de los extremos 5' y 3' del inserto que codifica el Cry2Ab en el evento de algodón MON15985, y que verifica la secuencia del ADN genómica que flanquea los extremos 5' y 3' del inserto.

EJEMPLO 5

Este ejemplo ilustra las características físicas de las secuencias que flanquean el evento de algodón MON15895, y caracteriza la naturaleza y la localización física de las secuencias adicionales del ADN que flanquean los extremos 5' y 3' del ADN insertado en el evento de algodón MON15985. El ADN genómico fue analizado por medio del secado Southern para determinar el número de eventos de inserción, el número de copias del ADN insertado, la integridad de los promotores insertados, las regiones de codificación, y las secuencias de poliadenilación, y la presencia o ausencia de secuencias de estructuras de plasmidos. Todos los análisis fueron

llevados a cabo tanto con la línea de algodón DP50B (control) y con el evento producido MON15985 novedoso para caracterizar el ADN insertado novedoso. En adición, la secuencia de flanqueo del extremo 5' y del 3' "insert-a plant uniones" inserto a plantas" (previamente determinadas por el Genome Walking) fueron confirmadas por el PCR.

El plásmido PV-GHBK11, el plásmido de fuente, sirvió como la sustancia de referencia principal en estos análisis. El plásmido, mezclado con ADN de la sustancia de control DP50 fue usado como un indicador de tamaño y un control de hibridización positivo en el análisis de secado Southern. Adicionalmente, los marcadores de tamaño molecular de Boehringer Mannheim [Molecular Weight Markers II (23,1 Kb -0,6Kb) y IX (1,4 Kb-0,072 kb), catalogo # 236 250 y # 1449 460, respectivamente] y Gibco BRL [High Molecular Weight DNA Marker (48,5 Kb-8,3 Kb) y de escalera de 100 bp (2,1 Kb-0,1Kb), catalogo # 15618-010 y # 15628-019, respectivamente] fueron usados para las estimaciones de tamaño.

El ADN genómico del evento de algodón MON15985 protegido contra insectos fue digerido con una variedad

de enzimas de restricción y sometido a un análisis de hibridización de secado Southern para caracterizar la codificación ADN del Cry2Ab y el GUS integrado dentro del genoma del DP50B.

El ADN extraído del tejido de hoja fue utilizado para todos los análisis de este ejemplo excepto para aquellas muestras no transgénicas sobre la totalidad del cartucho de gen iudA en el ensayo de secado probado con la prueba de secuencia de poliadenilación NOS 3' que fue aislado de acuerdo con el método de Rogers y Bendich (1985). El tejido de hoja fue congelado en nitrógeno líquido y molido en polvo fino usando un mortero y un martinete. Aproximadamente 1 g del tejido de hoja molido fue transferido a un tubo centrífugo de 13 ml que contenía 6 ml de la carga de extracción [2,5 ml de carga de extracción ADN (350 mM de Sorbitol, 100mM Tris pH 7,5, 5 mM EDTA), 2,5 ml de carga de lisis de núcleo (200 mM Tris pH 7,5, 50 mM EDTA, 2 M NaCl, 2% CTAB), y 1 ml de sarcosil (solución al 5%)]. Las muestras fueron incubadas a 65°C durante aproximadamente 30 minutos con mezclado intermitente. Cuatro y medio milímetros de una mezcla de cloroformo: alcohol isoamilo (24:1) a temperatura ambiente fueron agregadas a las muestras. La suspensión

fue mezclada durante 2 a 3 minutos, y las dos fases separadas por centrifugación durante 15 minutos a $\sim 100 \times g$ a 4°C . La capa acuosa (superior) fue removida usando una pipeta de transferencia y colocada dentro de un tubo centrífugo de 13 ml. Cinco mililitros de 100% de isopropanol fueron agregados, y los tubos fueron mezclados por inversión para precipitar el ADN. El precipitado de ADN fue peletiado por centrifugación a $\sim 1000 \times g$ durante 5 minutos a 4°C . Las pepitas fueron lavadas con aproximadamente 1 ml de etanol al 70% y centrifugadas durante 5 minutos adicionales a más o menos $100 \times g$ a 4°C . Al ADN se le permitió cercarse a temperatura ambiente y fue redissuelto en TE a 4°C durante la noche.

