

169



No. 08-125763- -00002-0000

Fecha: 2009-02-10 14:06:28 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 329 CTOINFORMACION Foliós: 66

FORMULARIO ÚNICO DE CORRECCIONES Y MODIFICACIONES

①

SOLICITUD DE:

☐

Corrección de Error Material

☒

Modificación a una solicitud

②

SOLICITANTE

Nombre: MONSANTO TECHNOLOGY, LLC

Dirección: 800 North Lindbergh Boulevard,
St. Louis, Missouri 63167,
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

Domicilio: St. Louis, Missouri,
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

Lugar de Constitución: ESTADOS UNIDOS
DE AMERICA

Teléfono:

Fax:

E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: MARGARITA CASTELLANOS A.

Dirección: CALLE 94A No. 7A-09

Teléfono: 610 74 20 Fax: 610 07 06

E-mail: info@castellanosyco.com

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

39'779.654

TPA

70.819

④

Número de Expediente:

08.125.763

⑤

Descripción de la corrección o modificación solicitada:

Presento nueva descripción y capítulo reivindicatorio sobre el cual solicito que se realice el examen de patentabilidad.

⑥

Comprobante de pago No.

09 - 9,041

Fecha:

04/02/2009

⑦

Anexos:

☒

Comprobante de pago de la tasa.

☐

Poderes si fuere el caso, junto con la sustitución de los mismos a mi favor.

☐

Documento que acredita la existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas

☒

Nuevo capítulo reivindicatorio

⑧

NOMBRE: MARGARITA CASTELLANOS A.

FIRMA


CC 39'779.654 Usaquén - TPA 70.819 CSJ

10 FEB. 2009

1668
170

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 9,041
FECHA : FEBRERO 4 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-125763- -00002-0000

Fecha: 2009-02-10 14:06:28 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 329 CTOINFORMACION Folios: 66

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ALVARO CASTELLANOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	81240460	04/02/2009	10,982,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-03	CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA	
		12 MARCAS Y LEAS COMERCIALES	111,000.00
		TOTAL :	\$ 111,000.00

SON: CIENTO ONCE MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

**PLANTA Y SEMILLA DE MAÍZ CORRESPONDIENTES AL EVENTO
TRANSGÉNICO MON89034, Y MÉTODOS PARA SU DETECCIÓN Y USO**

REFERENCIA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica beneficio de prioridad sobre la Solicitud Provisoria
5 de los EEUU con N° de Acta 60/808834, presentada el 26 de Mayo de 2006.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se relaciona con el evento transgénico de maíz
MON89034, y con partes de plantas y semillas de éste. El evento presenta
resistencia a infestaciones de insectos del orden Lepidoptera. La invención
10 también se relaciona con métodos para usar plantas y semillas que comprenden
un ADN que sirve para diagnosticar la presencia del evento transgénico, cuando
se busca la presencia de secuencias de nucleótidos que son propias del evento
transgénico, y con métodos para detectar la presencia de dicho evento de maíz en
una muestra biológica mediante la detección de secuencias de nucleótidos
15 específicas, propias del evento transgénico. En la invención se proveen
secuencias de nucleótidos que son propias del evento.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Esta invención se relaciona con una planta de la variedad transgénica de
maíz (*Zea mays*) resistente a lepidópteros conocida en la presente documentación
20 como evento MON89034, y con secuencias de ADN propias de ella, que cuando
se detectan en cualquier muestra o variedad de maíz, sirven para diagnosticar la
presencia del evento transgénico de plantas de maíz MON89034 en dicha muestra
o variedad, y también se relaciona con la detección del transgen/la región de
inserción genómica en maíz MON89034, y en plantas de la progenie y semillas
25 derivadas de éste.

Las plantas del evento de maíz MON89034 son particularmente resistentes
a insectos del orden Lepidoptera. Tales como la oruga marchadora de otoño
(*Spodoptera frugiperda*), el taladro del maíz europeo (*Ostrinia nubilalis*), la oruga
de las mazorcas de maíz (*Helicoverpa zea*), el taladro del maíz del sur (*Diatraea*
30 *grandiosella*), la oruga cortadora negra (*Agrotis ipsilon*), y semejantes, todos los
cuales son insectos plaga de importancia agronómica.

El maíz es un cultivo importante y una fuente de alimento primaria en muchas áreas del mundo. Se han aplicado métodos de biotecnología al maíz con el fin de mejorar los caracteres agronómicos y la calidad del producto. Uno de estos caracteres agronómicos es la resistencia a insectos, por ejemplo, la resistencia introducida genéticamente a especies de lepidópteros y coleópteros que surge en plantas de maíz modificadas genéticamente, de modo que contengan uno o más genes que codifican agentes insecticidas (véase, por ejemplo, la Patente de los EEUU N° 6489542 y la Patente de los EEUU N° 6620988). Resulta ventajoso detectar la presencia de un evento transgénico particular en una muestra biológica para determinar si uno o más miembros de la progenie de un cruzamiento sexual contiene el material transgénico. Por ejemplo, la detección del evento en una muestra es importante para propósitos de licenciamiento, y para establecer y mantener estándares de pureza; es importante para cumplir con las agencias reguladoras, para satisfacer los lineamientos referidos a los ingredientes alimenticios, para usar en procedimientos legales para establecer que uno o más individuos o entidades particulares está usando el evento particular sin una licencia del usuario o una licencia sobre cualquier patente relacionada con el evento transgénico, y para asegurar el cumplimiento de diversas regulaciones y/o leyes gubernamentales.

Además, los métodos que permitan la detección de una planta particular serán útiles cuando se desee cumplir con las regulaciones que requieran una aprobación previa al mercadeo, al igual que la rotulación de los productos derivados de plantas de cultivo recombinantes. Los individuos o las entidades que son resistentes a la presencia de un evento transgénico en una muestra también se hallan en la búsqueda de métodos confiables para detectar la presencia del transgen en una muestra, con el fin de poder capitalizar su negocio, que se desarrolla merced a la ausencia de transgenes en sus productos.

A pesar de estas ventajas, es posible que los insectos puedan desarrollar resistencia a las plantas que solamente expresen una δ -endotoxina de *B. thuringiensis*. De dispersarse, esta resistencia limitaría claramente el valor comercial del germoplasma que contuviera los genes Bt individuales.

Una manera posible de incrementar la efectividad de los agentes insecticidas proporcionados por las plantas transgénicas y dirigidos al control de insectos plaga particulares, y al mismo tiempo reducir la probabilidad de surgimiento de insectos plaga resistentes a estos agentes insecticidas, comprendería asegurar que los cultivos transgénicos expresaran niveles elevados de estos agentes insecticidas, tales como las delta-endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* (McGaughey y Whalon (1992), Science 258:1451-55; Roush (1994) Biocontrol. Sci. Technol.. 4:501-516). Además, la disponibilidad de una reserva de genes insecticidas que sean efectivos contra grupos de insectos plaga, y que manifiesten sus efectos a través de modos de acción diferentes, podrá servir como protección contra el desarrollo de resistencia. El inicio de la resistencia podría ser sustancialmente demorado como resultado de la disponibilidad de un cultivo que expresara dos o más actividades insecticidas con toxicidades superpuestas para la misma especie de insecto. Un medio para obtener estos modos de acción dobles consistiría en proporcionar una planta que expresara un gen Bt tóxico para una especie de insecto particular, junto con un dsARN cuyo propósito fuera dirigir la supresión a un gen esencial de la misma especie de insecto atacada por la toxina Bt, donde el dsARN produciría una respuesta de ARNi al ser ingerido por la plaga objetivo, con lo que se dispondría de un medio redundante en el caso en el que el insecto desarrollara resistencia al dsARN o al gen Bt. Como alternativa, la co-expresión en una planta de dos o más toxinas insecticidas, ambas tóxicas para la misma especie de insecto, pero donde cada una presentara un modo de acción diferente en el desarrollo de su actividad insecticida, particularmente cuando ambas se expresaran a niveles elevados, proporcionaría un medio para realizar un manejo de resistencia efectivo. Los ejemplos de insecticidas de este tipo útiles en estas combinaciones incluyen, sin limitaciones, toxinas Bt, proteínas insecticidas de *Xenorhabdus sp.* o *Photorhabdus sp.*, proteínas y/o permutéinas de patatina desalergenizadas y desglicosiladas, lectinas vegetales, y semejantes.

Se sabe que la expresión de genes exógenos en plantas se ve influida por su posición en los cromosomas, tal vez debido a la estructura de la cromatina (por ejemplo, heterocromatina) o la proximidad de elementos de regulación de la

transcripción (por ejemplo, potenciadores) al sitio de integración (Weising et al. (19880 Ann. Rev. Genet 22:421-477). Por esta razón, comúnmente es necesario analizar una gran cantidad de eventos para identificar un evento caracterizado por la expresión óptima de un gen de interés introducido. Aún así, con docenas o aún
5 cientos de eventos transgénicos diferentes disponibles, no hay certeza alguna de éxito en la identificación de un evento transgénico individual que provea niveles de expresión óptimos de las al menos dos toxinas o agentes insecticidas diferentes, y que carezca de deficiencias agronómicas o efectos fitotóxicos indeseables, ya sea como resultado de la inserción en una región esencial o parcialmente esencial del
10 genoma de la planta, o como resultado de los efectos tóxicos provocados por los niveles de expresión de los transgenes. Por ejemplo, en plantas y otros organismos se ha observado que puede haber una amplia variación en los niveles de expresión de un gen introducido entre eventos. También puede haber diferencias en los patrones de expresión espaciales o temporales, por ejemplo,
15 diferencias en la expresión relativa de un transgen en diversos tejidos vegetales, que pueden no corresponder a los patrones esperados a partir de los elementos reguladores de la transcripción presentes en la construcción genética introducida. Por esta razón, es común producir entre cientos y miles de eventos diferentes, y analizar estos eventos en busca de un único evento que tenga los niveles y los
20 patrones de expresión transgénicos deseados para propósitos comerciales. Un evento que tiene los niveles o los patrones de expresión transgénica deseados es útil para introducir el transgen en otros fondos genéticos por exocruza sexual, usando métodos de cruzamiento convencionales. La progenie de dichos cruzamientos mantiene las características de expresión transgénica de la
25 transformante original. Esta estrategia se usa para asegurar una expresión genética confiable en una cantidad de variedades que están bien adaptadas a las condiciones de cultivo locales.

Es posible detectar la presencia de un transgen empleando un método conocido para la detección de ácidos nucleicos, tal como la reacción en cadena de
30 la polimerasa (PCR) o la hibridación de ADN usando sondas de ácidos nucleicos. Estos métodos de detección generalmente se centran en elementos genéticos de

uso común, tales como promotores, terminadores, genes marcadores, o aún la secuencia codificante que codifica la proteína o el dsARN de interés, expresada por el o los transgenes, etcétera. Como resultado, dichos métodos pueden no ser útiles para discriminar entre distintos eventos, particularmente aquellos producidos usando las mismas construcciones de ADN, a menos que se conozca la secuencia del ADN cromosómico adyacente al ADN insertado ("ADN circundante"). Dependiendo del método usado para introducir el o los transgenes en el genoma de la planta, pueden observarse efectos aberrantes o inusuales, que comúnmente complican severamente la identificación de las secuencias genómicas de la planta que rodean el ADN genómico que se desea introducir en la planta. Comúnmente, los cambios en la disposición del ADN insertado, el ADN genómico circundante o el ADN insertado y el ADN genómico circundante son prevalentes y complican el análisis del evento de inserción que se desea evaluar. Por lo tanto, resulta ventajoso disponer de un medio para seleccionar, identificar y asegurar la pureza y las características de un evento transgénico particular en una muestra, y la única manera de cumplir este objetivo es identificar una o más secuencias únicas asociadas solamente con el evento transgénico deseado, por lo que la presencia de estas secuencias en una muestra biológica que contiene ADN de la especie vegetal en la que se insertó el ADN sirve para diagnosticar la presencia del evento en dicha muestra.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con la planta transgénica de maíz denominada MON89034, y con una progenie que es indistinguible del evento de maíz MON89034 (en la medida en que también contiene al menos un alelo que corresponde al ADN transgénico insertado), cuya semilla ha sido depositada el 28 de marzo de 2006 en la Colección Americana de Tipos de Cultivo (ATCC) con el N° de Acceso PTA-7455. Otro aspecto de la invención se relaciona con las plantas de la progenie, con semillas o con partes regenerables de las plantas y las semillas del evento de maíz MON89034 que contienen un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4 y SEQ ID N° 5. En la invención también se incluyen partes de plantas

del evento de maíz MON89034 que incluyen, sin limitaciones, polen, óvulos, flores, brotes, tallos, barbas, espiguillas, mazorcas y hojas, siempre que estas partes contengan al menos los polinucleótidos detallados con anterioridad. Las composiciones genéticas novedosas halladas en el genoma de MON89034, y los
5 productos derivados de MON89034, tales como los alimentos, la harina, el aceite, la pulpa y la biomasa remanente en un campo con plantas de maíz correspondientes al evento MON89034 constituyen un aspecto de esta invención.

En la invención se provee una planta de maíz resistente a los insectos que tiene todas las características fisiológicas y morfológicas del evento de maíz
10 MON89034.

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporcionan composiciones y métodos para detectar la presencia del transgen/la región de inserción genómica de una nueva planta de maíz denominada MON89034. Se proporcionan secuencias de ADN que comprenden al menos una secuencia de unión de
15 MON89034 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N° 1 (localizada entre las posiciones 2051 y 2071 de SEQ ID N° 5) y SEQ ID N° 2 (localizada entre las posiciones 11295 y 11314), y complementos de éstas; donde una secuencia de unión abarca la unión entre el ADN heterólogo insertado en el genoma y el ADN propio de la célula de maíz que rodea el sitio de inserción, y sirve para
20 diagnosticar la presencia del evento (Figura 1). Un evento de maíz MON89034 y una semilla que comprende estas moléculas de ADN constituyen un aspecto de esta invención.

Las secuencias de ADN que comprenden el nuevo transgen/región de inserción genómica, SEQ ID N° 3 y SEQ ID N° 4 (Figura 1) del evento de maíz
25 MON89034 constituyen aspectos de esta invención. La planta y la semilla de maíz que comprenden estas moléculas también son aspectos de esta invención.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporcionan dos moléculas de ADN para usar en un método para detectar ADN, donde la primera molécula de ADN comprende al menos 11 o más polinucleótidos contiguos de
30 cualquier porción de la región transgénica de la molécula de ADN de SEQ ID N° 3, y la segunda molécula es una molécula de ADN de longitud similar de cualquier

porción de una región de ADN genómico de maíz circundante en el extremo 5' de SEQ ID N° 3, donde estas moléculas de ADN, cuando se usan combinadas, son útiles como cebadores de ADN en un método de amplificación de ADN que produce un amplicón. El amplicón producido usando estos cebadores de ADN en el método de amplificación de ADN sirve para diagnosticar la presencia del evento de maíz MON 89304 cuando el amplicón contiene SEQ ID N° 1. Todos los amplicones producidos con cebadores de ADN homólogos o complementarios con cualquier porción SEQ ID N° 3, y todos los amplicones que comprenden SEQ ID N° 1 constituyen un aspecto de la invención.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporcionan dos moléculas de ADN para usar en un método de detección de ADN, donde la primera molécula de ADN comprende al menos 11 o más polinucleótidos contiguos de cualquier porción de la región transgénica de la molécula de ADN de SEQ ID N° 4, y la segunda molécula es una molécula de ADN de longitud similar de cualquier porción de un ADN genómico de maíz circundante en el extremo 3' de SEQ ID N° 4, donde estas moléculas de ADN son útiles como cebadores de ADN en un método de amplificación de ADN. El amplicón producido usando estos cebadores de ADN en el método de amplificación de ADN sirve para diagnosticar la presencia del evento de maíz MON 89304 cuando el amplicón contiene SEQ ID N° 2. Todos los amplicones producidos con los cebadores de ADN homólogos o complementarios con cualquier porción de SEQ ID N° 4, y todos los amplicones que comprenden SEQ ID N° 2 constituyen un aspecto de la invención.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporcionan métodos para detectar la presencia de ADN que corresponde al evento de maíz MON89034 en una muestra. Estos métodos comprenden: (a) poner en contacto la muestra que comprende ADN con un conjunto de cebadores que, cuando se usa en una reacción de amplificación de ácidos nucleicos con ADN genómico de maíz del evento de maíz MON89034, produce un amplicón que sirve para diagnosticar la presencia del evento de maíz MON89034; (b) llevar a cabo una reacción de amplificación de ácidos nucleicos, con lo que se produce el amplicón; y (c)

detectar el amplicón, donde dicho amplicón comprende a la SEQ ID N° 1 o SEQ ID N° 2.