El ADN genómico purificado fue cuantificado usando un Fluorómetro Hoefer DyNA QuantTM 200 (San Francisco, CA) con un marcador IX de peso molecular Weight Marker usado como estándar de calibración.

Aproximadamente 10 μ de ADN genómico para el ensayo y las líneas de control fueron usados para digerir la enzima de restricción. Durante la noche la digestión fue llevada a cabo a 37°C de acuerdo con los fabricantes de

protocolo según volumen total de 500 μ l usando 100 unidades de enzima de restricción. Algo de la digestión de control fue anulados con 5 o 10 pg de PV-GHBK11. Todas las enzimas de restricción fueron compradas de Boehringer Mannheim. Después de la digestión las muestras fueron precipitadas agregando un volumen de 1/10 (~50 μ l de NaOAc a 3M Y 2 volúmenes (~1 ml en relación con el volumen de digestión original) de etanol al 100%, seguido por incubación a menos 20°C durante por lo menos una hora. El ADN digerido fue pelletiado por centrifugación, lavado con etanol al 70%, secado al vacío durante 10 a 20 minutos, y redissuelto a temperatura ambiente sea en agua o en TE.

Los ADN digeridos fueron separados sobre 0,8% de geles de agarosa en una carga de TBE 1X. Una gran corrida y una corrida corta fueron llevadas a cabo para cada análisis de secado Southern. La corrida larga facilita mayormente la resolución de un ADN de peso molecular alto mientras que la corrida corta asegura que todos los ADN de peso molecular pequeño fueran retenidos sobre el gel. Las corridas tanto larga como corta involucraron una electroforesis de 4 a 6 horas a entre con 80-85 V y una corrida durante la noche (9 a 15 horas) a 35 38 v.

Después de la electroforesis, los geles fueron lavados con 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de bromuro de etidio durante 20 a 30 minutos y fotografiados.

El ADN del plásmido PV-GHBK11 fue aislado durante la noche con cultivos de *E. coli*. Las plantillas de prueba homólogas a la región de codificación cry2AB, región de codificación uidA, el promotor CaMV 35S mejorado, la secuencia de poliadenilización NOS 3' y la región completa de estructura fueron preparadas por PCR usando el PV-GHBK11 como plantilla.

Aproximadamente 25 ng de cada plantilla de prueba, excepto de la de secuencia de poliadenilización NOS 3', fueron marcadas con ^{32}P -dCTP usando un método de cebador aleatorio (RadPrime ADN Labeling System, Life Technologies). La secuencia de poliadenilización NOS 3' fue marcada usando PCR con una plantilla NOS 3' (15 ng), los cebadores específicos NOS 3' (0,25 μM), 1,5 mM MgCl_2 , 3 μM dATP, dGTP, y dTTP, 100 μCi de ^{32}P -dCTP y 2,5 unidades de polimeraza de ADN Taq en un volumen final de 20 μl . Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: 1 ciclo a 94°C durante 3 minutos; 5 ciclos a 94°C durante 45 segundos, 55°C durante 30 segundos, y 72°C durante 1

minuto; 1 ciclo a 72°C durante 10 minutos. La probeta radio marcada fue purificada usando una columna de Sefadex G-50 (Boehringer Mannheim).

Los análisis de secado Southern (Southern, 1975) fueron llevados a cabo estableciendo procedimientos, generalmente Maniatis Fritsch Sambrook (Cold Spring Harbor). Seguido de la electroforesis, el gel fue incubado en una solución de depurinización (0,125 N HCL) durante ~10 minutos seguido por una solución desnaturalizante 8°, 5 M NaOH, 1,5 M NaCL) durante aproximadamente 30 minutos, y luego una solución neutralizante (0,5 M Tris-HCL pH 7, 1,5 M NaCL) durante aproximadamente 30 minutos. El ADN de los genes de agarrosa fue transferido a membranas de nailon Hybond-N™ (Amersham) usando un Turboblotter™ (Schleicher & Schuell). El ADN se le permitió transferirse durante 4 horas durante la noche (en 20X SSC) y reticulado covalentemente con la membrana con un UV Stratalinker™ 1800 (Stratagene) posesionado por autoreticulación. Los secados fueron prehibridizados en un promedio de 2 horas en una solución acuosa de 0,5 M de fosfato de sodio 7% SDS (p/v), y 0,1 mg/ml DE tRNA de E. Coli. La hibridización con la probeta de radio marcada fue llevada

a cabo en una solución fresca de pre hibridización durante 14 a 21 horas aproximadamente 65°C. Las membranas fueron lavadas aproximadamente 4 veces en una solución acuosa de 0,1% (p/v) SDS y 0,1X SSC durante intervalos de 15 minutos a 65°C. Las exposiciones múltiples de los secados fueron generados usando Kodak Biomax MSTM film en conjunto con una pantalla de intensificación Kodak Biomax MSTM. Los secados fueron cortados por medio de incubar el secado con una SDS al 0,1% (p/v) hirviendo y permitiéndoselo enfriar a temperatura ambiente.

El número de inserto (el número de sitios de integración del ADN transgénico introducido novedosamente en un genoma de algodón) fue evaluado. El ensayo y el ADN de control fueron digeridos con la enzima de restricción ScaI, la cual no fractura dentro del segmento de ADN usado para la transformación. Esta enzima liberó un segmento que contenía el ADN insertado y adyacente al ADN genómico de la planta. Las muestras de la corrida corta del plásmido DP50 fueron también digeridas con XbaI para linearizar el plásmido. El secado fue probado con la referencia plásmido PV-GHBK11.

El número de copias del cartucho de transformación insertado dentro de cada locus fue determinado por la digestión del ADN genómico de ensayo con la enzima de restricción SphI, una enzima que corta solo una vez en el segmento del ADN lineal usado para generar el evento. El secado fue probado con el plásmido de referencia PV-GHBK11.

La integridad de la región de codificación cry2Ab fue determinada por la digestión con una enzima de restricción, NcoI, que fractura en los extremos 5' y 3' de la región de codificación cry2Ab. El secado fue probado con la longitud completa de la región de codificación cry2Ab.

La integridad del cartucho de codificación cry2Ab (el promotor CaMV 35S mejorado, la región de codificación cry2Ab, y la secuencia de poliadenilización NOS 3') fue accesada por digestión con la enzima de restricción BamHI que fractura en los extremos 5' y 3' de los cartuchos cry2Ab. El secado fue probado secuencialmente con cada elemento del cartucho.

La integridad de la región de codificación uidA fue determinada por la digestión con las enzimas de restricción EcoRI y BglII que fractura en los extremos 5' y 3' de la región de codificación uidA, respectivamente. El secado fue probado con la longitud completa de la región de codificación uidA.

La integridad del cartucho uidA (promotor CaMV 35S mejorado, región de codificación uidA, y secuencia de poliadenilización NOS 3') fue accesada por digestión con las enzimas de restricción de BamHI, y SphI que fracturan en los extremos 5' y 3' con el cartucho uidA. El secado fue probado secuencialmente con cada elemento del cartucho.

La región de estructura principal del plásmido esta definida como el fragmento de restricción KpnI de PV-GHBK11 que no fue usado para transformar la planta. Este consiste de un origen bacterial de replicación, ori-pUC, y el gen nptII bajo el control de un promotor bacterial. Para confirmar la ausencia de la estructura principal, el ADN genómico fue digerido con la enzima de restricción KpnI y probado con la longitud completa de la región de estructura principal.

La secuencia e las uniones ADN genómica inserto a planta 5' y 3' fueron determinadas como se describió anteriormente usando el kit Clontech's Universal Genome Walker™. Los cebadores fueron diseñados para verificar estas uniones por PCR. La unión 5' fue verificada usando un cebador diseñado para la secuencia de flanqueo genómico 5' apareada con un segundo cebador en el promotor CaMV 35S mejorado del gen uidA. La unión 3' fue verificada usando un cebador diseñado por la frecuencia del flanqueo genómica de 3' con un segundo cebador localizado en el gen cry2Ab. Los PCR fueron conducidos usando 100 ng de ADN genómico de hoja (1 a 2 µl) como una plantilla, 10 pmol de cada cebador 81 µl cada uno), y PCR Supermix (Gibco BRL cat n0. 10572-014) en un volumen de reacción de 25 µl. La amplificación de las reacciones fue llevada a cabo bajo las siguientes condiciones de ciclado: 1 ciclo de 94°C durante 3 minutos; 30 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 1 minuto, 72°C durante 2 minutos; 1 ciclo de 72°C durante 4 minutos. Los productos PCR fueron separados sobre un gel de agarosa al 1% en TAE al 1X y visualizados por manchado con bromuro de etidio.