Una planta de maíz, una semilla o un producto derivado de la planta o la semilla de MON89034, donde el ADN genómico comprende una molécula de ADN que consiste esencialmente en SEQ ID N° 5, y complementos de ésta. Una planta

5 de maíz, una semilla o un producto derivado de la planta o la semilla de MON89034, donde el ADN genómico, cuando se lo aísla de la planta de maíz, la semilla o el producto, comprende una molécula de ADN que tiene incorporados los nucleótidos 2061 a 11305 de SEQ ID N° 5, y complementos de ésta.

10 Una planta de maíz, una semilla o un producto derivado de la planta o la semilla de MON89034, donde el ADN genómico, cuando se lo aísla de la planta de maíz, la semilla o el producto, produce un amplicón en un método de amplificación de ADN, donde las moléculas de ADN cebadoras de SEQ ID N° 6 y SEQ ID N° 7 se usan en el método de amplificación de ADN.

15 De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporcionan métodos para detectar la presencia de a ADN que corresponde al evento MON89034 en una muestra, donde estos métodos comprenden: (a) poner en contacto la muestra que comprende ADN con una sonda que hibridiza bajo condiciones de hibridación severas con ADN genómico del evento de maíz MON89034 y no hibridiza bajo

20 condiciones de hibridación severas con una planta de maíz control; (b) someter la muestra y la sonda a condiciones de hibridación severas; y (c) detectar la hibridación de la sonda con el ADN del evento de maíz MON89034, donde dicha sonda comprende a la SEQ ID N° 1 y SEQ ID N° 2.

Otro aspecto de la invención es un método para determinar la cigosidad de

25 la progenie de evento de maíz MON89034, que comprende: (a) poner en contacto la muestra que comprende ADN de maíz con un conjunto de cebadores que comprende SQ2842 (SEQ ID N° 6), SQ2843 (SEQ ID N° 7), SQ6523 (SEQ ID N° 10), SQ6524 (SEQ ID N° 11), PB880 (SEQ ID N° 14) y PB2931 (SEQ ID N° 15), que cuando se usan en una reacción de amplificación de ácidos nucleicos con

30 ADN genómico del evento de maíz MON89034, producen un primer amplicón que sirve para diagnosticar la presencia del evento de maíz MON89034, y (b) llevar a

cabo una reacción de amplificación de ácidos nucleicos, con lo que se produce el primer amplicón; y (c) detectar el primer amplicón; y (d) poner en contacto la muestra que comprende ADN de maíz con dicho primer conjunto, que cuando se usa en una reacción de amplificación de ácidos nucleicos con ADN genómico de plantas de maíz, produce un segundo amplicón que comprende el ADN genómico nativo de maíz homólogo a la región genómica de una inserción transgénica identificada como el evento de maíz MON89034; y (e) llevar a cabo una reacción de amplificación de ácidos nucleicos, con lo que se produce el segundo amplicón y (f) detectar el segundo amplicón; y (g) comparar el primer y el segundo amplicón en una muestra, donde la presencia de ambos amplicones indica que la muestra es heterocigota para la inserción transgénica.

Un aspecto de la invención comprende introducir en la dieta de un lepidóptero plaga una cantidad efectiva como insecticida del evento de maíz MON89034.

Otro aspecto de la presente invención comprende proporcionar una composición o una muestra biológica, bajo la forma de un producto comercial o un alimento que deriva del evento de maíz MON89034, donde el producto comercial o el alimento comprende mazorcas de maíz, maíz sin vaina, barbas de maíz, polen de maíz, maíz quebrado, masa de maíz, maíz triturado, harina de maíz, aceite de maíz, almidón de maíz, licor rebajado de maíz, malta de maíz, azúcar de maíz, jarabe de maíz, margarina producida a partir de aceite de maíz, aceite de maíz insaturado, aceite de maíz saturado, escamas de maíz, copos de maíz, etanol y/o licor producido a partir de maíz, o productos de maíz que comprenden ADN diagnóstico del evento de maíz MON89034, granos de destilería de maíz desecados con solubles (DDGS) producidos a partir de la fermentación de este evento de maíz, y alimentos para animales que comprenden estos DDGS y/o maíz, completo o no, quebrado o triturado, alimentos procesados, un cosmético y un agente de carga, donde se halla una cantidad detectable de un polinucleótido que sirve para diagnosticar la presencia del evento transgénico de maíz MON89034 en la muestra biológica. Un medio alternativo para proporcionar maíz como alimento comprende proporcionar maíz en diversas formas de granos para

la alimentación, tales como maíz completo, maíz quebrado, maíz triturado, y diversas de las formas anteriores en combinación con sorgo, sebo, mijo, girasol, avena, trigo, arroz, habas y semejantes. La aparición de cantidades detectables de una secuencia de nucleótidos en este producto comercial o alimento, tal como la que se detalla en SEQ ID N° 1 o SEQ ID N° 2, o complementos de ésta, sirve para diagnosticar la presencia de ADN del evento transgénico MON89034 en la muestra, y por consiguiente, la presencia de las células del evento transgénico que han originado el ADN en la muestra.

La descripción anterior y otros aspectos de la invención serán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada.

DIBUJOS

Figura 1. Organización del inserto transgénico presente en el genoma del evento transgénico de maíz MON89034. La abertura central o la barra blanca representa el ADN insertado. Debajo de la barra blanca hay un diagrama que representa los diversos elementos dentro del ADN insertado. Los extremos del ADN insertado han sido denominados arbitrariamente como 5' (del lado izquierdo de la Figura) y 3' (del lado derecho de la Figura). Las secuencias o los segmentos de Borde Derecho y Borde Izquierdo están rotulados debajo de cada extremo del diagrama en el que se ilustran los diversos elementos dentro del ADN insertado. En orden consecutivo comenzando desde el Borde Derecho, los elementos rotulados en los cassettes de expresión dentro del ADN insertado son los siguientes: promotor e35S, directriz no traducida de CAB de trigo, intrón de actina de arroz, secuencia codificante de Cry1A.105, secuencia de terminación y poliadenilación 3' HSP17 de trigo, promotor FMV, intrón hsp70, secuencia codificante del péptido de tránsito al cloroplasto de la subunidad pequeña de la rubisco, secuencia codificante Cry2Ab, secuencia señal de terminación y poliadenilación nos 3', y luego el Borde Izquierdo. Las barras con rayas verticales a ambos extremos de la barra abierta o blanca central corresponden a las secuencias circundantes de maíz denominadas arbitrariamente 5' y 3'. La línea negra más larga sobre las barras rayadas y la barra abierta o blanca representa SEQ ID N° 5 (la secuencia completa representada por la figura que ilustra la

secuencia circundante 5', la secuencia de ADN insertada, y la secuencia circundante 3'). Las líneas negras más cortas sobre y debajo de la línea indicada como SEQ ID N° 5 representan las posiciones aproximadas dentro de SEQ ID N° 5 donde puede hallarse cada una de las secuencias indicadas específicamente (es decir, SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3 y SEQ ID N° 4). SEQ ID N° 1 y SEQ ID N° 2, y cualquier secuencia derivada del evento de maíz MON89034 que contiene SEQ ID N° 1 y/o SEQ ID N° 2, sirven para diagnosticar la presencia de ADN del evento de maíz MON89034 en una muestra biológica.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Las siguientes definiciones y métodos se proporcionan para definir mejor la presente invención y guiar a aquellos entrenados en la técnica en la práctica de la presente invención. A menos que se indique lo contrario, los términos han de interpretarse de acuerdo con el uso convencional que le dan aquellos entrenados en la técnica. También pueden hallarse definiciones de términos comunes de biología molecular en Rieger et al., Glossary of Genetics: Classical and Molecular, 5ª edición, Springer-Verlag: Nueva York, 1991; y Lewin, Genes V, Oxford University Press: Nueva York, 1994.

Como se lo usa en la presente documentación, el término "maíz" significa *Zea mays* o maíz, e incluye todas las variedades de plantas que pueden cultivarse con maíz, incluyendo especies salvajes de maíz.

Como se lo usa en la presente documentación, el término "que comprende" denota "incluyendo, sin limitaciones".

Un "evento" transgénico se produce a través de la transformación de células vegetales con un ADN heterólogo, es decir, una construcción de ácidos nucleicos que incluye un transgen de interés, la regeneración de una población de plantas que resultan de la inserción del transgen en el genoma de la planta y la selección de una planta particular caracterizada por una inserción en un sitio particular del genoma. El término "evento" hace referencia a la transformante original y la progenie de la transformante que incluye el ADN heterólogo. El término "evento" también hace referencia a la progenie producida por un cruzamiento sexual entre la transformante y otra variedad que incluye el ADN

heterólogo. Aún después de una retrocruza repetida con un progenitor recurrente, el ADN insertado y el ADN circundante del progenitor transformado están presentes en la progenie del cruzamiento, en la misma localización cromosómica. El término "evento" también hace referencia al ADN de la transformante original que comprende el ADN insertado y la secuencia genómica circundante inmediatamente adyacente al ADN insertado, de la que se esperaría que se transfiriera a la progenie que recibiera el ADN insertado que comprende el transgen de interés, como resultado de un cruzamiento sexual de una línea progenitora que incluyera el ADN insertado (por ejemplo, la transformante original y la progenie resultante de la autocruza) y una línea progenitora que no contuviera el ADN insertado. La presente invención se relaciona con ADN del evento MON89034, y con células vegetales, tejidos, semillas y productos procesados derivados de MON89034.

También ha de comprenderse que es posible cruzar dos plantas transgénicas diferentes para producir una descendencia que contenga dos o más genes exógenos agregados de segregación independiente. La autocruza de la progenie apropiada puede producir plantas que son homocigotas para ambos genes exógenos agregados. Se contempla también la retrocruza con una planta progenitora y la exocruza con una planta no transgénica, al igual que la propagación vegetativa. Pueden hallarse descripciones de otros métodos de cultivo que se usan comúnmente para diferentes caracteres y cultivos en cualquiera de las diversas referencias, por ejemplo, Fehr, en *Breeding Métodos for Cultivar Development*, Wilcox J. editor, Sociedad Americana de Agronomía, Madison WI (1987).

Una "sonda" es un ácido nucleico aislado con el cual puede unirse o conectarse una marca convencional o una molécula informante detectable, por ejemplo, un isótopo radiactivo, un ligando, un agente quimioluminiscente o una enzima. Dicha sonda es complementaria con una secuencia dentro del ácido nucleico blanco, en el caso de la presente invención, con una secuencia de ADN genómico del evento de maíz MON89034, ya sea de una planta de maíz o de una muestra que incluya ADN del evento. Las sondas de acuerdo con la presente

invención no solamente incluyen ácidos desoxirribonucleicos o ribonucleicos, sino también poliamidas y otros materiales de sondas que se unen específicamente a la secuencia de ADN blanco y pueden usarse para detectar la presencia de dicha secuencia de ADN blanco.

5 Los "cebadores" son sondas aisladas de ácidos nucleicos que se alinean con una cadena de ADN blanco complementaria, a través de una hibridación de ácidos nucleicos, para formar un híbrido entre el cebador y la secuencia de ADN blanco, y luego se extienden a lo largo del ADN blanco debido a la acción de una polimerasa, por ejemplo, una ADN polimerasa. Los pares de cebadores de la
10 presente invención hacen referencia a dos o más secuencias cebadoras diferentes que se emplean en la amplificación de una secuencia de ácido nucleico deseada, por ejemplo, por medio de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otros métodos de amplificación de ácidos nucleicos convencionales.

Las sondas y los cebadores generalmente tienen aproximadamente 11
15 nucleótidos o más de largo, preferiblemente 18 nucleótidos o más, más preferiblemente 24 nucleótidos o más, y más preferiblemente 30 nucleótidos o más. Dichas sondas y cebadores hibridizan específicamente con una secuencia blanco bajo condiciones de hibridación de alta severidad. Preferiblemente, las sondas y los cebadores de acuerdo con la presente invención tienen una similitud
20 de secuencia completa con la secuencia blanco, aunque pueden diseñarse sondas que difieran de la secuencia blanco y retengan la capacidad de unirse a las secuencias blanco empleando métodos convencionales.

Los métodos para preparar y usar sondas y cebadores se describen, por ejemplo, en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, vol. 1-3, editado
25 por Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 (conocido de aquí en adelante como "Sambrook et al., 1989"); Current Protocols in Molecular Biology, editado por Ausubel et al., Greene Publishing y Wiley-Interscience, Nueva York, 1992 (con actualizaciones periódicas) (conocido de aquí en adelante como "Ausubel et al., 1992"); e Innis et al., PCR Protocols: A
30 Guide to Métodos and Applications, Academic Press: San Diego, 1990. Los pares de cebadores de PCR pueden derivar de una secuencia conocida, por ejemplo,

usando programas de computación diseñados para tal propósito, tales como Primer (Versión 0.5, © 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA).

Los cebadores y las sondas basadas en las secuencias de ADN y las
5 secuencias insertadas descriptas en la presente documentación pueden usarse para confirmar (y de ser necesario, corregir) las secuencias descriptas de acuerdo con métodos convencionales, por ejemplo, por medio de la re-clonación y la secuenciación de dichas secuencias.

Las sondas y los cebadores de ácidos nucleicos de la presente invención
10 hibridizan bajo condiciones severas con una secuencia de ADN blanco. Puede usarse cualquier método de hibridación o amplificación convencional para identificar la presencia de ADN de un evento transgénico en una muestra. Las moléculas de ácidos nucleicos, o sus fragmentos, pueden hibridizar específicamente con otras moléculas de ácidos nucleicos bajo determinadas
15 circunstancias. Como se lo usa en la presente documentación, se dice que dos moléculas de ácido nucleico pueden hibridizar específicamente entre sí si ambas moléculas pueden formar una estructura de ácidos nucleicos anti-paralelos de cadena doble. Se dice que una secuencia de nucleótidos es el "complemento" de otra secuencia de nucleótidos si presenta una complementariedad completa.
20 Como se lo usa en la presente documentación, se dice que las moléculas presentan una "complementariedad completa" cuando cada nucleótido de una de las secuencias es complementario con un nucleótido de la otra. Se dice que dos moléculas son "mínimamente complementarias" si hibridizan entre sí con suficiente estabilidad como para permanecer anilladas entre sí bajo al menos
25 condiciones convencionales de "baja severidad". De forma similar, se dice que las moléculas son "complementarias" si pueden hibridizar entre sí con suficiente estabilidad como para permanecer anilladas entre sí bajo al menos condiciones convencionales de "alta severidad". Se describen condiciones convencionales de severidad en Sambrook et al., 1989, y Haymes et al., en: Ácido nucleico
30 Hibridización, A Practical Approach, IRL Press, Washington, DC (1985). Por lo tanto, se permiten desviaciones de la complementariedad completa, siempre y

cuando dichas desviaciones no anulen por completo la capacidad de las moléculas de formar una estructura de cadena doble. Con el fin de que una molécula sirva como cebador o sonda, su secuencia solamente debe ser suficientemente complementaria para poder formar una estructura de cadena
5 doble bajo las concentraciones particulares de solvente y sal empleadas.