Las muestras de ensayo y de ADN de control fueron digeridas con ScaI. El ADN de control DP50 partió con PV-GHBK11 que también fue digerido con ScaI. Ya que el ScaI no fractura dentro del plásmido, una segunda enzima, XbaI fue agregada para linearizar el plásmido. El plásmido fue linearizado para facilitar la migración a través del gel para servir como un estimador de tamaño preciso. El secado fue probado con PV-GHBK11 radiomarcado (figura 1), la fuente de plásmido para el segmento de ADN lineal usado en la transformación. La corrida larga de DP50 no produjo ninguna banda de base detectable. El plásmido PV-GHBK11 mezclado con la corrida corta DP50 produjo la banda de tamaño esperado en aproximadamente 8,7 KB, el tamaño del plásmido completo sin ninguna banda adicional. Las corridas larga y corta de DP50B produjeron dos bandas aproximadamente 22 Kb y 15 Kb (muy desvanecidas). Ya que estas bandas están presentes en ambos eventos MON15985 Y EL DP50B (MON531) de control ellos están considerados como bandas de fondo o de antecedente asociados con el evento MON531. Los MON15985 largo y corto cada uno producido sobre una banda no presente en ninguno de las pistas DP50 O DP50B en aproximadamente 9,3 Kb. Estos resultados sugieren que el evento MON15985 del algodón

contiene un segmento de ADN integrado localizado sobre un fragmento de restricción ScaI y 9,3 Kb.

El ADN genómico aislado del MON15985, DP50B, DP50 (control no transgénico) Y dp50 mezclado con un plásmido PV-GHBK11, ADN fueron digeridos con SphI. El secado fue probado con PV-GHBK11, el plásmido fuente para el segmento de ADN lineal usado en esta transformación. La corrida larga DP50 no produjo ninguna banda antecedente detectable. El plásmido PV-GHBK11 mezclado con DP50 en la corrida corta produjo las bandas de tamaño esperado en 3,9 y 4,8 Kb; una banda diluida adicional en 8,7 Kb en la pista 5 es presumiblemente debida al ADN de plásmido no digerido. Las corridas larga y corta del DP50B produjeron tres bandas en aproximadamente 6,4, 8,3, y 8,6 Kb. Ya que estas bandas están presentes en ambos eventos MON15985 y el DP50B de control ellos son considerados como bandas antecedentes asociados con el evento MON531. Las corridas larga y corta de MON15985 cada una produjo dos bandas no presentes en las pistas DP50 O DP50B en aproximadamente 2,3 Kb y 3,5 Kb. Debido a que la enzima SphI corta solamente una vez dentro del cartucho de transformación, el resultado sugiere que el MON15985 contiene una copia

del ADN integrado que produce estos dos fragmentos de restricción.

El ADN del ensayo, controles y control mezclado con el plásmido PV-GHBK11 ADN fue digerido con NcoI para liberar la región de codificación cry2Ab y acceder el estar intacta. El secado fue probado con una región de codificación cry2Ab de longitud completa. Como se espero, la corrida larga de control no transgénico DP50 y las corridas larga y corta de control DP50B no detectables no mostraron ninguna banda de hibridización detectable. El plásmido PV-GHBK11 mezclado con DP50 en la corrida corta produjo la banda esperada en aproximadamente 1,9 Kb que corresponde a la región de codificación cry2Ab completa. Tanto las corridas larga y corta del MON15985 también produjeron una banda de 1,9 Kb que corresponde al tamaño esperado de una región de codificación cry2Ab intacta. Este resultado establece que el evento MON15985 contiene la región de codificación CRY2Ab intacta sin ningún fragmento detectable adicional.

El ADN de los ensayos, y control mezclado con plásmido y con ADN de plásmido PV-GHBK11 fue digerido con BamHI el cual liberó la codificación de cartucho completa

Cry2Ab (por ejemplo la región de codificación cry2Ab, el promotor CaMV 35S mejorado, y la secuencia de poliadenilización NOS 3').

El secado fue probado con la región de codificación cry2Ab de longitud completa. La corrida larga de control no transgénico DP50 y la corrida larga y corta del DP50B no usaron ningunas bandas de hibridización detectables. El plásmido PV-GHBK11 mezclado con el DP 50 en la corrida corta produjo la banda esperada de 3,2 Kb que corresponde a la codificación Cry2Ab completa del cartucho. Tanto las corridas corta y larga del MON15985 produjo una banda en aproximadamente 4,0 Kb. Este resultado indica que el extremo 3' del cartucho de transformación perdió el sitio de restricción BmHI en el genoma de algodón. La secuencia 3' de la unión inserto a planta, previamente determinada por el genoma caminante, fue verificada por el análisis PCR. 66 pares de base el extremo 3' del cartucho de transformación fueron mostrados como que habían sido eliminados, incluyendo el sitio BamHI. Los nucleótidos eliminados no incluyen ninguno de la secuencia de poliadenilización NOS 3' asociada con el cartucho de codificación Cry2Ab, pero solamente con el ADN de enlace. Estos resultados establecen que el cartucho de

codificación Cry2Ab está intacto. No hay cartuchos parciales derivados de esa codificación Cry2Ab que fueran detectados.

El secado usado anteriormente fue cortado y reprobado con el promotor CaMV 35S mejorado de longitud completa. La corrida larga de DP50 no produjo ninguna banda antiantescendente detectable. El plásmido PV-GHBK11 mezclado con DP50 en la corrida corta produjo las bandas de tamaño esperadas en 5,5 y 3,2 Kb con ninguna banda adicional detectable. La corrida larga y corta de DP50B produjeron cinco bandas en aproximadamente 4,4, 5,3, 7,5, 9,4, y 22Kb. Ya que estas bandas están presentes tanto en el evento MON15985 y en el de control DP50B son consideradas como bandas antecedentes asociadas con el evento MON531. Los ensayos largos y cortos del MPN15985 ambos produjeron una banda en aproximadamente 4,0 Kb que no estaba presente ni en el DP50 ni en la pista DP50B. Esto corresponde al fragmento predicho para el cartucho de codificación Cry2Ab dado el resultado obtenido con la probeta de región de codificación cry2Ab. Una segunda banda en las pistas de MON15985 resultaron de la hibridización al promotor CaMV 35S mejorado asociado con el cartucho de codificación UidA (GUS) que estaba

predicho pero no aparente en las pistas de prueba. Los resultados de la prueba de secuencia de poliadenilización Nos 3', discutida mas abajo demuestra que el promotor CaMV 35S mejorado o la secuencia de este promotor asociada con el cartucho de codificación UidA esta presente, pero la manga 4,4 Kb co migra con una banda de antecedente 4,4 Kb y no es aparente. Ningún promotor extraño fue detectado.

El secado usado anteriormente fue recortado y reprobado con la secuencia de poliadenilización NOS 3' de longitud completa. La corrida larga DP50 no produjo ninguna banda trasfondo detectable. El plásmido PV-GHBK11 mezclado con la corrida corta DP50 produjo las bandas de tamaño esperadas en 5,5 y 3,2 Kb sin ninguna banda adicional detectable. La corrida larga y corta DP50B produjo una banda en aproximadamente 1,2 Kb. Ya que esta banda esta presente tanto en el evento MON15985 como en el DP50B de control es considerado como un antecedente asociado con el evento MON531. Los ensayos las corridas larga y corta MON15985 cada una produjeron dos bandas que no estaban presentes en el DP50 o en las pistas DP50B o en aproximadamente 4,0 y 4,4 Kb. La banda 4,0 Kb corresponde al fragmento predicho para el cartucho de

corta DP50 produjo la banda esperada de aproximadamente 1,9 Kb que corresponde a la región de codificación completa uidA. Tanto la corrida larga como corta del evento MON15985 ADN también produjo una banda de 1,9 Kb que corresponde al tamaño esperado de una región de codificación uidA intacta. Este resultado establece que el evento MON15985 contiene la región de codificación uidA intacta, sin ningún fragmento adicional detectado.

El ADN de la sustancias de ensayo y control fue digerido con BamHI y SphI para liberar el cartucho uidA completo (por ejemplo la región de codificación uidA, el promotor CaMV 35S mejorado, y la secuencia de poliadenilización NOS 3'). El plásmido PV-GHBK11 fue digerido con PstI y corrido en muestras de corrida corta DP50 después de la digestión (excepto para el secado de prueba de secuencia de poliadenilización NOS 3' el cual el plásmido fue digerido con BamHI y SphI). Esto fue hecho para mostrar el tamaño de un cartucho uidA de longitud completa e intacta.