Como se lo usa en la presente documentación, una secuencia "sustancialmente homóloga" es una secuencia de ácido nucleico que hibridiza específicamente con el complemento de la secuencia de ácido nucleico con la cual se compara, es decir, la secuencia blanco, bajo condiciones de alta severidad. Las
10 condiciones de severidad apropiadas que promoverán la hibridación de ADN, por ejemplo, cloruro de sodio 6,0X/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45°C, seguido por un lavado de SSC 2,0X a 50°C, son conocidas por aquellos entrenados en la técnica, o pueden hallarse en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Por ejemplo, puede
15 seleccionarse la concentración de sal en el paso de lavado entre una severidad baja de aproximadamente SSC 2,0X a 50°C y una severidad alta de aproximadamente SSC 0,2X a 50°C. Además, la temperatura en el paso de lavado puede incrementarse desde condiciones de baja severidad a temperatura ambiente, aproximadamente 22°C, hasta condiciones de alta severidad a
20 aproximadamente 65°C. Puede variarse tanto la temperatura como la concentración de sal, o puede mantenerse constante la temperatura o la concentración de sal mientras se altera la otra variable. En una realización preferida, un ácido nucleico de la presente invención hibridizará específicamente con una o más de las moléculas de ácidos nucleicos indicadas SEQ ID N° 1 y 2, o
25 complementos o fragmentos de cualquiera de ellas, bajo condiciones de severidad moderada, por ejemplo, a aproximadamente SSC 2,0X y aproximadamente 65°C. En una realización particularmente preferida, un ácido nucleico de la presente invención hibridizará específicamente con una o más de las moléculas de ácido nucleico indicadas en SEQ ID N° 1 y SEQ ID N° 2, o complementos o fragmentos
30 de cualquiera de ellas, bajo condiciones de alta severidad. En un aspecto de la presente invención, una molécula de ácido nucleico marcadora preferida de la

presente invención tiene la secuencia de ácido nucleico detallada en SEQ ID N° 1 y SEQ ID N° 2, o complementos o fragmentos de cualquiera de ellas. En otro aspecto de la presente invención, una molécula de ácido nucleico marcadora preferida de la presente invención comparte entre 80% y 100%, o entre 90% y 100% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico detallada en SEQ ID N° 1 y SEQ ID N° 2, o complementos o fragmentos de cualquiera de ellas. En otro aspecto de la presente invención, una molécula de ácido nucleico marcadora preferida de la presente invención comparte entre 95% y 100% de identidad de secuencia con la secuencia detallada en SEQ ID N° 1 y SEQ ID N° 2, o complementos o fragmentos de cualquiera de ellas. SEQ ID N° 1 y SEQ ID N° 2 pueden usarse como marcadores en métodos de cruzamiento de plantas para identificar la progenie de cruzamientos genéticos, similares a los métodos descritos para el análisis de marcadores de repeticiones simples de secuencias de ADN, en "DNA markers: Protocols, applications, and overviews" (1997) 173-185, Cregan, et al., editores, Wiley-Liss NY; que se incorpora en su totalidad en la presente documentación a modo de referencia. La hibridación de la sonda con la molécula de ADN blanco puede detectarse empleando una cantidad de métodos conocidos por aquellos entrenados en la técnica, que pueden incluir, sin limitaciones, marcas fluorescentes, marcas radiactivas, marcas basadas en anticuerpos y marcas quimioluminiscentes.

Respecto de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico blanco (por ejemplo, por PCR) usando un par de cebadores de amplificación en particular, las "condiciones severas" son condiciones que permiten que el par de cebadores hibridice solamente con la secuencia de ácido nucleico blanco con la que se uniría un cebador que tuviera la secuencia tipo salvaje correspondiente (o su complemento), y preferiblemente producirá un único producto de amplificación, el amplicón, en una reacción de amplificación térmica de ADN.

El término "específica (para una secuencia blanco)" indica que una sonda o un cebador hibridiza bajo condiciones de hibridación severas solamente con la secuencia blanco en una muestra que contiene la secuencia blanco.

Como se lo usa en la presente documentación, un "ADN amplificado" o un "amplicón" hace referencia al producto de la amplificación de ácidos nucleicos de una secuencia de ácido nucleico blanco que es parte de un ácido nucleico molde. Por ejemplo, para determinar si la planta de maíz que resulta de un cruzamiento sexual contiene un evento transgénico de ADN genómico de la planta de maíz de la presente invención, puede someterse ADN extraído de una muestra de tejido de una planta de maíz a un método de amplificación de ácidos nucleicos, usando un par de cebadores que incluye un cebador derivado de la secuencia circundante en el genoma de la planta, adyacente al sitio de inserción del ADN heterólogo insertado, y un segundo cebador derivado del ADN heterólogo insertado, para producir un amplicón que sirve para diagnosticar la presencia del evento ADN. El amplicón tiene una longitud y una secuencia que también sirve para diagnosticar el evento. La longitud del amplicón puede variar entre la longitud combinada del par de cebadores más un par de bases nucleotídicas, preferiblemente más aproximadamente cincuenta pares de bases nucleotídicas, más preferiblemente más aproximadamente doscientos cincuenta pares de bases nucleotídicas, y aún más preferiblemente más aproximadamente cuatrocientos cincuenta pares de bases nucleotídicas. Como alternativa, un par de cebadores puede derivar de la secuencia circundante a ambos lados del ADN insertado, de modo de producir un amplicón que incluye la secuencia de nucleótidos insertada completa. Un miembro de un par de cebadores derivado de la secuencia genómica de la planta puede estar localizado a una distancia de la secuencia de ADN insertada, y esta distancia puede variar entre un par de bases nucleotídicas y aproximadamente veinte mil pares de bases nucleotídicas. El uso del término "amplicón" excluye específicamente los dímeros de cebadores que puedan formarse en la reacción de amplificación térmica de ADN.

La amplificación de ácidos nucleicos puede efectuarse empleando cualquiera de los distintos métodos de amplificación de ácidos nucleicos conocidos en la técnica, incluyendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En la técnica se conoce una variedad de métodos de amplificación, y se los describe, entre otros, en las Patentes de los EEUU N° 4683195 y 4683202, y en

PCR Protocols: A Guide to Métodos and Applications, editado por Innis et al., Academic Press, San Diego, 1990. Se han desarrollado métodos de amplificación por PCR para amplificar hasta 22 kb de ADN genómico y hasta 42 kb de ADN de bacteriófago (Cheng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5695-5699, 1994). En la práctica de la presente invención pueden usarse estos métodos, y también otros métodos conocidos en la técnica de la amplificación de ADN. La secuencia del inserto de ADN heterólogo, o la secuencia circundante del evento de maíz MON89034 en muestras de semillas depositadas con números ATCC, puede verificarse (y corregirse, de ser necesario) amplificando dichas secuencias del evento, usando cebadores derivados de las secuencias provistas en la presente documentación, a lo que sigue la secuenciación normal del ADN del amplicón de PCR o el ADN clonado.

El amplicón producido con estos métodos puede detectarse empleando una pluralidad de técnicas. Uno de dichos métodos es el análisis de fragmentos genéticos (Nikiforov, et al. Ácido nucleico Res. 22:4167-4175, 1994), donde se diseña un oligonucleótido de ADN que se superpone con la secuencia de ADN genómico circundante adyacente y la secuencia de ADN insertada. El oligonucleótido se inmoviliza en las cavidades de una placa de microcavidades. Después de la PCR de la región de interés (usando un cebador de la secuencia insertada y uno de la secuencia genómica circundante adyacente), puede realizarse la hibridación de un producto de PCR de cadena simple con el oligonucleótido inmovilizado, para luego utilizarlo como molde para una reacción de extensión de base única, usando una ADN polimerasa y ddNTP marcados específicos para la siguiente base esperada. La lectura puede basarse en fluorescencia o ELISA. Una señal indica la presencia de la secuencia insertada/circundante, merced a la amplificación, la hibridación y la extensión de base única exitosa.

Otro método es la técnica de pirosecuenciación, como la describe Winge (Innov. Pharma. Tech. 00:18-24, 2000). En este método se diseña un oligonucleótido que se superpone con el ADN genómico adyacente y el ADN insertado en la unión. El oligonucleótido se hace hibridizar con el producto de PCR

de cadena simple de la región de interés (un cebador en la secuencia insertada y uno en la secuencia genómica circundante), y se incubaba en presencia de ADN polimerasa, ATP, sulfurilasa, luciferasa, apirasa, adenosina 5' fosfosulfato y luciferina. Se agregan dNTP en forma individual, y la incorporación resulta en una
5 señal luminosa que se mide. La señal luminosa indica la presencia del transgen insertado/la secuencia circundante, merced a la amplificación, la hibridación y la extensión de base única exitosa.

La polarización por fluorescencia, como lo describen Chen, et al., (Genoma Res. 9: 492-498, 1999), es un método que puede usarse para detectar el amplicón
10 de la presente invención. Usando este método, se diseña un oligonucleótido que se superpone con el ADN genómico circundante y el ADN insertado en al unión. El oligonucleótido se hace hibridizar con un producto de PCR de cadena simple de la región de interés (un cebador en el ADN insertado y uno en la secuencia de ADN genómico circundante), y se incubaba en presencia de una ADN polimerasa y ddNTP
15 marcados con fluorescencia. Una extensión de base única resulta en la incorporación de ddNTP. La incorporación puede medirse como un cambio en la polarización usando un fluorómetro. El cambio en la polarización indica la presencia del transgen insertado/la secuencia circundante, merced a la amplificación, la hibridación y la extensión de base única exitosa.

20 Taqman® (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) se describe como un método para detectar y cuantificar la presencia de una secuencia de ADN, y es posible comprenderlo por completo en las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Brevemente, se diseña una sonda de oligonucleótidos FRET que se superpone con el ADN genómico circundante y el ADN insertado en al unión. La
25 sonda FRET y los cebadores de PCR (un cebador en el ADN insertado y uno en la secuencia genómica circundante) se hacen ciclar en presencia de una polimerasa termoestable y dNTP. La hibridación de la sonda FRET resulta en el corte y la liberación de la porción fluorescente de la porción de fragua de la sonda FRET. Una señal fluorescente indica la presencia del transgen insertado/la secuencia
30 circundante, merced a la amplificación e hibridación exitosa.

Se han descripto marcadores moleculares para usar en la detección de secuencias, como lo describen Tyangi, *et al.* (Nature Biotech. 14: 303-308, 1996). Brevemente, se diseña un oligonucleótido FRET que se superpone con el ADN genómico circundante y el ADN insertado en al unión. La estructura única de la sonda FRET resulta en una estructura secundaria que mantiene las porciones fluorescentes y de fragua próximas. La sonda FRET y los cebadores de PCR (un cebador en el ADN insertado y uno en la secuencia genómica circundante) se hacen ciclar en presencia de una polimerasa termoestable y dNTP. Después de la amplificación exitosa por PCR, la hibridación de la sonda FRET con la secuencia blanco resulta en la remoción de la estructura secundaria de la sonda y la separación espacial de las porciones fluorescente y de fragua. Se obtiene una señal fluorescente. La señal fluorescente indica la presencia del transgen insertado/la secuencia circundante, merced a la amplificación y la hibridación exitosa.

En otros métodos descriptos, tales como los métodos microfluidos (Publicación de Patente de los EEUU N° 2006068398, Patente de los EEUU N° 6544734), se proporcionan métodos y dispositivos para separar y amplificar muestras de ADN. Se usan colorantes ópticos para detectar y cuantificar moléculas de ADN específicas (WO/05017181). También es posible emplear dispositivos de nanotubos (WO/06024023), que comprenden un sensor electrónico para la detección de moléculas de ADN, o nanoesferas, que se unen a moléculas de ADN específicas, después de lo cual puede realizarse la detección.

Se provee un conjunto de detección de ADN usando las composiciones descriptas en la presente documentación. Los conjuntos de elementos son útiles en la identificación de ADN del evento de maíz MON89034 en una muestra, y pueden aplicarse al menos a los métodos para cruzar plantas de maíz que contienen ADN del evento apropiado. Los conjuntos de elementos contienen cebadores y/o sondas de ADN que son homólogas o complementarias con los segmentos seleccionados entre las secuencias tal como se especifica en SEQ ID N° 1-7, o cebadores o sondas de ADN que son homólogas o complementarias con el ADN contenido en los elementos genéticos de ADN transgénico tal como se

específica en el Listado de Secuencias. Estas secuencias de ADN pueden usarse en reacciones de amplificación de ADN, o como sondas en un método de hibridación de ADN para detectar la presencia de polinucleótidos que sirven como diagnóstico de la presencia del ADN objetivo en una muestra. La producción de un
5 amplicon predefinido en una reacción de amplificación térmica es diagnóstico de la presencia de ADN correspondiente a ADN con el genoma PTA-7455 en la muestra. Si se selecciona la hibridación, la detección de hibridación de la sonda en la muestra biológica es diagnóstico de la presencia de ADN del evento transgénico MON89034 en la muestra. Típicamente, la muestra es maíz, o
10 productos de maíz o subproductos del uso de maíz.

En la presente invención se provee una planta de maíz transgénica conocida como el evento de maíz MON89034, progenie de la planta y células de la planta, y también semillas producidas por la planta. Las semillas representativas para cultivar la planta, producir progenie, obtener células o producir un cultivo de
15 dicha semilla, que comprende el evento transgénico de maíz, han sido depositadas el 28 de marzo de 2006 en la Colección Americana de Tipos de Cultivo (ATCC) y tienen el número de acceso PTA-7455.

Las plantas, las células y los productos obtenidos a partir de estas realizaciones, y realizaciones semejantes, contienen ADN que sirve para
20 diagnosticar la presencia de ADN derivado de cualquier célula derivada del evento transgénico de maíz MON89034 en cualquier muestra biológica. Esto se debe a las dos secuencias novedosas que se hallan dentro de las células del evento transgénico de maíz MON89034. El ADN diagnóstico comprende una secuencia de nucleótidos que se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID N° 1, SEQ ID
25 N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4 y SEQ ID N° 5. La relación entre estas secuencias se describe más particularmente en la presente documentación, en la leyenda de la Figura 1 y con referencia a la Figura 1.

Las plantas de maíz cultivadas a partir de semillas que son homocigotas para el ADN diagnóstico del evento transgénico de maíz MON89034 también
30 están dentro del alcance de la presente invención. Las plantas de maíz cultivadas a partir de semillas que son heterocigotas para el ADN diagnóstico del evento

transgénico de maíz MON89034 también están dentro del alcance de la presente invención, siempre que estas semillas también comprenden las secuencias de ADN diagnósticas. Las células, las semillas y los tejidos producidos a partir de las plantas que comprenden el ADN diagnóstico también están dentro del alcance de la presente invención.

Las plantas de maíz y las células de plantas de maíz, y semejantes, que comprenden ADN diagnóstico del evento transgénico de maíz MON89034, presentan resistencia a la infestación de insectos lepidópteros. Estas células y plantas contienen ADN que codifica la proteína insecticida (agente insecticida tóxico) Cry2Ab, y ADN que tiene las secuencias de nucleótidos de SEQ ID N° 1 y SEQ ID N° 2, que forma parte del genoma de las células de la planta. Estas plantas y células vegetales también contienen un ADN que codifica la proteína insecticida (agente insecticida tóxico) Cry1A.105. Estas proteínas pueden conocerse como una primera y una segunda proteína insecticida, respectivamente, o a la inversa. La expresión de estas proteínas se realiza a partir de los componentes/elementos genéticos reguladores localizados en los cassettes de expresión, que proporcionan la expresión de cada una de las secuencias de ADN que codifican estas toxinas y se describen con mayor detalle en la presente documentación, en la leyenda de la Figura 1 y con referencia a la Figura 1 y la secuencia detallada en SEQ ID N° 5. Las plantas de maíz y las células de plantas de maíz que comprenden estas secuencias son efectivas para proteger las plantas de la infestación de lepidópteros plaga, sean heterocigotas u homocigotas para los alelos que contienen estas secuencias codificantes.

En la presente invención también se proveen amplicones que pueden producirse a partir de las secuencias descritas en la presente documentación, que sirven para diagnosticar la presencia de ADN derivado de ADN del evento transgénico de maíz MON89034 en una muestra biológica. Un amplicón diagnóstico de la presencia de ADN transgénico del evento de maíz MON89034 en una muestra biológica contiene al menos un segmento de polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos detallada en SEQ ID N° 1 o SEQ ID N° 2. Estos amplicones pueden producirse usando secuencias cebadoras como las que

se describirán más adelante en la presente documentación, a partir de cualquier muestra biológica que contenga al menos aproximadamente 0,5 femtomoles o aproximadamente 0,5 picogramos de ADN derivado del evento transgénico de maíz MON89034. Estas fuentes de muestras biológicas de ADN que corresponde
5 al evento transgénico de maíz MON89034 pueden ser masa de maíz, aceite de maíz, tortas de maíz, semillas de maíz, germen de maíz, almidón de maíz y harina de maíz, y semejantes, derivados de dicho evento transgénico.

En la invención también se proveen moléculas de polinucleótidos aislados que presentan secuencias de nucleótidos contiguos tales como las detalladas en
10 SEQ ID N° 5. Estas secuencias de nucleótidos contiguos comprenden (1) entre aproximadamente 11 y aproximadamente 12000 nucleótidos, y cualquier longitud intermedia, y que además comprenden los nucleótidos contiguos detallados en las posiciones de nucleótidos 1-11 ó 9-20 de SEQ ID N° 1, y 1-11 ó 9-20, como se indica en SEQ ID N° 2; (2) cualquier secuencia de nucleótidos contiguos como se
15 indica en SEQ ID N° 3, de entre aproximadamente 11 y aproximadamente 2000 nucleótidos, y cualquier longitud intermedia, y que comprende además los nucleótidos contiguos detallados en las posiciones de nucleótidos 1-11 y 9-20, como se indica en SEQ ID N° 1; cualquier secuencia de nucleótidos contiguos como se indica en SEQ ID N° 4, de entre aproximadamente 11 y
20 aproximadamente 914 nucleótidos, y cualquier longitud intermedia, y que comprende además los nucleótidos contiguos detallados en las posiciones de nucleótidos 1-11 y 9-20, como se indica en SEQ ID N° 2. Estas moléculas de polinucleótidos aislados son útiles en los métodos de amplificación de ADN para producir uno o más amplicones a partir de una muestra biológica que contiene
25 ADN de maíz. La detección de un amplicón de este tipo sirve para diagnosticar la presencia de ADN transgénico del evento de maíz MON89034 en la muestra. Las moléculas de polinucleótidos aislados también son útiles en diversos métodos de detección de nucleótidos para detectar la presencia de ADN derivado del evento transgénico de maíz MON89034 en una muestra biológica. En particular, las
30 sondas de polinucleótidos que comprenden al menos aproximadamente 11 nucleótidos contigua, como se indica en SEQ ID N° 1 o SEQ ID N° 2, son útiles

como sondas en estos métodos para detectar ADN del evento transgénico MON89034 en una muestra. Las secuencias complementarias de estas moléculas de polinucleótidos aislados también son útiles en los mismos métodos de detección y/o amplificación.