El secado fue probado con la región de codificación uidA de longitud completa. Como se esperaba, la corrida larga de control no transgénico DP50 y las corridas larga

y corta DP50B de control no mostraron ningunas bandas de hibridización detectables. El plásmido PV-GHBK11 mezclado con la corrida corta DP50 produjo la banda esperada de 2,8 Kb que corresponde al cartucho uidA completo. Tanto las corridas larga y corta del MON15985 produjo una banda de aproximadamente 2,5 Kb. Este resultado indica que una porción del cartucho uidA no estaba presente. La unión inserto a planta 5' previamente determinada por el genoma caminante, fue verificada por análisis PCR. Esto había demostrado previamente que 284 bp de la porción 5' del cartucho de transformación fueron eliminados. Estos resultados establecen que el cartucho uidA le falta aproximadamente 260 bp de la secuencia de promotor 5' y 24 bp del ADN polienlazado derivado para el sitio de clonación múltiple del plásmido. Odell et al. (1985) mostró que tal determinación no debe afectar la iniciación de transcripción precisa. Ningún cartucho adicional parcial uidA fue detectado con la probeta de región de codificación uidA.

El secado usado anteriormente fue cortado y reprobado con el promotor CaMV 35S mejorado De longitud completa. La corrida larga DP50 no produjo ninguna banda de antecedentes. El plásmido PV-GHBK11 mezclado con la

corrida corta DP50 produjo las bandas de tamaño esperado en 1,5 y 2,8 Kb sin ninguna banda adicional detectada. Las corridas larga y corta DP50B produjeron 5 bandas en aproximadamente 4,3, 4,6, 5,0, 6,6, y 8,5 Kb. Ya que estas bandas están presentes tanto en el evento MON15985 y en el control DP50B son consideradas como bandas antecedentes asociadas con el evento MON531. los ensayos o corridas larga y corta MON15985 cada una produjeron dos bandas de aproximadamente 2,5 Y 1,0 Kb no presentes en las pistas DP50 o DP50B. La banda 2,5 Kb corresponde al fragmento pre dicho para el cartucho uidA. La banda de 1,0 Kb resulta del promotor CaMV 35S mejorado asociado con el cartucho de codificación Cry2Ab. Ningún promotoir extraño fue detectado.

El secado fue probado con la secuencia de poliadenilización NOS 3' de longitud completa. La corrida larga de DP50 no produjo ninguna banda de antecedente detectable. El plásmido PV-GHBK11 mezclado con la corrida corta DP50 produjo las bandas de tamaño esperadas en 3,8 y 2,2 Kb sin ninguna banda adicional detectada. En las corridas larga y corta del DP50B produjeron una banda en aproximadamente 1,2 kb. Ya que esta banda esta presente tanto en el evento 15985 y en el

de control DP50B se considera como antecedente asociado con el evento MON531. Las corridas larga y corta MON15985 cada una produjeron dos bandas no presentes en las pistas DP50 o DP50B en aproximadamente 2,5 y 2,3 Kb. La banda 2,5 Kb corresponde al fragmento predicho para el cartucho uidA. La banda de 2,3 Kb resulta de la secuencia de poliadenilización NOS 3' asociada con el cartucho de codificación Cry2Ab.

Estos resultados confirman que el cartucho uidA le falta aproximadamente 260 bp del extremo 5' del promotor CaMV 35S mejorado pero de otra manera esta intacto.

El ADN genómico aislado del evento MON15985, DP50B, DP50 (control no transgénico) y DP50 mezclado con plásmido PV-GHBK11 ADN fue digerido con KpnI. El secado fue probado con la secuencia de estructura completa. La corrida larga DP50 no mostró ningunas bandas de hibridización detectables. El plásmido PV-GHBK11 mezclado con el ADN DP50 produjo una banda del tamaño esperado de 2,6 Kb para la estructura completa. Las corridas larga y corta DP50B produjeron una banda única en aproximadamente 22Kb. Ya que esta banda esta presente tanto en el evento MON15985 y en el de control DP50B se considera que son

antecedentes asociados con el evento MON531. Las corridas larga y corta MON15985 contenían la banda de antecedente 22Kb sin ninguna hibridización adicional. Estos resultados establecen que el evento MON15985 no contiene ninguna secuencia de estructura de plásmido detectable.