5 En la presente invención también se proporcionan conjuntos de elementos para usar en la detección de la presencia de ADN derivado del evento transgénico de maíz MON89034 en una muestra biológica. Un conjunto de elementos usa una molécula de sonda de polinucleótido, donde la molécula sonda contiene al menos entre aproximadamente 11 y aproximadamente 12000 nucleótidos contigua, que
10 presentan homología sustancial o complementariedad sustancial con un segmento de nucleótidos que comprende una secuencia indicada en SEQ ID N° 5, y resultará útil para detectar la presencia de ADN de MON89034 en una muestra. La molécula sonda debería contener al menos una de las secuencias indicadas en SEQ ID N° 1 y SEQ ID N° 2. Las secuencias indicadas en SEQ ID N° 1 y SEQ ID
15 N° 2 también pueden conocerse como secuencias de unión, es decir, las secuencias en cada extremo del ADN transgénico insertado en la planta de maíz dan lugar al evento transgénico de maíz MON89034. Estas secuencias, conocidas arbitrariamente como extremos 5' y 3', respectivamente, contienen parte de la secuencia de ADN insertado y parte de la secuencia genómica de maíz
20 circundante. Por ejemplo, en su mitad 5', SEQ ID N° 1 representa el extremo 3' de la secuencia genómica de maíz que rodea el extremo 5' del ADN insertado, donde el extremo 5' del ADN insertado está representado por la mitad 3' de la secuencia, como se indica en SEQ ID N° 1. En su mitad 5', SEQ ID N° 2 representa el extremo 3' del ADN insertado, y en su mitad 3', el extremo 5' de la secuencia
25 genómica de maíz que rodea el extremo 3' del ADN insertado. En el genoma de maíz de ocurrencia natural, en la posición de la secuencia insertada indicada en SEQ ID N° 5, la secuencia circundante en el extremo 5' del ADN insertado y la secuencia circundante en el extremo 3' del ADN insertado están unidas, y una primera molécula cebadora, que hibridice con la secuencia complementaria con la
30 secuencia indicada en SEQ ID N° 3 (distinta de los 21 nucleótidos del extremo 3' de SEQ ID N° 3,) y una segunda molécula cebadora, que hibridice con la

secuencia indicada en SEQ ID N° 4 (distinta de los 20 nucleótidos del extremo 5' de SEQ ID N° 4), producirán un amplicón en una reacción de amplificación térmica, con un molde de ADN distinto del ADN de MON89034 que sirve para diagnosticar la ausencia del ADN insertado en MON89034, y los mismos
5 cebadores producirán un amplicón con un tamaño algo mayor que 12000 nucleótidos (dependiendo de la posición de los cebadores en las secuencias circundantes indicadas en SEQ ID N° 3 y SEQ ID N° 4) cuando se use ADN de MON89034 como molde. También se proporcionan otras realizaciones.

Se proporciona un conjunto de elementos para detectar la secuencia de
10 unión SEQ ID N° 1 o SEQ ID N° 2 del evento de maíz MON89034 en una muestra biológica. El conjunto de elementos contiene una sonda de polinucleótido que es o es completamente complementario con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N° 1 o SEQ ID N° 2, o complementos de ésta, y también contiene un par de cebadores para usar en una reacción de amplificación de
15 ácidos nucleicos. El par de cebadores puede estar compuesto por un primer cebador, que comprende al menos entre aproximadamente 15 y aproximadamente 50 nucleótidos contiguos de la porción del genoma de maíz de SEQ ID N° 3, y un segundo cebador, que comprende al menos entre aproximadamente 15 y aproximadamente 50 nucleótidos contiguos complementarios con la porción de
20 ADN heterólogo insertado de SEQ ID N° 5. El primer cebador del par de polinucleótidos cebadores hibridiza específicamente con la secuencia complementaria inversa correspondiente a la indicada en SEQ ID N° 3, aproximadamente entre las posiciones de nucleótidos 1 y 2050, y el segundo cebador de dicho par de polinucleótidos cebadores hibridiza con la secuencia
25 indicada en SEQ ID N° 5, aproximadamente entre las posiciones de nucleótidos 2060 y 12208, donde cada uno de dichos cebadores se extiende hacia el otro para formar un amplicón que comprende a la SEQ ID N° 1, donde dicho amplicón sirve para diagnosticar la presencia de ADN del evento MON89034 en la muestra. Un par de cebadores diferentes puede estar compuesto por un primer cebador, que
30 comprende al menos entre aproximadamente 15 y aproximadamente 50 nucleótidos contiguos complementarios con la porción del genoma de maíz de

SEQ ID N° 4, y un segundo cebador, que comprende al menos entre aproximadamente 15 y aproximadamente 50 nucleótidos contiguos de la porción de ADN heterólogo insertado de SEQ ID N° 5. El segundo cebador del par de polinucleótidos cebadores hibridiza específicamente con la secuencia complementaria inversa que corresponde a la indicada en SEQ ID N° 5, aproximadamente entre las posiciones de nucleótidos 1 y 11305, y el primer cebador del par de polinucleótidos cebadores hibridiza específicamente con la secuencia indicada en SEQ ID N° 4, aproximadamente entre las posiciones de nucleótidos 21 y 914, donde cada uno de dichos cebadores se extiende hacia el otro para formar un amplicón que comprende a la SEQ ID N° 2, donde dicho amplicón sirve para diagnosticar la presencia de ADN del evento MON89034 en la muestra.

Estos pares de cebadores son útiles para producir amplicones que comprenden SEQ ID N° 1 o SEQ ID N° 2, según sea el caso, por lo que sirven para diagnosticar la presencia de ADN de MON89034 en una muestra biológica. Estos amplicones permiten detectar la presencia de una secuencia de unión diagnóstica del evento de maíz MON89034 en una muestra biológica.

También se proporciona un método para producir y detectar un amplicón que sirve para diagnosticar un ADN transgénico del evento de maíz MON89034, en una muestra biológica que comprende ADN de maíz. El método comprende poner en contacto la muestra biológica con dos o más cebadores en una reacción de amplificación de ácidos nucleicos, llevar a cabo una reacción de amplificación de ácidos nucleicos, luego detectar el amplicón. La presencia del amplicón sirve para diagnosticar dicho evento ADN en la muestra, siempre que el amplicón contenga una de las secuencias contiguas indicadas en SEQ ID N° 1 y SEQ ID N° 2, aproximadamente entre las posiciones de nucleótidos 1-11 ó 9-20, o las secuencias complementarias que corresponden a estas porciones.

Las secuencias de nucleótidos que sirven para diagnosticar la presencia del evento transgénico de maíz MON89034 en una muestra biológica también pueden detectarse usando otros métodos, por ejemplo, poniendo en contacto una muestra biológica sospechada de contener ADN de MON89034 con una sonda que

hibridiza bajo condiciones de hibridación severas con una o más de las secuencias de nucleótidos indicadas en SEQ ID N° 1 o SEQ ID N° 2, sometiendo la muestra y la sonda a condiciones de hibridación severas; y luego detectando la hibridación de la sonda con la secuencia de nucleótidos. La detección de la hibridación sirve
5 para diagnosticar la presencia del ADN de MON89034 en la muestra.

En la presente invención también se proporcionan polinucleótidos cebadores para usar en la producción de un amplicón que sirve para diagnosticar la presencia de ADN del evento de maíz MON89034 en una muestra biológica, en una reacción de amplificación térmica. Típicamente, los cebadores se
10 proporcionan en pares, donde por razones de conveniencia, los miembros del par de cebadores se conocen como el primer cebador y el segundo cebador. Un primer cebador puede consistir en al menos aproximadamente 15 nucleótidos contiguos de la porción genómica de maíz indicada en SEQ ID N° 3, y un segundo cebador puede consistir en al menos aproximadamente 15 nucleótidos contiguos
15 complementarios con la porción de ADN heterólogo insertado indicada en SEQ ID N° 5. En una reacción de amplificación térmica, estos dos cebadores producirán un amplicón con un ADN molde obtenido de ADN del evento de maíz MON89034 que contenga una secuencia de polinucleótidos como la indicada en SEQ ID N° 1. Como alternativa, un primer cebador puede consistir en al menos
20 aproximadamente 15 nucleótidos contiguos de la porción del genoma de maíz de SEQ ID N° 4, y un segundo cebador puede consistir en al menos aproximadamente 15 nucleótidos contiguos complementarios con la porción de ADN heterólogo insertado de SEQ ID N° 5. En una reacción de amplificación térmica, estos dos cebadores producirían un amplicón con un ADN molde obtenido
25 de ADN del evento de maíz MON89034 que contuviera una secuencia de polinucleótidos como la indicada en SEQ ID N° 2.

Un método alternativo para detectar una secuencia de unión del evento de maíz MON89034 en una muestra biológica que comprende ADN de maíz, tal como SEQ ID N° 1 o SEQ ID N° 2, consiste en poner en contacto la muestra con una
30 sonda de polinucleótido que hibridiza bajo condiciones de hibridación severas con una de las secuencias de unión, someter la muestra y la sonda a condiciones de

hibridación severas; y detectar la hibridación de la sonda con la secuencia de unión. La detección de la unión/hibridación de la sonda con la secuencia de unión es indicativa la presencia de ADN de MON89034 en la muestra biológica. Una planta de maíz transformada de forma estable, cuyo ADN produce un amplicón de ADN que comprende a la SEQ ID N° 1 o SEQ ID N° 2 cuando se somete al método detallado en la presente documentación, está dentro del alcance de la presente invención. En los ejemplos de presente documentación, y en SEQ ID N° 6 y SEQ ID N° 7, se presentan ejemplos de secuencias cebadoras, en particular, un par de secuencias cebadoras.

Un método alternativo para detectar la presencia de ADN del evento de maíz MON89034 en una muestra biológica puede consistir los siguientes pasos: poner en contacto la muestra con una sonda que hibridiza bajo condiciones de hibridación severas con ADN de MON89034, y no hibridiza bajo condiciones de hibridación severas con ADN genómico de una planta de maíz que no es ADN de MON89034, someter la muestra y la sonda a condiciones de hibridación severas, y luego detectar la hibridación de la sonda con ADN de MON89034. Una sonda consistente con esta realización es o es complementaria con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N° 1 y SEQ ID N° 2. La detección de la hibridación de la sonda con la muestra sirve para diagnosticar la presencia del polinucleótido del evento de maíz MON89034 en la muestra. La muestra biológica podrá ser cualquier muestra que contenga ADN de MON89034, incluyendo, sin limitaciones, aceite de maíz, masa de maíz, harina de maíz, gluten de maíz, tortas de maíz, almidón de maíz, licor rebajado de maíz, tejido de maíz, células de maíz, granos de maíz, polen de maíz, tejido de raíz de maíz, DDGS, y aún etanol producido como subproducto de la fermentación de este maíz transgénico, siempre que la muestra contenga al menos una cantidad detectable de un polinucleótido diagnóstico de la presencia del evento MON89034 en la muestra. una sonda de polinucleótido puede ser cualquier nucleótido seleccionado del grupo que consiste en un ácido desoxirribonucleico, un ácido ribonucleico y un análogo de nucleótido, y puede estar marcado con al menos un fluoróforo, una molécula que contiene un isótopo emisor de radiación o una molécula tipo

hapteno, que puede detectarse específicamente con un anticuerpo, o con otro tipo de reacción de unión.

Es posible obtener una variedad de maíz que comprende un ADN diagnóstico de la presencia de ADN del evento transgénico MON89034 cruzando una planta de maíz que comprende ADN transgénico del evento de maíz MON89034 con una planta de maíz distinta del evento MON89034, para producir una planta de maíz híbrida que comprende ADN diagnóstico de dicho evento. Esta planta de maíz híbrida que comprende ADN diagnóstico del evento transgénico de maíz MON89034 está dentro del alcance de la presente invención, al igual que las semillas producidas por el híbrido (siempre y cuando comprendan ADN diagnóstico del evento transgénico de maíz MON89034), y polen, óvulos, semillas, raíces u hojas de la planta de maíz híbrida MON89034, también con la condición de que contengan las secuencias de ADN diagnósticas, y progenie producida a partir de estas realizaciones.

En la presente invención se provee un método para proteger una planta de maíz de una infestación de insectos lepidópteros, que comprende introducir en la dieta del insecto lepidóptero plaga una o más células de plantas de maíz transgénicas, donde cada célula de una planta de maíz comprende en su genoma un polinucleótido que corresponde a la secuencia indicada en SEQ ID N° 1 y SEQ ID N° 2, y la secuencia de nucleótidos contiguos indicada en SEQ ID N° 5, entre SEQ ID N° 1 y SEQ ID N° 2. El insecto lepidóptero objetivo que se alimenta con estas células de plantas de maíz transgénicas es inhibido, de modo que no puede seguir alimentándose con la planta de maíz de la que derivan las células vegetales mencionadas.

En la presente invención también se proporcionan composiciones que son tóxicas para lepidópteros que son plagas de plantas de maíz particulares. Una composición de células vegetales transgénicas introducida en la dieta de un lepidóptero plaga objetivo contiene células de plantas de maíz transgénicas, las cuales comprenden en su genoma un polinucleótido que corresponde a la secuencia indicada en SEQ ID N° 1 y SEQ ID N° 2, junto con la secuencia de nucleótidos contiguos indicada en SEQ ID N° 5, entre SEQ ID N° 1 y SEQ ID N° 2,

y es efectiva para proporcionar protección contra la infestación de insectos lepidópteros en una planta de maíz o una célula de una planta de maíz, siempre y cuando la planta o la célula de maíz exprese Cry1A.105 y/o Cry2Ab2 a partir de los cassettes de expresión contenidos en la secuencia de nucleótidos contigua.

5 Estas composiciones, bajo la forma de semillas de maíz transgénicas, han sido depositadas en la Colección Americana de Tipos de Cultivo bajo el número de acceso PTA-7455. En el genoma de sus células, estas plantas de maíz resistentes a insectos, o sus partes, contendrán ADN que tendrá al menos una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2,

10 SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4 y SEQ ID N° 5. Dentro del alcance de la presente invención también se incluye la progenie y las semillas de la planta de maíz resistente a los insectos, donde la progenie y las semillas tendrán las secuencias diagnósticas mencionadas en la presente documentación. Estas plantas de maíz resistentes a insectos pueden producirse con un método que comprende cruzar

15 una planta de maíz transgénica del evento MON89034 con una planta de maíz diferente, y seleccionar la progenie resistente a los insectos analizando al menos una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4 y SEQ ID N° 5.

El evento transgénico de maíz resistente a los insectos MON89034 puede

20 combinarse con otras variedades transgénicas de maíz, tal como maíz resistente a herbicidas, tales como glifosato, glufosinato y diacamba, y semejantes, o maíz resistente a los insectos devoradores de brotes, como resultado de la inserción de secuencias que codifican proteínas tales como PS149B1 y Cry3Bb modificada, u otras variedades de maíz transgénico resistente a una infestación de insectos

25 lepidópteros como resultado de la inserción de secuencias que codifican otras proteínas tóxicas, tales como VIP3A, Cry1Ab y Cry1Fa, y semejantes. Diversas combinaciones de estos eventos transgénicos diferentes se cruzan con las plantas de maíz de la presente invención, es decir, el evento MON89034, para proporcionar variedades mejoradas de maíz transgénico resistentes a

30 infestaciones de coleópteros y lepidópteros, y resistentes a herbicidas selectivos. Estas variedades pueden presentar características de rendimiento y tolerancia a la

201

sequía mejoradas, en comparación con variedades no transgénicas y con caracteres transgénicos individuales.

Se proporciona un método para producir una planta de maíz resistente a infestaciones de insectos, donde la planta de maíz comprende una cantidad efectiva como insecticida de las secuencias que codifican toxinas indicadas en SEQ ID N° 5. El método comprende extraer las secuencias que codifican toxinas del evento transgénico de maíz MON89034, e introducir estas secuencias codificantes, solas o combinadas, en una o más células de maíz, para producir células de maíz transgénicas que comprendan estas una o más secuencias que codifican toxinas. Después, las células de maíz transgénicas se cultivan (regeneran) para obtener plantas de maíz transgénicas que comprenden una o más secuencias codificantes, donde las plantas transgénicas presentan resistencia a infestaciones de insectos.

En la presente invención se proporciona un método para determinar la cigosidad del ADN de una planta de maíz transgénica que comprende ADN del evento de maíz MON89034, respecto del ADN diagnóstico de la presencia de dicho ADN de MON89034 en una muestra biológica. Como primer paso, el método consiste en poner en contacto la muestra con tres cebadores diferentes que comprenden SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7 y SEQ ID N° 10, que cuando se usan combinados en una reacción de amplificación de ácidos nucleicos que comprende ADN del evento de maíz MON89034, producen un primer amplicón que sirve para diagnosticar la presencia del evento de maíz MON89034, y cuando se usan en una reacción de amplificación de ácidos nucleicos que comprende ADN genómico de maíz distinto del ADN de MON89034, producen un segundo amplicón que sirve para diagnosticar ADN genómico de maíz distinto del ADN de MON89034. Los siguientes pasos consisten en llevar a cabo una reacción de amplificación de ácidos nucleicos, y comparar los amplicones producidos durante la reacción de amplificación térmica. La detección de la presencia de ambos amplicones sirve para diagnosticar la cigosidad de la muestra. La detección del primer amplicón solo es indicativa de una muestra que solamente contiene ADN de MON89034, es decir, una muestra homocigota. La detección del segundo amplicón solo es

indicativa de una muestra que no contiene ADN de MON89034. La detección del primer y el segundo amplicón juntos en una muestra es indicativa de una muestra que contiene (1) ADN heterocigota, con referencia a una muestra pura que solamente contiene material heterocigota, o (2) una muestra que contiene
5 muestras de ADN inicial homocigota y heterocigota, o (3) una muestra que contiene alguna combinación de muestras homocigotas, heterocigotas, y/o muestras distintas del ADN de MON89034.

En la invención también se provee el cultivo de plantas de maíz que comprenden ADN diagnóstico de un segmento de ADN transgénico insertado en el
10 genoma de las células de las plantas de maíz. El ADN en el genoma de las células de maíz comprende cualquiera o la totalidad de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en:

- (a) la secuencia de nucleótidos indicada en SEQ ID N° 5;
- (b) las secuencias de nucleótidos indicadas en SEQ ID N° 1 y SEQ ID N° 2;
- 15 (c) la secuencia de nucleótidos indicada en SEQ ID N° 3; y
- (d) la secuencia de nucleótidos indicada en SEQ ID N° 4.

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar ejemplos de determinadas realizaciones preferidas de la invención. Aquellos entrenados en la técnica han de apreciar que los siguientes ejemplos representan abordajes de los
20 que los inventores han establecido que funcionan bien en la práctica de la invención, por lo que es posible considerarlos ejemplos constitutivos de modos preferidos para su práctica. Sin embargo, a la luz de la presente descripción, aquellos entrenados en la técnica han de apreciar que pueden efectuarse muchos cambios en las realizaciones específicas descritas, y aún así puede obtenerse un
25 resultado igual o similar, sin apartarse del espíritu y el alcance de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

En este ejemplo se ilustra la construcción y la caracterización molecular del evento transgénico de maíz MON89034.

30 La planta de maíz MON89034 se produjo con un proceso de transformación mediada por *Agrobacterium* de una línea de maíz endocriada con la construcción

plasmídica pMON38850 (el cassette de expresión se ilustra en la Figura 1). El método de transformación usado es similar al descrito en la Patente de los EEUU N° 6603061. La construcción plasmídica pMON38850 contiene los cassettes de expresión vegetales conectados con los elementos genéticos reguladores necesarios para la expresión de la proteína insecticida Cry1A.105 en células de plantas de maíz. Las células de maíz se regeneraron para obtener plantas de maíz intactas, que consistieron en al menos aproximadamente 23000 eventos transgénicos diferentes. Los eventos transgénicos (plantas) individuales se seleccionaron entre la población de eventos cuyos cassettes de expresión vegetales se hallaban intactos, y que presentaban resistencia al daño provocado por la alimentación de larvas de insectos lepidópteros. Una planta de maíz que contiene en su genoma los cassettes de expresión vegetales unidos de pMON38850 es un aspecto de la presente invención. Después del análisis sustancial de estos eventos transgénicos, el evento transgénico MON89034 se seleccionó sobre la base de su caracterización molecular, y de la ausencia de cualquier efecto fenotípico o deficiencia agronómica indeseable.

La secuencia de los elementos transgénicos contenidos en el genoma del maíz MON89034, ilustrada en la Figura 1, consiste en los siguientes elementos, cada uno unido operativamente con el otro. Primero, en el extremo de la secuencia denominado arbitrariamente 5' (es decir, cerca de a porción central izquierda del segmento ilustrado en la Figura 1) hay una porción de la región de borde derecho (RB) de *Agrobacterium tumefaciens*. Esta secuencia está seguida por un cassette de expresión que consiste en un elemento promotor mejorado CaMV 35S (conocido en la presente documentación como P-CaMV35Sen, localizado entre las posiciones 2350 y 2651 de SEQ ID N° 5); una secuencia directriz de la proteína de unión a clorofila A/B (conocida en la presente documentación como L-Ta.lhcb1, localizada entre las posiciones 2678 y 2738 de SEQ ID N° 5); una secuencia del intrón de actina de arroz (conocida en la presente documentación como I-Os.Act1, localizada entre las posiciones 2755 y 3234 de SEQ ID N° 5); una secuencia de ocurrencia no natural que codifica el gen quimérico Cry1A.105 (localizada entre las posiciones 3244 y 6777 de SEQ ID N°

5); y una región de terminación 3' de trigo (conocida en la presente documentación como T-Ta.Hsp17-1:1:1, localizada entre las posiciones 6809 y 7018 de SEQ ID N° 5). La combinación de los elementos mencionados con anterioridad, más allá de la secuencia de borde, permite que funcionen juntos en una planta de maíz para producir la expresión de la proteína insecticida Cry1A.105. Después, estos elementos se unen de forma consecutiva a otro cassette de expresión que consiste en los siguientes elementos: un promotor del virus en mosaico de la escrofularia (localizado entre las posiciones 7086 y 7649 de SEQ ID N° 5), una directriz Hsp70 de *Zea mays* (conocida en la presente documentación como HSP70 o I-Hsp70, localizada entre las posiciones 7672 y 8475 de SEQ ID N° 5), y una secuencia codificante de un péptido de tránsito a cloroplasto de *Zea mays* (conocido en la presente documentación como CTP2 o TS-SSU-CTP, localizado entre las posiciones 8492 y 8892 de SEQ ID N° 5). Después, estos segmentos unidos operativamente se unen a una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína insecticida Cry2Ab (localizada entre las posiciones 8893 y 10800 de SEQ ID N° 5), que está unida en su extremo 3' con una región 3' no traducida del gen de nopalina sintetasa de *Agrobacterium tumefaciens* (conocida en la presente documentación como T-AGRtu.nos-1:1:13, localizada entre las posiciones 10827 y 11377 de SEQ ID N° 5). Cuando están presentes en una planta de maíz, estos elementos que rodean la secuencia codificante Cry2Ab funcionan juntos para dirigir la expresión de Cry2Ab. La secuencia del cassette de expresión Cry2Ab está seguida por una secuencia de nucleótidos que consiste en una porción suficiente de la región de borde izquierdo (LB) de *Agrobacterium tumefaciens*.

Las moléculas de ADN útiles como cebadores en los métodos de amplificación de ADN pueden derivar de las secuencias de los elementos genéticos del inserto transgénico contenido en el evento MON89034. Estas moléculas cebadoras pueden usarse como parte de un conjunto de cebadores que también incluye una molécula cebadora de ADN derivada del genoma del evento que rodea el inserto transgénico.

La porción del ADN del plásmido pMON38850 insertado en el genoma de maíz que da lugar a la planta de maíz transgénica con el evento MON89034, que

consiste en segmentos de borde izquierdo y derecho, y dos cassettes de expresión vegetales unidos (un primer cassette de expresión que codifica Cry1A.105, y un segundo cassette de expresión que codifica Cry2Ab, donde resulta indistinto cuál cassette se conoce como primer o segundo cassette) entre los segmentos de borde, se caracterizó con análisis moleculares detallados. Estos análisis se realizaron para identificar los eventos que solamente contenían un segmento único e intacto, que consistía en los bordes y los dos cassettes de expresión deseados entre los bordes (cantidad de sitios de integración dentro del genoma de maíz), la cantidad de copias (la cantidad de copias de (T)-ADN de transformación en un locus) y la integridad de los cassettes genéticos insertados (es decir, la ausencia de cambios de disposición o variaciones de secuencia respecto de la secuencia conocida presente en el plásmido pMON38850). Se usaron sondas moleculares de ADN que incluyeron la región codificante intacta de Cry1A.105 y sus elementos reguladores respectivos, los promotores, los intrones y las secuencias de poliadenilación de los cassettes de expresión vegetales, y la región de esqueleto del plásmido pMON38850. Los datos obtenidos mediante el análisis de todos los eventos demostraron que MON89034 contiene una única inserción de ADN-T con una copia del cassette de expresión Cry1A.105. En el genoma de MON89034 no se detectaron elementos adicionales del vector de transformación pMON38850, unidos o no en cassettes genéticos intactos. Finalmente, se realizaron análisis de PCR y de secuenciación de ADN para determinar las uniones 5' y 3' entre el inserto y el genoma de la planta, confirmar la organización de los elementos en el inserto (véase, por ejemplo, la Figura 1), y determinar la secuencia completa del ADN insertado en el genoma de la planta de maíz que dio lugar al evento transgénico de maíz MON89034. La secuencia insertada completa, junto con una porción de las secuencias circundantes del genoma de maíz en cada extremo del ADN insertado, se ilustra en la secuencia indicada en SEQ ID N° 5.

Se extrajo ADN genómico de MON89034 y ADN no transgénico de maíz distinto de MON89034 (ADN control) a partir de semillas. Este procedimiento comprendió procesar primero la semilla (hasta 200 semillas) en un agitador de

pintura Harbil 5G-HD (Harbil Inc, Cincinnati, Ohio) hasta obtener un polvo fino. Brevemente, la semilla en polvo se extrajo en amortiguador de extracción (EM Science Cat. N° 3700, EM Science, Gibbstown, Nueva Jersey, EEUU), y se precipitó el ADN de la solución con isopropanol (Sigma Cat. N° I-0398, Sigma, St. Louis, MO, EEUU). El ADN precipitado se centrifugó en un tubo de microcentrífuga que contenía 70 por ciento de etanol. El ADN se precipitó en una microcentrífuga a velocidad máxima (aproximadamente 14000 rpm) por aproximadamente 5 minutos, se secó al vacío y se disolvió nuevamente en amortiguador TE (pH 8,0). Después, el ADN se almacenó en un refrigerador a 4°C. Aquél entrenado en la técnica puede modificar este método para extraer ADN de una única semilla de maíz.

Los ejemplos de métodos usados para identificar el evento MON89034 en una muestra se describen en una PCR TAQMAN® de punto terminal específica para el evento, y en la Tabla 1 y la Tabla 2 se detallan ejemplos de condiciones para dicha reacción. Los cebadores de ADN usados en el ensayo son los cebadores SQ2842 (SEQ ID N° 6), SQ2843 (SEQ ID N° 7), el cebador marcado 6FAM™ PB880 (SEQ ID N° 14) y el cebador marcado VIC™ PB2931 (SEQ ID N° 15), 6FAM y VIC son productos coloreados fluorescentes de Applied Biosystems (Foster City, CA) unidos a los cebadores de ADN. Para las sondas Taqman MGB, la actividad de 5'-exonucleasa de la ADN polimerasa Taq corta la sonda desde el extremo 5', entre el fluoróforo y la porción de fragua. Cuando hibridizan con la cadena de ADN blanco, el fluoróforo y la porción de fragua están suficientemente separados en el espacio tridimensional, para producir una señal fluorescente (longitud de onda de excitación del fluoróforo).

Cuando se usan en estos métodos de reacción con PB880 (SEQ ID N° 14), SQ2842 (SEQ ID N° 6) y SQ2843 (SEQ ID N° 7) producen un amplicón de ADN que sirve para diagnosticar la presencia del evento ADN de MON89034. Los controles de este análisis deberían incluir un control positivo de maíz que contuviera ADN del evento MON89034, un control negativo de maíz no transgénico o maíz transgénico distinto del evento MON89034, y un control negativo que no contuviera ADN molde.

Cuando se usan en estos métodos de reacción con PB351 (SEQ ID N° 21), SQ1564 (SEQ ID N° 17) y SQ1565 (SEQ ID N° 18) producen un amplicón que sirve para diagnosticar Cry1A.105 en MON89034.

Estos ensayos están optimizados para usar con un sistema de PCR Applied Biosystems GeneAmp 9700 o Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 5 9700, o un termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient. Aquellos entrenados en la técnica conocen otros métodos y aparatos para producir amplicones que permiten identificar ADN del evento MON89034.

Siempre que sea posible detectar la unión, cualquier sonda que se una 10 específicamente con SEQ ID N° 1, o con su secuencia perfectamente complementaria en una muestra biológica, y que contenga al menos 11 nucleótidos contigua, como se indica en SEQ ID N° 1, o según sea el caso, el complemento inverso de la secuencia de SEQ ID N° 1, servirá para diagnosticar la presencia de ADN del evento de maíz MON89034 en dicha muestra. Siempre que 15 sea posible detectar la unión, cualquier sonda que se una específicamente con SEQ ID N° 2, o con su secuencia perfectamente complementaria en una muestra biológica, y que contenga al menos 11 nucleótidos contigua, como se indica en SEQ ID N° 2, o según sea el caso, el complemento inverso de la secuencia de SEQ ID N° 2, servirá para diagnosticar la presencia de ADN del evento de maíz 20 MON89034 en dicha muestra.

Se considera que cualquier par de cebadores usados o diseñados para usar en la producción de un amplicón a partir de una muestra biológica que comprende ADN de maíz, donde el amplicón comprende a la SEQ ID N° 1 o SEQ ID N° 2, o según sea el caso, comprende ambas secuencias, está dentro del 25 alcance de la presente invención. Para los propósitos de la invención descrita en la presente documentación, se considera que cualquiera de estos amplicones que comprenden SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2 o ambos sirve para diagnosticar la presencia de ADN del evento de maíz MON89034 en dicha muestra biológica. A continuación se presentan meros ejemplos de estos amplicones.

208

Tabla 1. PCR de punto terminal TAQMAN® específica para el evento de maíz MON89034

Paso	Reactivo	Cantidad	Comentarios
1	Agua libre de nucleasa	Se agrega hasta obtener un volumen final de 10 µl	-
2	Mezcla maestra universal 2X (Applied Biosystems cat. # 4304437)	5 µl	concentración final 1x
3	Cebadores SQ2842 (SEQ ID N° 6) y SQ2843 (SEQ ID N° 7) suspendidos nuevamente en agua libre de nucleasa hasta una concentración de 20 µM cada uno	0,5 µl	concentración final: 1,0 µM
4	Cebador PB880 (SEQ ID N° 14) 6FAM™ (suspendido nuevamente en agua libre de nucleasa hasta una concentración de 10 µM)	0,2 µl	concentración final: 0,2 µM
5	Cebador de control interno SQ2842 y cebador de control interno SQ2843	0,2 µl	Concentración final: 0,2 µM

6	ADN extraído (molde): Muestras a analizar (hojas individuales) Control negativo Control negativo Control positivo Control positivo	3,0 µl 4-80 ng de ADN genómico 4 ng de ADN genómico de maíz no transgénico sin ADN molde (solución en la que se suspendió nuevamente el ADN) 4 ng de ADN genómico de maíz heterocigota del evento conocido MON89034 4 ng de ADN genómico de maíz homocigota del evento conocido MON89034	Diluido en agua
7	Se mezcla suavemente, se agregan 1-2 gotas de aceite mineral a cada reacción		

[0001] La amplificación de ADN se puede preparar y llevar a cabo utilizando cualquier medio para realizar ciclos térmicos, los que incluyen manipulaciones manuales o manipulaciones controladas electrónicamente de los pasos de temperatura y ciclos. Se utilizaron los cicladores térmicos Stratagene Robociclor, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700, o Eppendorf Mastercycler Gradient thermocicler o Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700 o MJ Research ADN Engine PTC-225 con éxito para conducir los siguientes parámetros de ciclado. Al realizar la PCR en el Eppendorf Mastercycler Gradient o MJ Engine, al termociclador se le hizo realizar los ciclos en el modo calculado. Al utilizar el Perkin-Elmer 9700, las

condiciones de ciclado se condujeron con la velocidad de rampa establecida al máximo.