El PCR fue llevado cabo sobre el ADN genómico para confirmar la unión inserto a planta en las secuencias en los extremos 5' y 3' del inserto MON15985. Como se esperaba, las muestras no transgénicas no llevaron a un producto PCR en el conjunto cebador 5' ni 3' que fue usado. La muestra DP50B usada como el control no produjo productos con ningún par de cebador como se esperaba. Un evento diferente preparado usando la misma construcción y seleccionando para la expresión de Cry2Ab, MON15813, tampoco produjo productos cuando cualquier conjunto de cebador fue usado. El ADN genómico MPN15985 produjo los productos de tamaño correcto cuando el extremo 5' usando pares de cebador y el extremo 3' con pares de cebador. Este análisis PCR confirmó que las secuencias de borde de 5' y 3' del MON15985.

El evento de algodón MON15985 protegido contra insectos fue producido por una tecnología de aceleración

de partículas usando un segmento de ADN de KpnI que contiene un cartucho que codifica Cry2Ab Y UidA. El evento MON15985 contiene un inserto de ADN único localizado sobre un fragmento ScaI en 9,3 Kb. Este insecto contiene una copia completa del cartucho insertado el cual le falta aproximadamente 20 bp en el extremo 5' del promotor CaMV 35S mejorado llevando la expresión de la secuencia de codificación UidA. El PCR fue usado para verificar las secuencias de unión 5' y 3' del inserto con el genoma de la planta lo mismo que el que este intacto los extremos 5' y 3' del inserto. El evento MON15985 no contienen ninguna secuencia de estructura de plásmido detectable resultante del evento de transformación. Con base en las enzimas usadas en este estudio, el patrón de restricción del inserto cry2Ac no ha cambiado por la inserción del ADN insertado que comprende la secuencia de codificación cry2Ab.

Así, la SEC ID NO:14, SEC ID NO:15, SEC ID NO:16, SEC ID NO:17 Y SEC ID NO:18 y las secuencias que comprenden estas secuencias, son diagnosticadas para la inserción que dio lugar o nacimiento al evento MON15985 del algodón. Con referencia a la figura 1, estas

secuencias se han referenciado con los números 2,4,6,9 y 11 respectivamente.

Todas las publicaciones y solicitudes de patentes mencionadas en esta especificación son indicativas del nivel de experticio de aquellos versados en la materia al cual esta invención pertenece. Todas las publicaciones y solicitudes de patentes que se han incorporado aquí como referencia al mismo grado que las publicaciones que cada publicación individual o solicitud de patente individual fueron indicadas específica o individualmente para ser incorporadas como referencia.

Aunque la anterior invención ha sido descrita en algún detalle por vía de ilustración y ejemplo para propósito de claridad y entendimiento, es obvio que ciertos cambio y modificaciones pueden ser practicados dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

174/147

REIVINDICACIONES

1. Una planta de algodón resistente a los insectos, o partes de ella, la semilla de dicha planta de algodón que tiene depositada dentro que esta depositada con la American Type Culture Collection bajo el número de deposito PTA-2516.

2. Una planta de algodón resistente a los insectos, o partes de ella en donde el ADN que tiene por lo menos una secuencia nucleotida seleccionada a partir del grupo de SEC ID NO:14, SEC ID NO.15, SEC ID NO:16, SEC ID NO:17, y SEC ID NO:18 forma parte del genoma de la planta.

3. Una planta descendiente de la planta de algodón resistente a los insectos de la reivindicación 1 en donde el ADN tiene por lo menos una secuencia de nucleótidos seleccionados a partir del grupo de SEC ID NO: 14, SEC ID NO:15, SEC ID NO:16, SEC ID NO:17, y SEC ID NO:18 forma parte del genoma De la planta.