Tabla 2. Condiciones de termociclado del ensayo de cigosidad

Ciclo N°	Parámetros: sistema de PCR Applied Biosystems GeneAmp 9700
1	50°C, 2 minutos
1	95°C, 10 minutos
10	95°C, 15 segundos 64°C, 1 minuto (-1°C/ciclo)
30	95°C, 15 segundos 54°C, 1 minuto
1	10°C de allí en adelante

Ejemplo 2

5 En este ejemplo se ilustra la identificación de una planta de maíz que comprende ADN diagnóstico del evento transgénico de maíz MON89034 en su genoma, y la determinación de la cigosidad de esta planta de maíz.

Los métodos usados para distinguir la progenie heterocigota y homocigota que contiene el evento ADN de MON89034 en su genoma se describen en un ensayo de cigosidad, cuyas condiciones se presentan a modo de ejemplo en la 10 Tabla 3 y la Tabla 4. Los ejemplos de cebadores de ADN usados en el ensayo de cigosidad son los cebadores SQ2842 (SEQ ID N° 6), SQ2843 (SEQ ID N° 7), SQ6523 (SEQ ID N° 10), SQ6524 (SEQ ID N° 11), el cebador marcado 6FAM™ PB880 (SEQ ID N° 14) y el cebador marcado VIC™ PB2931 (SEQ ID N° 15). 15 Como se mencionó con anterioridad, 6FAM y VIC son productos coloreados fluorescentes de Applied Biosystems (Foster City, CA) unidos al cebador de ADN.

Cuando se usan juntos en una reacción de amplificación térmica, donde una muestra biológica que contiene ADN molde contiene ADN que sirve para diagnosticar la presencia evento de maíz MON89034 en la muestra, SQ2842 20 (SEQ ID N° 6), SQ2843 (SEQ ID N° 7), SQ6523 (SEQ ID N° 10) y SQ6524 (SEQ ID N° 11) producen un amplicón de ADN diagnóstico de ADN de maíz distinto del ADN del evento de maíz MON89034 (independientemente del hecho de que el

ADN de maíz derive de una muestra no transgénica o de alguna otra muestra transgénica). Como alternativa, la reacción producirá dos amplicones de ADN diferentes a partir de una muestra biológica que contenga ADN derivado del genoma de un maíz que sea heterocigota para el alelo correspondiente al ADN insertado presente en el evento transgénico de maíz MON89034. Estos dos amplicones diferentes corresponderán a un primer amplicón, que deriva del locus genómico de maíz tipo salvaje, y un segundo amplicón, que sirve para diagnosticar la presencia de ADN del evento de maíz MON89034. Una muestra de ADN de maíz que solamente da lugar a un amplicón que corresponde al segundo amplicón descrito para el genoma heterocigota sirve para diagnosticar la presencia del evento de maíz MON89034 en la muestra, y sirve para determinar que el ADN de maíz usado como molde surge de una semilla de maíz que es homocigota para el alelo que corresponde al ADN del evento transgénico de maíz MON89034 insertado. Los controles de este análisis deberían incluir un control positivo de maíz homocigota y heterocigota que contuviera ADN del evento MON89034, un control negativo de maíz no transgénico o de cualquier otra variedad transgénica de maíz, y un control negativo que no contuviera ADN molde. Este ensayo está optimizado para usar con un dispositivo Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700, o un termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient. Aquellos entrenados en la técnica conocerán otros métodos y aparatos para producir amplicones que permitan identificar la cigosidad de la progenie de cruzamientos realizados con plantas MON89034.

Tabla 3. Soluciones de la reacción del ensayo de cigosidad

Paso	Reactivo	Cantidad	Comentarios
1	Agua libre de nucleasa	Se agrega hasta obtener un volumen final de 5 µl	-
2	Mezcla maestra universal 2X (Applied Biosystems cat. # 4304437)	2,5 µl	concentración final 1x

3	Cebadores SEQ ID N° 6, y SEQ ID N° 7 (suspendidos nuevamente en agua libre de nucleasa hasta una concentración de 20 µM)	0,05 µl	concentración final: 0,25 µM
4	Cebador PB880 SEQ ID N° 14 6FAM™ (suspendido nuevamente en agua libre de nucleasa hasta una concentración de 10 µM)	0,01 µl	concentración final: 0,4 µM
5	PB2931 SEQ ID N° 15 Primer VIC™ (suspendido nuevamente en agua libre de nucleasa hasta una concentración de 10 µM)	0,01 µl	concentración final: 0,15 µM
6	ADN polimerasa REDTaq (1 unidad/µl)	1,0 µl (se recomienda cambiar las pipetas antes del siguiente paso)	1 unidad/reacción

7	ADN extraído (molde): Muestras a analizar (hojas individuales) Control negativo Control negativo Control positivo Control positivo	2,0 µl 4-80 ng de ADN genómico 4 ng de ADN genómico de maíz no transgénico sin ADN molde (solución en la que se suspendió nuevamente el ADN) 4 ng de ADN genómico de maíz heterocigota del evento conocido MON89034 4 ng de ADN genómico de maíz homocigota del evento conocido MON89034	Diluido en agua
8	Se mezcla suavemente, se agregan 1-2 gotas de aceite mineral a cada reacción		

[0002] La amplificación de ADN en un termociclador Stratagene Robociclor, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700, o Eppendorf Mastercycler Gradient o Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700 o un termociclador MJ Research ADN Engine PTC-225 se utilizó con éxito para conducir los siguientes parámetros de ciclado. Al utilizar el Eppendorf Mastercycler Gradient o MJ Engine, los ciclos se condujeron en el modo calculado. Al utilizar el Perkin-Elmer 9700, los ciclos se condujeron con la velocidad de rampa establecida al máximo.

Tabla 4. Condiciones de termociclado del ensayo de cigosidad^a

Cantidad de ciclos en orden consecutivo	Temperatura y Duración
1	50°C, 2 minutos
1	95°C, 10 minutos
10	95°C, 15 segundos
	64°C, 1 minuto (-1°C/ciclo)
30	95°C, 15 segundos
	54°C, 1 minuto
1	10°C, impregnación

^ausando un sistema de PCR Applied Biosystems GeneAmp 9700

El 28 de Marzo de 2006, y de acuerdo con lo estipulado en el Tratado de Budapest, se depositaron semillas correspondientes al evento transgénico MON89034 en la Colección Americana de Tipos de Cultivo (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110. El número de acceso o la designación del depósito de patente ATCC es PTA-7455. El depósito se mantendrá en el depositario por un período de 30 años, o 5 años después del último pedido, o mientras dure la vida efectiva de la patente, cualquiera que se prolongue por más tiempo, y de ser necesario, será reemplazado en el transcurso de dicho período.

Habiéndose ilustrado y descrito los principios de la presente invención, será evidente para aquellos entrenados en la técnica que es posible modificar la disposición y los detalles de la invención sin apartarse de dichos principios. Se reivindican todas las modificaciones dentro del espíritu y el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Todas las publicaciones y los documentos de patentes publicadas citados en esta memoria descriptiva se incorporan en la presente documentación a modo de referencia, en la misma extensión en que se indicó la incorporación específica e individual a modo de referencia de cada publicación o solicitud de patente individual.

Reivindicaciones modificadas

1. Una molécula de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, o un complemento de la misma.
2. La molécula de ADN de la reivindicación 1, que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 o un complemento de la misma.
3. La molécula de ADN de la reivindicación 2, que consiste esencialmente en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:5 o un complemento de la misma.
4. Una célula de la planta de maíz transgénico que comprende a la molécula de ADN de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Una planta de maíz transgénico, o partes de la misma, que comprende a la molécula de ADN de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
6. Semilla de la planta de maíz transgénico de la reivindicación 5, donde dicha semilla comprende a dicha molécula de ADN.
7. Una planta de maíz transgénico, o partes de la misma, semillas de dicha planta de maíz que han sido depositadas en la American Type Culture Collection con el número de acceso PTA-7455.
8. Una planta de maíz resistente a los insectos, o partes de la misma, donde el ADN que codifica Cry2Ab y el ADN que tiene las secuencias de nucleótidos de la SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2 forman parte del genoma de las células de dicha planta de maíz o partes de la misma.
9. La planta de maíz resistente a los insectos, o partes de la misma, de la reivindicación 8, que comprende además comprende ADN que codifica Cry1A.105.
10. Semilla de la planta de maíz resistente a los insectos de la

reivindicación 8 ó 9, que comprende dicha semilla comprende dicho ADN que codifica Cry2Ab y dicho ADN tiene las secuencias de nucleótidos de la SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2.

11. Una composición derivada de la planta de maíz transgénico, o partes de la misma, según se establece en la reivindicación 5, donde dicha composición comprende una cantidad detectable de dicha molécula de ADN, y donde dicha composición es un producto básico que se selecciona entre el grupo que consiste en harina gruesa de maíz, aceite de maíz, torta de maíz [*subproducto de la extracción de aceite*], semilla de maíz, germen de maíz, almidón de maíz, harina de maíz, polen de maíz, barbas de maíz, licor de maíz fermentado, malta de maíz, azúcar de maíz, jarabe de maíz, margarina producida a partir de aceite de maíz, granos secos de destilería (DDGS, por "Distillers Dry Goods Solids"), cosméticos y agentes de carga.

12. Un método para producir una planta de maíz resistente a los insectos que comprende:

(a) cruzar la planta de maíz transgénico de la reivindicación 5 con otra planta de maíz;

(b) obtener por lo menos una planta de progenie derivada de la cruce de (a); y

(c) seleccionar la progenie que comprende secuencias de nucleótidos de la SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2, donde dicha progenie seleccionada es una planta de maíz resistente a los insectos.

13. El método de la reivindicación 12, donde dicho paso de seleccionar (c) incluye someter a dicha por lo menos una planta de progenie que se obtuvo de (b) a una reacción de amplificación de ácido nucleico, donde se selecciona la progenie que produce un amplicon que comprende por lo menos una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2, o someter a dicha por lo menos una planta de progenie que se obtuvo de (b) a una reacción de hibridización de ácido nucleico, donde se selecciona la progenie hibridizada con una sonda que hibridiza en condiciones severas a una o más secuencias de ADN que se seleccionan entre SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2.

14. Un método para producir una planta de maíz resistente a los insectos, que comprende

(a) transformar una célula de la planta de maíz con la molécula de ADN de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3; y

(b) regenerar una planta de maíz a partir de dicha célula transformada, donde dicha planta de maíz comprende dicha molécula de ADN y es resistente a los insectos.

15. Un método para proteger una planta de maíz de la infestación por insectos, que comprende proveer en la dieta de un lepidóptero que es una plaga del maíz una cantidad efectiva como insecticida de célula(s) o tejido(s) de la planta de maíz transgénico, o partes de la misma, de cualquiera de las reivindicaciones 5, 7, 8 y 9.

16. El método de la reivindicación 15, donde dicha plaga de lepidóptero se selecciona entre el grupo que consiste en gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*), barrenador europeo del maíz (*Ostrinia nubilalis*), isoca de la espiga del maíz (*Helicoverpa zea*), barrenador del maíz del sudoeste (*Diatraea grandiosella*), y oruga grasienta (*Agrotis ipsilon*).

17. Un par de moléculas de ADN que comprende: una primera molécula de ADN y una segunda molécula de ADN, donde las moléculas de ADN tienen una longitud de nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5 o su complemento, que es suficiente como para que funcionen como ADN cebadores o sondas diagnóstico del ADN que se extrae de la planta de maíz MON89034 o progenie de la misma.

18. El par de moléculas de ADN de la reivindicación 17, donde dicha primera molécula de ADN comprende 11 o más nucleótidos contiguos de cualquier porción de la región del transgen de la SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5, o un complemento de la misma, y dicha segunda molécula de ADN comprende una longitud similar de una región flanqueadora 5' del ADN genómico del maíz de la SEQ ID NO:3, o un complemento de la misma.

19. El par de moléculas de ADN de la reivindicación 18, donde dicha primera molécula de ADN comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos

complementarios a la porción del ADN heterólogo inserto de la SEQ ID NO:5, y donde dicha segunda molécula de ADN comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos a la porción del genoma de maíz de la SEQ ID NO:3.

20. El par de moléculas de ADN de la reivindicación 18, donde dicha primera molécula de ADN hibridiza específicamente a la SEQ ID NO:5 aproximadamente desde la posición 2060 del nucleótido hasta aproximadamente la posición 12.208 del nucleótido, y donde dicha segunda molécula de ADN se hibridiza específicamente con la secuencia complementaria inversa correspondiente a la SEQ ID NO:3 aproximadamente desde la posición 1 del nucleótido hasta aproximadamente la posición 2050.

21. Un par de moléculas de ADN que comprende: una primera molécula de ADN y una segunda molécula de ADN, donde las moléculas de ADN tienen una longitud de nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:5 o su complemento, suficiente como para funcionar como ADN cebadores o sondas diagnóstico del ADN que se extrae de la planta de maíz MON89034 o progenie de la misma.

22. El par de moléculas de ADN de la reivindicación 21, donde dicha primera molécula de ADN comprende 11 o más nucleótidos contiguos de cualquier porción de la región del transgen de la SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:5, o un complemento de la misma, y dicha segunda molécula de ADN comprende una longitud similar de una región flanqueadora 3' del ADN genómico de maíz de la SEQ ID NO:4, o un complemento de la misma.

23. El par de moléculas de ADN de la reivindicación 22, donde dicha primera molécula de ADN comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos a la porción del ADN heterólogo inserto de la SEQ ID NO:5, y donde dicha segunda molécula de ADN comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos complementaria a la porción del genoma de maíz de la SEQ ID NO:4.

24. El par de moléculas de ADN de la reivindicación 22, donde dicha primera molécula de ADN hibridiza específicamente a la secuencia

complementaria inversa correspondiente a la SEQ ID NO:5 aproximadamente desde la posición 1 del nucleótido hasta aproximadamente la posición 11305, y donde dicha segunda molécula de ADN hibridiza específicamente a la SEQ ID NO:4 aproximadamente desde la posición del nucleótido 21 hasta aproximadamente la posición 914 del nucleótido.

25. El par de moléculas de ADN de cualquiera de las reivindicaciones 17 a 24, donde dicha primera molécula de ADN comprende a la SEQ ID NO:6 y dicha segunda molécula de ADN comprende a la SEQ ID NO:7.

26. Un método para detectar la presencia de una molécula de ADN que se selecciona entre el grupo que consiste en SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, y SEQ ID NO:5 en una muestra biológica, donde el método comprende:

(a) poner en contacto dicha muestra biológica con un par de cebadores de ADN que comprende moléculas de ADN con una longitud de nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:3 o su complemento, SEQ ID NO:4 o su complemento, SEQ ID NO:5 o su complemento, suficiente como para que puedan funcionar como ADN cebadores o sondas diagnóstico del ADN que se extrae de la planta de maíz MON89034 o progenie de la misma;

(b) proveer condiciones de reacción de amplificación de ácido nucleico;

(c) llevar a cabo dicha reacción de amplificación de ácido nucleico, produciendo de esa manera un amplicon de molécula de ADN; y

(d) detectar dicho amplicon de molécula de ADN, donde la detección de un amplicon que comprende por lo menos una de la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 y complementos de las mismas es un indicador de la presencia de dicha molécula de ADN en dicha muestra biológica.

27. El método de la reivindicación 26, donde dicha muestra biológica es una muestra de ADN que se extrae de una planta de maíz.

28. Un método para detectar la presencia de una molécula de ADN que se selecciona entre el grupo que consiste en SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:5 en una muestra biológica, donde el método comprende:

(a) poner en contacto dicha muestra biológica con una sonda de

ADN que se hibridiza en condiciones severas con dicha molécula de ADN, y no se hibridiza en las condiciones severas con una muestra biológica que no contiene dicha molécula de ADN;

(b) someter a dicha muestra biológica y sonda de ADN a condiciones de hibridización severas; y

(c) detectar la hibridización de dicha sonda de ADN en dicha muestra biológica, donde la detección de la hibridización es un indicador de la presencia de dicha molécula de ADN en dicha muestra biológica.

29. El método de la reivindicación 28, donde dicha muestra biológica es una muestra de ADN que se extrae de una planta de maíz.

30. El método de la reivindicación 28 o 29, donde dicha sonda de ADN comprende a la SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2 o a un complemento de la misma.

31. El método de las reivindicaciones 28 a 30, donde dicha sonda de ADN se marca con por lo menos un fluoróforo.

32. El método de la reivindicación 26 ó 28, donde dicha muestra biológica se selecciona entre el grupo que consiste en harina gruesa de maíz, aceite de maíz, torta de maíz [*subproducto de la extracción de aceite*], semilla de maíz, germen de maíz, almidón de maíz, harina de maíz, polen de maíz, barbas de maíz, licor de maíz fermentado, malta de maíz, azúcar de maíz, jarabe de maíz, margarina producida a partir de aceite de maíz, granos secos de destilería (DDGS, por "Distillers Dry Goods Solids"), cosméticos y agente de carga.

33. Un conjunto de elementos para la detección de ADN que comprende: por lo menos una molécula de ADN con una longitud de nucleótidos contiguos homólogos o complementarios a las SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, o SEQ ID NO:5 suficiente como para funcionar como ADN cebador o sonda específicos para el evento MON89034 de maíz y/o su progenie.

34. El conjunto de elementos para la detección de ADN de la

reivindicación 33, donde dicha por lo menos una molécula de ADN comprende a la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, o un complemento de la misma.

35. El conjunto de elementos para la detección de ADN de la reivindicación 34, donde dicha por lo menos una molécula de ADN es SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, o un complemento de la misma.

36. El conjunto de elementos para la detección de ADN de la reivindicación 33, donde dicho conjunto de elementos comprende un par de moléculas de ADN de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 25.

37. Un método para determinar la cigosidad del ADN de una planta de maíz que comprende al evento MON89034 de maíz en una muestra biológica que comprende:

(a) poner en contacto dicha muestra con un primer conjunto que comprende a la SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, y SEQ ID NO:10, que (1) cuando se utiliza en una reacción de amplificación de ácido nucleico que comprende ADN del evento MON89034 de maíz, produce un primer amplicon que es diagnóstico del evento MON89034 de maíz, y (2) cuando se utiliza en una reacción de amplificación de ácido nucleico que comprende ADN genómico de maíz diferente del ADN de MON89034, produce un segundo amplicon que es diagnóstico del ADN genómico de maíz diferente del ADN de MON89034;

(b) llevar a cabo una reacción de amplificación de ácido nucleico; y

(c) detectar los amplicones que se producen de dicha manera, donde la detección de la presencia de ambos amplicones indica que dicha muestra es heterocigota para el ADN del evento MON89034 de maíz, donde la detección de solo el primer amplicon indica que dicha muestra es homocigota para el ADN del evento MON89034 de maíz.

38. El método de la reivindicación 37, donde dicho primer conjunto se utiliza además junto con las SEQ ID NO:14 y SEQ ID NO:15.

27

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> MONSANTO TECHNOLOGY LLC
GROAT, JEANNA
JOHNSON, SCOTT
KELLY, REBECCA
KORTE, JOHN
RICE, JAMES
ANDERSON, HEATHER

<120> PLANTA Y SEMILLA DE MAÍZ CORRESPONDIENTES AL EVENTO TRANSGÉNICO
MON89034, Y MÉTODOS PARA SU DETECCIÓN Y USO

<130> 11899.0260.00PC.00

<150> PCT/US2007/069662

<151> 2007-05-24

<150> 60/808,834

<151> 2006-05-26

<160> 22

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 21

<212> ADN

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> SECUENCIA DE UNIÓN 5'; corresponde a SEQ ID NO:5 en 2051-2071

<400> 1

aatgagtatg atggatcagc a 21

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> SECUENCIA DE UNIÓN 3'; corresponde a SEQ ID NO:5 en 11295-11314

<400> 2

actcattgca tccccgaaa 20

<210> 3

<211> 2071

<212> ADN

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> SECUENCIA CIRCUNDANTE 5' MÁS UNIÓN;

corresponde a SEQ ID NO:5 en 1-2071

<400> 3

```

aatatttaaa aatggaagta atactatatt aaaatgattc atgtggaact cctgcgcttc      60
tttttgaagt ttcaaaaggg agctttcagg gtcgcttaga gtttgtttg ttggaatac      120
aagcgaagaa agagctaatt agggggacat ccatattttc tatggtgttt gaataagagt      180
cacgcgggaa taagatgaac accgaaacaa tttttttgta gctacgtggt tccaaaaaat      240
cgagtagacg gtgtcgcttc cacctcatal tacttcaacc tcaaaccaca catccttacg      300
cgcccccgcg tgtctccgtc gtctcaagtt ctcaacatal ctacacatgt aaccactacc      360
ggtctttgtc atgtttcgaa agaagattac aggtcctcta gaagagagga cgcgggggtg      420
cgagaaagct ggggaagaaa aaggctagta catatgattg gtctgtgaac ctgtgaggtg      480
ggtaggtagg taggtggaga tttttgttaa ctggtgttgt tgacggactc gaacggggcc      540
gggcgtgtgg tgtggctagc tgtggtggtt tgctcgccag ccagccagcc acacatcagc      600
gagcatgcag agcttaagca tgtatgtacg gatcggcttg cttagcggtt aagggtgtgt      660
ttggtttggc ttttggtttt ggcttttgcc ccctaaaagc caaaagccaa ccaaggggtg      720
atgtgtttg acttttggtt ttttggtttt gtccctaaa agccaaaagc caaacaaggg      780
gttagatcta ggaagcagct ttttctaaaa gctggctttc tcacagtga aatctgaaag      840
caccctgaa cctgctttta gtggcttttc gaatggaact gtgaaaacat atatcgaaag      900
acttttaacg acttttagtg gtttccacca aacagtttag ctttttaacg gcttacagcc      960
tacaacagct ttttccacag ctacagccc acagcaactt tttcacagc cacagcccaa     1020
ccaaacagac cccaaagggc tgaatccagg aagcagcttt ttctaaaagc cgactttctc     1080
gtagtgtaaa actgaaaaca ccctggacc tgcttttagt ggcttttgga tggaaactgtg     1140
aaaacatata tcgaagaact tttaacgact tttagtgggt tccaccaaag gatttctagc     1200
tttttaacag cacacagcct acaacagctt ttttcacagc tcacagccca caacaacttt     1260
ttctacagcc acaacccaac caaacggacc ctaaggcggc cgagcgagcg caaagcgtcg     1320
tcagctttga ttgccatgcc atctcctgct ccacttgtct ctctggccgt cgtcagccac     1380
catccaacaa ggccggtgct actggcggct cctaggtaga cgacgacgac gacgacacct     1440
ccaccgttcg ccgcggtcca ctaccaatc aacacggaac gcccaaaaac cacacacagc     1500
cacgctgggg agggaaaaaa aggcagagac atatgcgtgc gtcgctgcat tattgtacgc     1560
gatcgaatgg catctctctc actctctctc ctccctttat taatctggta ctggctagct     1620
ggtccggcga caccgacgtg tcagctccgt cgcgcgcgtc cgtccgtccg ctggagcgga     1680
cacggaccgc ggcgtctgtc gatcgccggc tcgcgcgagc gcagctacct agcacgctca     1740
cgcatgctac actgcctaca cgcacacggc cggcccaaaa gcgttccctg ccgcctgccg     1800
gccggctttt ttattattat tggaaacatga ggctatttct cctccacac gggctacgac     1860
gtgagcacga gtactgggat ccccgatcc gccctctctg tccctgctgc tactccagcc     1920
actgaaatgt tgtcagatga aacagcagag ccgatctccg cacggaacc catgcacggc     1980

```

224

cattcaaatt caggtgceca cgtacgtcag ggtgctgctg ctactactat caagccaata 2040
 aaaggatggt aatgagtatg atggatcagc a 2071

<210> 4

<211> 914

<212> ADN

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> SECUENCIA CIRCUNDANTE 3' MÁS UNIÓN;
 corresponde a SEQ ID NO:5 en 11295-12208

<400> 4

actcattgca tccccgaaa ttatgttttt ttaaaaacca cggattata gataccgtgt 60
 tattttttga gtattgaaa ttccatttca acccaaagtt tcttcatggc acatctagct 120
 ttgctaata accatgtagg gctacatctt aaaaatctat actactatat taaagctgca 180
 ggggtagcct gtctccacct ggttctgcct cgagccaatc taaaccgtcc atctatatcc 240
 atcaaatcag caccgtccgg tccgtgcgca cctcctctcc cgctattcag ttgcatactt 300
 gcagcaggtt ctccctctct accatttctt ctgcctctct tctcgtcac tggtcagatt 360
 catcctgcct ctcccgcatg cgctccctcc ccattgcccc tctcgcaacta tcgccacacc 420
 tcaccgcggg gagacgaaga cgggtggacg atcctcacct cctccgctag ttgtcgtctt 480
 tccatcctct tcaacaactt ctacataggg agaggcgggt cggcgtcccg acgcgcgcgc 540
 ttctccctct cccatggagg acgagaacat cgacctcggc ggcgggggcg atgcctccgc 600
 tctgcataga ggagggttgt agtggcaagc agcaatgcca acaccgaggc gggccaagac 660
 taggcaacaa taggacggca cggccggttg tcagcgaggt ggcggcatcg tgtgccccta 720
 ccgaacaaca tctccggcgc tggagtcggt gagttactgc gccacccgga cgccctcaat 780
 gcactgatat ctaccgggtc tccatcgccg cccttccctc ctccctctct cctgtgcctc 840
 cctctcttgc cctctccctt ccaactgctc ccgccccagc cctagcccaa ccacctccc 900
 cgcagggtca ccaa 914

<210> 5

<211> 12208

<212> ADN

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> SECUENCIA CIRCUNDANTE 5' MAS SECUENCIA DE ADN INSERTADA MAS
 SECUENCIA CIRCUNDANTE 3'

<400> 5

aatattttaa aatggaagta atactatatt aaaatgattc atgtggaact cctgcgcttc 60
 tttttgaagt ttcaaaaggg agctttcagg gtcgcttaga gtttgtttgg ttggaaatac 120
 aagcgaaaag agagctaatt agggggacat ccatattttc tatggtgttt gaataagagt 180

cacgcgggaa taagatgaac accgaaacaa tttttttgta gctacgtggt tccaaaaaat	240
cgagtagacg gtgtcgcttc cacctcatat tacttcaacc tcaaaccaca catccttacg	300
cgcccgccgg tgtctccgtc gtctcaagtt ctcaacatac ctacacatgt aaccactacc	360
ggtctttgtc atgtttcgaa agaagattac aggtcctcta gaagagagga cgcggggtgg	420
cgagaaagct ggggaagaaa aaggctagta catatgattg gtctgtgaac ctgtgaggtg	480
ggtaggtagg taggtggaga tttttgttaa ctgggtgttg tgacggactc gaacggggcc	540
gggcgtgtgg tgtggctagc tgtggtggtt tgctcgccag ccagccagcc acacatcagc	600
gagcatgcag agcttaagca tgtatgtacg gatcggttg cttagcggtt aagggtgtgt	660
ttggtttggc ttttggcttt ggcttttgcc ccctaaaagc caaaagccaa ccaagggtgt	720
atttggtttg acttttggct tttggctttt gtcccctaaa agccaaaagc caaacaagg	780
gttagatcta ggaagcagct ttttctaaaa gctggctttc tcacagtgc aatctgaaag	840
caccctgaa cctgctttta gtggcttttc gaatggaact gtgaaaacat atatcgaaga	900
acttttaacg acttttagtg gtttccacca aacagtttag ctttttaacg gcttacagcc	960
tacaacagct ttttccacag ctacagccc acagcaactt ttttccacag cacagcccaa	1020
ccaaacagac cccaaagggc tgaatccagg aagcagcttt ttctaaaagc cgactttctc	1080
gtagtgtaaa actgaaaaca ccctggacc tgcttttagt ggcttttga tggaactgtg	1140
aaaacatata tcgaagaact ttaacgact tttagtgtt tccaccaaac gatttctagc	1200
tttttaacag cacacagcct acaacagctt ttttccacag tcacagccca caacaacttt	1260
ttctacagcc acaacccaac caaacggacc ctaaggcggc cgagcgagcg caaagcgtcg	1320
tcagctttga ttgccatgcc atctcctgct ccacttgtct ctctggcgt cgtcagccac	1380
catccaacaa ggccggtgct actggcggct cctaggtaga cgacgacgac gacgacacct	1440
ccaccgttcg cgccgtcca ctcaccaatc aacacggaac gcccaaaaca cacacacag	1500
cacgctgggg agggaaaaaa aggcagagac atatgctgct gtcgctgcat tattgtacgc	1560
gatcgaatgg catctctctc actctctctc ctccctttat taatctggta ctggctagct	1620
ggtccggcga caccgacgtg tcagctccgt cgccgcgcgc cgtccgtccg ctggagcgga	1680
cacggaccgc ggcgtctgtc gatcgccggc tcgccgcagc gcagctacct agcacgctca	1740
cgcagtctac actgcctaca cgcacacggc cgccccaaaa gcgttccttg ccgcctgccg	1800
gccggctttt ttattattat tggaacatga ggctatttct cctcccacac gggctacgac	1860
gtgagcacga gtactgggat ccccggatcc gccctctctg tccctgctgc tactccagcc	1920
actgaaatgt tgtcagatga aacagcagag ccgatctccg cacggaaacc catgcacggc	1980
cattcaaatt caggtgccca cgtacgtcag ggtgctgctg ctactactat caagccaata	2040
aaaggatggt aatgagtatg atggatcagc aatgagtatg atggtcaata tggagaaaaa	2100
gaaagagtaa ttaccaatth tttttcaatt caaaaatgta gatgtccgca gcgttattat	2160
aaaatgaaag tacattttga taaaacgaca aattacgac cgtcgtatth ataggcgaaa	2220
gcaataaaca aattattcta attcggaaat ctttatttct acgtgtctac attcacgtcc	2280
aaatgggggc ttagatgaga aacttcacga tttggcgcgc caaagcttgg tcgagtggaa	2340
gctagctttc cgatcctacc tgtcacttca tcaaaaggac agtagaaaag gaagggtggct	2400

cctacaaatg	ccatcattgc	gataaaggaa	aggccatcgt	tgaagatgcc	tctgcccaca	2460
gtggtcccaa	agatggaccc	ccacccacga	ggagcatcgt	ggaaaaagaa	gacgttccaa	2520
ccacgtcttc	aaagcaagtg	gattgatgtg	atatctccac	tgacgtaagg	gatgacgcac	2580
aatcccacta	tccttcgcaa	gacccttcct	ctatataagg	aagttcatTT	catttgagaa	2640
ggacacgctg	acaagctgac	tctagcagat	cctctagaac	catcttccac	acactcaagc	2700
cacactattg	gagaacacac	agggacaaca	caccataaga	tccaaggagag	gcctccgccc	2760
ccgcccgtta	ccaccccgcc	cctctcctct	ttctttctcc	gttttttttt	ccgtctcggt	2820
ctcgatcttt	ggccttggtg	gtttgggtgg	gcgagaggcg	gcttcgtgcg	cgcccagatc	2880
ggtgcgcggg	aggggcgggg	tctcgcggct	ggggctctcg	ccggcgtgga	tccggcccgg	2940
atctcgcggg	gaatggggct	ctcggatgta	gatctgcgat	ccgccgttgt	tgggggagat	3000
gatggggggg	ttaaaatttc	cgccgtgcta	aacaagatca	ggaagagggg	aaaagggcac	3060
tatggtttat	atTTTTatat	atttctgctg	cttcgtcagg	cttagatgtg	ctagatcttt	3120
ctttcttctt	tttgtgggta	gaatttgaat	ccctcagcat	tgttcatcgg	tagtttttct	3180
tttcatgatt	tgtgacaaat	gcagcctcgt	gcgagagcttt	ttttaggta	gaagtgatca	3240
accatggaca	acaacccaaa	catcaacgag	tgcattcccgt	acaactgcct	cagcaaccct	3300
gaggtcgagg	tgctcggcgg	tgagcgcata	gagaccggtt	acacccccat	cgacatctcc	3360
ctctccctca	cgcagttcct	gctcagcgag	ttcgtgccag	gcgctggctt	cgctctgggc	3420
ctcgtggaca	tcatctgggg	catctttggc	ccctcccagt	gggacgcctt	cctggtgcaa	3480
atcgagcagc	tcatcaacca	gaggatcgag	gagttcgcca	ggaaccaggc	catcagccgc	3540
ctggaggggc	tcagcaacct	ctaccaaata	tacgctgaga	gcttccgcga	gtgggaggcc	3600
gaccccaacta	accagctctt	ccgcgaggag	atgcgcattc	agttcaacga	catgaacagc	3660
gccttgacca	ccgccatccc	actcttcgcc	gtccagaact	accaagtccc	gctcctgtcc	3720
gtgtacgtcc	aggccgccaa	cctgcacctc	agcgtgctga	gggacgtcag	cgtgtttggc	3780
cagaggtggg	gcttcgacgc	cgcaccatac	aacagccgct	acaacgacct	caccaggctg	3840
atcggaact	acaccgacca	cgctgtccgc	tggtaacaac	ctggccgtcc	tggacattgt	3900
gtccctcttc	ccgaactacg	actcccgcac	ctaccggatc	cgcaccgtgt	cccaactgac	3960
ccgcgaaatc	tacaccaacc	ccgtcctgga	gaacttcgac	ggtagcttca	ggggcagcgc	4020
ccagggcatc	gagggctcca	tcaggagccc	acacctgatg	gacatcctca	acagcatcac	4080
tatctacacc	gatgccacc	gcggcgagta	ctactggctc	ggccaccaga	tcatggcctc	4140
cccggctcgg	ttcagcggcc	ccgagtttac	ctttcctctc	tacggcacga	tgggcaacgc	4200
cgctccacaa	caacgcattc	tcgctcagct	gggccagggc	gtctaccgca	ccctgagctc	4260
caccctgtac	cgcaggccct	tcaacatcgg	tatcaacaac	cagcagctgt	ccgtcctgga	4320
tggcactgag	ttcgcctacg	gcacctcctc	caacctgccc	tccgctgtct	accgcaagag	4380
cggcacgggtg	gattcccttg	acgagatccc	accacagaac	aacaatgtgc	ccccaggcca	4440
gggtttttcc	cacaggctca	gccacgtgtc	catgttccgc	tccggcttca	gcaactcgtc	4500
cgtgagcatc	atcagagctc	ctatgttctc	ttggatacac	cgtagtgtctg	agttcaacaa	4560
catcattgca	tccgacagca	ttactcaaat	acccttggtg	aaagcacata	cacttcagtc	4620