4. La semilla de una planta de las reivindicaciones 1, 2 o 3.

5. Un método para producir una planta de algodón resistente a los insectos que comprende cultivar con una planta de cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, o 3, y seleccionar progenie por medio de analizar al menos una secuencia de nucleótidos seleccionada a partir del grupo de SEC ID NO:14, SEC ID NO:15, SEC ID NO:16, SEC ID NO:17, y SEC ID NO:18.

claridad

6. Una secuencia de ADN aislada comprende la SEC ID NO:14, la SEC ID NO:15, SEC ID NO:16, SEC ID NO:17, o SEC ID NO:18.

7. Una secuencia de ADN aislada comprende la SEC ID NO:26, SEC ID NO:27, SEC ID NO:28, SEC ID NO:29, SEC ID NO:30, SEC ID NO:31, SEC ID NO:32, SEC ID NO:33, SEC ID NO:34, SEC ID NO:35, o SEC ID NO:36.

8. Un par de secuencias de ADN aisladas, cada una comprende por lo menos 10 nucleótidos las cuales cuando se usan juntas en un procedimiento de amplificación de ADN producen un diagnostico amplicon para MON15985.

result

9. El par de secuencias de ADN aisladas de la reivindicación 8 en donde cada una es escogida de la SEC ID NO:11.

10. El par de secuencias de ADN aisladas de la reivindicación 8 en donde cada una es escogida de la SEC ID NO:12.

11. Un método para detectar la presencia de la inserción de MON15985 en el tejido de algodón comprende:

- (a) seleccionar un par de cebadores cada uno comprende por lo menos 10 nucleótidos de la SEC ID NO: o SEC ID NO:12 en donde cada miembro del par esta sobre lados opuestos de un diagnostico de secuencia para dicha inserción MON15985;
- (b) poner en contacto una muestra de dicho tejido de algodón con dicho par de cebadores;
- (c) llevar a cabo la amplificación de ADN y analizar para encontrar amplícon.

12. El método de la reivindicación 11 en donde dicho par de cebadores se selecciona a partir del grupo que

cl
a
al es
a ser...

consiste de SEC ID NO:26, SEC ID NO:27, SEC ID NO:28, SEC ID NO:29, SEC ID NO:30, SEC ID NO:31, SEC ID NO:32, SEC ID NO:33, SEC ID NO:34, SEC ID NO:35, y SEC ID NO:36.

13. Un método para detectar la presencia De la inserción MON15985 en el tejido de algodón comprende.

- (a) poner en contacto una muestra de dicho tejido de algodón con una probeta de polinucleótidos que hibridiza bajo condiciones de hibridización extrínseca con uno o más secuencias de ADN seleccionadas a partir del grupo que consiste de SEC ID NO:14, SEC ID NO:15, SEC ID NO:16, SEC ID NO:17, y SEC ID NO:18. SEC ID
- (b) Someter la muestra y la probeta a condiciones de hibridización extrínseca;
- (c) Analizar la hibridización de la probeta.

Ja

14. Un kit de detección de ADN que comprende una probeta de polinucleótidos que hibridiza bajo condiciones de hibridización extrínseca con una o más secuencias de ADN seleccionadas a partir del grupo que consiste de SEC ID NO:14, SEC ID NO:15, SEC ID NO:16, SEC ID NO:17, y SEC ID NO:18.

do.
cuales lo
sumados
lo por el
result.

15/8
151

15. Un kit de detección de ADN que comprende un par de cebadores cada uno de los cuales comprende por lo menos 10 nucleótidos de la SEC ID NO:11, SEC ID NO:12, en donde cada uno esta sobre lados opuestos de un diagnostico de secuencia para la inserción MON15985.

cla10/226
11/1360

16. El kit de detección ADN de la reivindicación 15 en donde dicho par de cebadores esta seleccionado a partir del grupo que consiste de SEC ID NO:26, SEC ID NO:27, SEC ID NO:28, SEC ID NO:29, SEC ID NO:30, SEC ID NO:31, SEC ID NO:32, SEC ID NO.33, SEC ID NO:34, SEC ID NO:35, y SEC ID NO:36.

RESUMEN

La presente invención suministra plantas de algodón, tejidos de algodón, y semillas de algodón que incluyen el evento MON15985, que confiere resistencia a los daños del insecto Lepidopteran. También se ha suministrado ensayos para detectar la presencia del evento MON15985 con base en la secuencia de ADN de la construcción recombinante insertada dentro del genoma de algodón que resultó en el evento MON15985 y/o las secuencias genómicas que flanquean el sitio de inserción.