aggtactact	gttggtcagag	gtccaggggtt	tacaggagga	gacattcttc	gtcgcacaag	4680
tggaggaccc	tttgcttaca	ctattgttaa	catcaatggc	caattgcccc	aaaggtatcg	4740
tgcaagaatc	cgctatgcct	ctactacaaa	tctcaggatc	tacgtgactg	ttgcagggtga	4800
aaggatcttt	gctggtcagt	tcaacaagac	tatggatacc	ggtgaccctt	tgacattcca	4860
atcttttagc	tacgcaacta	tcaacacagc	ttttacattc	ccaatgagcc	agagtagctt	4920
cacagtaggt	gctgacactt	tcagctcagg	gaatgaagtt	tacatcgaca	ggtttgaatt	4980
gattccagtt	actgcaaccc	tcgaggctga	gtacaacctt	gagagagccc	agaaggctgt	5040
gaacgccttc	tttacctcca	ccaatcagct	tggcttgaaa	actaacgtta	ctgactatca	5100
cattgaccaa	gtgtccaact	tggtcaccta	ccttagcgat	gagttctgcc	tcgacgagaa	5160
gcgtgaactc	tccgagaaa	ttaaaccacgc	caagcgtctc	agcgacgaga	ggaatctctt	5220
gcaagactcc	aacttcaaag	acatcaacag	gcagccagaa	cgtggttggg	gtggaagcac	5280
cgggatcacc	atccaaggag	gcgacgatgt	gttcaaggag	aactacgtca	ccctctccgg	5340
aactttcgac	gagtgtctacc	ctacctactt	gtaccagaag	atcgatgagt	ccaaactcaa	5400
agccttcacc	aggtatcaac	ttagaggcta	catcgaagac	agccaagacc	ttgaaatcta	5460
ctcgatcagg	tacaatgcca	agcacgagac	cgtgaatgtc	ccagggtactg	gttccctctg	5520
gccactttct	gccaatctc	ccattgggaa	gtgtggagag	cctaacagat	gcgctccaca	5580
ccttgagtgg	aatcctgact	tggactgtc	ctgcagggat	ggcgagaagt	gtgccacca	5640
ttctcatcac	ttctccttgg	acatcgatgt	gggatgtact	gacctgaatg	aggacctcgg	5700
agtctgggtc	atcttcaaga	tcaagaccca	agacggacac	gcaagacttg	gcaaccttga	5760
gtttctcgaa	gagaaacat	tggtcggtga	agctctcgct	cgtgtgaaga	gagcagagaa	5820
gaagtggagg	gacaaacgtg	agaaactcga	atgggaaact	aacatcgttt	acaaggaggc	5880
caaagagtcc	gtggatgctt	tgttcgtgaa	ctcccaatat	gatcagttgc	aagccgacac	5940
caacatcgcc	atgatccacg	ccgcagacaa	acgtgtgcac	agcattcggtg	aggcttactt	6000
gcctgagttg	tccgtgatcc	ctggtgtgaa	cgctgccatc	ttcgagggaac	ttgagggacg	6060
tatctttacc	gcattctcct	tgtacgatgc	cagaaacgtc	atcaagaacg	gtgacttcaa	6120
caatggcctc	agctgctgga	atgtgaaagg	tcattgtggac	gtggaggaac	agaacaatca	6180
gcgttccgtc	ctggttgtgc	ctgagtggga	agctgaagtg	tccaagagg	ttagagtctg	6240
tccaggtaga	ggctacattc	tccgtgtgac	cgcttacaag	gagggatacg	gtgaggggtt	6300
cgtgaccatc	cacgagatcg	agaacaacac	cgacgagctt	aagttctcca	actgcgtcga	6360
ggaagaaatc	tatcccaaca	acaccgttac	ttgcaacgac	tacactgtga	atcaggaaga	6420
gtacggaggt	gcctacacta	gccgtaacag	aggttacaac	gaagctcctt	ccgttcctgc	6480
tgactatgcc	tccgtgtacg	aggagaaatc	ctacacagat	ggcagacgtg	agaacccttg	6540
cgagttcaac	agaggttaca	gggactacac	accacttcca	gttggctatg	ttaccaagga	6600
gcttgagtac	tttcctgaga	ccgacaaagt	gtggatcgag	atcggtgaaa	ccgaggggaac	6660
cttcatcggtg	gacagcgtgg	agcttctctt	gatggaggaa	taatgagatc	tatcgattct	6720
agaaggcctg	aattctgcat	gcgtttggac	gtatgctcat	tcaggttgga	gccaatattg	6780
ttgatgtgtg	tgcgagttct	tgcgagtctg	atgagacatc	tctgtattgt	gtttctttcc	6840

ccagtgtttt	ctgtacttgt	gtaatcggct	aatcgccaac	agattcggcg	atgaataaat	6900
gagaaataaa	ttgtttctgat	tttgagtgc	aaaaaaaaagg	aattagatct	gtgtgtgttt	6960
tttggatccc	cggggcggcc	gcgttaacaa	gcttgagctc	aggatttagc	agcattccag	7020
attgggttca	atcaacaagg	tacgagccat	atcactttat	tcaaattggg	atcgccaaaa	7080
ccaagaagga	actcccatcc	tcaaaggttt	gtaaggaaga	attctcagtc	caaagcctca	7140
acaaggtcag	ggtacagagt	ctccaaacca	ttagccaaaa	gctacaggag	atcaatgaag	7200
aatcttcaat	caaagtaaac	tactgttcca	gcacatgcat	catggtcagt	aagtttcaga	7260
aaaagacatc	caccgaagac	ttaaagttag	tgggcatctt	tgaaagtaat	cttgtcaaca	7320
tcgagcagct	ggcttgtggg	gaccagacaa	aaaaggaatg	gtgcagaatt	gttaggcgca	7380
cctacaaaaa	gcatctttgc	ctttattgca	aagataaagc	agattcctct	agtacaagtg	7440
gggaacaaaa	taacgtggaa	aagagctgtc	ctgacagccc	actcactaat	gcgtatgacg	7500
aacgcagtga	cgaccacaaa	agaattccct	ctatataaga	aggcattcat	tcccatttga	7560
aggatcatca	gatactcaac	caatccttct	aggatctacc	gtcttcggta	cgcgctcact	7620
ccgccctctg	cctttgttac	tgccacgttt	ctctgaatgc	tctcttgtgt	ggtgattgct	7680
gagagtgggt	tagctggatc	tagaattaca	ctctgaaatc	gtgttctgcc	tgtgctgatt	7740
acttgccgtc	ctttgtagca	gcaaaatata	gggacatggg	agtacgaaac	gaagatagaa	7800
cctacacagc	aatacagaaa	atgtgtaatt	tgggtgcttag	cggatattat	ttaagcacat	7860
gttggtgtta	tagggcactt	ggattcagaa	gtttgctgtt	aatttaggca	caggcttcat	7920
actacatggg	tcaatagtat	agggattcat	attataggcg	atactataat	aatttgttgc	7980
tctgcagagc	ttattatttg	ccaaaattag	atattcctat	tctgtttttg	tttgtgtgct	8040
gttaaattgt	taacgcctga	aggaataaat	ataaatgacg	aaattttgat	gtttatctct	8100
gctcctttat	tgtgaccata	agtcaagatc	agatgcactt	gttttaata	ttgttgtctg	8160
aagaaataag	tactgacagt	attttgatgc	attgatctgc	ttgtttgttg	taacaaaatt	8220
taaaaaataa	gagtttcctt	tttgttgctc	tccttacctc	ctgatgggat	ctagtatcta	8280
ccaactgaca	ctatattgct	tctctttaca	taogtatctt	gctcgatgcc	ttctccctag	8340
tgttgaccag	tgttactcac	atagcttttg	ctcatttcat	tgtaatgcag	ataccaagcg	8400
gcctctagag	gatcagcatg	gcgcccaccg	tgatgatggc	ctcgtcggcc	accgccgtcg	8460
ctccgttcca	ggggctcaag	tccaccgcca	gcctcccgt	cgcgcggcg	tcctccagaa	8520
gcctcggcaa	cgtcagcaac	ggcggaagga	tccgggtgcat	gcaggttaaca	aatgcacctt	8580
agctagtagt	tctttgcatt	gcagcagctg	cagctagcga	gttagtaata	ggaaggggaa	8640
tgatgatcca	tgcatggact	gatgtgtgtt	gcccattcca	tcccatttcc	caaccccaaa	8700
cgaacaaaaa	cacacgtact	acgtgcaggt	gtggccggcc	tacggcaaca	agaagttcga	8760
gacgctgtcg	tacctgccgc	cgtgtctgac	cggcggggcg	atccgctgca	tgcaggccat	8820
ggacaactcc	gtcctgaact	ctggtcgcac	caccatctgc	gacgcctaca	acgtcgcggc	8880
gcatgatcca	ttcagcttcc	agcacaagag	cctcgacact	gttcagaagg	agtggacgga	8940
gtggaagaag	aacaaccaca	gcctgtacct	ggaccccatc	gtcggcacgg	tggccagctt	9000
ccttctcaag	aagggtcggct	ctctcgtcgg	gaagcgcac	ctctcgggaa	tccgcaacct	9060

gatctttcca	tctgggtcca	ccaacctcat	gcaagacatc	ctcagggaga	ccgagaagtt	9120
tctcaaccag	cgcttcaaca	ctgataccct	tgctcgcttc	aacgctgagc	tgacgggtct	9180
gcaagcaaac	gtggaggagt	tcaaccgcca	agtggacaac	ttcctcaacc	ccaaccgcaa	9240
tgcggtgcct	ctgtccatca	cttcttccgt	gaacaccatg	caacaactgt	tcctcaaccg	9300
cttgctcag	ttccagatgc	aaggctacca	gctgctcctg	ctgccactct	ttgctcaggc	9360
tgccaacctg	cacctctcct	tcattcgtga	cgtgatcctc	aacgctgacg	agtggggcat	9420
ctctgcagcc	acgctgagga	cctaccgcga	ctacctgaag	aactacacca	gggactactc	9480
caactattgc	atcaaacact	accagtcggc	cttcaagggc	ctcaatacga	ggcttcacga	9540
catgctggag	ttcaggacct	acatgttcct	gaacgtgttc	gagtacgtca	gcatctggtc	9600
gctcttcaag	taccagagcc	tgctggtgtc	cagcggcgcc	aacctctacg	ccagcggctc	9660
tggtcccaa	caaactcaga	gcttcaccag	ccaggactgg	ccattcctgt	attcgttgtt	9720
ccaagtcaac	tccaactacg	tcctcaacgg	cttctctggg	gctcgctctc	ccaacacctt	9780
cccaacatt	gttggcctcc	cgggtccac	cacaactcat	gctctgcttg	ctgccagagt	9840
gaactactcc	ggcggtatct	cgagcggcga	cattggtgca	tcgccgttca	accagaactt	9900
caactgctcc	accttctgc	cgccgtgct	caccccgttc	gtgaggtcct	ggctcgacag	9960
cggctccgac	cgcgagggcg	tggccaccgt	caccaactgg	caaaccgagt	ccttcgagac	10020
caccttggc	ctccggagcg	gcgccttcac	ggcgcggtga	aattctaact	acttccccga	10080
ctacttcac	aggaacatct	ctggtgttcc	tctcgctcgc	cgcaacgagg	acctccgccg	10140
tccactgcac	tacaacgaga	tcaggaacat	cgctctccg	tccgggacgc	ccggagggtgc	10200
aagggcgtac	atggtgagcg	tccataacag	gaagaacaac	atccacgctg	tgcatgagaa	10260
cggctccatg	atccacctgg	cgcccaatga	ttacaccggc	ttcaccatct	ctccaatcca	10320
cgcaccccaa	gtgaacaacc	agacacgcac	cttcactctc	gagaagttcg	gcaaccaggg	10380
cgactccctg	aggttcgagc	agaacaacac	caccgccagg	tacaccctgc	gcggcaaccg	10440
caacagctac	aacctgtacc	tgcggtcag	ctccattggc	aactccacca	tcagggtcac	10500
catcaaccgg	aggggtgtaca	cagccaccaa	tgtgaacacg	acgaccaaca	atgatggcgt	10560
caacgacaac	ggcgcccgct	tcagcgacat	caacattggc	aacgtggtgg	ccagcagcaa	10620
ctccgacgtc	ccgctggaca	tcaacgtgac	cctgaactct	ggcaccaggt	tcgacctcat	10680
gaacatcatg	ctggtgcaa	ctaacatctc	gccgctgtac	tgataggagc	tctgatcccc	10740
atgggaattc	ccgatcgttc	aaacatttgg	caataaagtt	tcttaagatt	gaatcctggt	10800
gccggtcttg	cgatgattat	catataattt	ctggtgaatt	acgttaagca	tgtaataatt	10860
aacatgtaat	gcatgacgtt	atztatgaga	tgggttttta	tgattagagt	cccgaatta	10920
tacatttaat	acgcgataga	aaacaaaata	tagcgcgcaa	actaggataa	attatcgcg	10980
gcggtgtcat	ctatgttact	agatcgggga	tatccccggg	gcggccgcgg	ggaattcggt	11040
accaagcttt	ggcgcgccaa	atcgtgaagt	ttctcatcta	agccccatt	tggaactgaa	11100
tgtagacacg	tcgaaataaa	gatttccgaa	ttagaataat	ttgtttattg	ctttcgctta	11160
taaatacgac	ggatcgtaat	ttgtcgtttt	atcaaaatgt	actttcattt	tataataacg	11220
ctgcggacat	ctacattttt	gaattgaaaa	aaaattggta	attactcttt	ctttttctcc	11280

atattgacca tcatactcat tgcacccccg gaaattatgt ttttttaaaa accacgggtat 11340
 tatagatacc gtgttatattt ttgagtattg gaaatttcat ttcaacccaa agttttcttca 11400
 tggcacatct agcttttgcc taataccatg tagggctaca tcttaaaaat ctatactact 11460
 atattaaagc tgcaggggta gcctgtctcc acctggttct gcctcgagcc aatctaaacc 11520
 gtccatctat atccatcaaa tcagcacctg ccgggtccgtg cgcacctcct ctcccgtat 11580
 tcagttgcat acttgcagca ggttctccct cctcaccatt tctctgcct cctctctcgc 11640
 tcactggta gattcatcct gcctctcccg catgcgctcc ctcccatgc cccgtctcgc 11700
 actatcgcca cacctcacg cggggagacg aagacgggtg acgcacctc acctcctccg 11760
 ctagttgtcg ctcttccatc ctcttcaaca acttctacat agggagaggc ggttcggcgt 11820
 cccgacgccc ccgcttctcc cctcccatg gaggacgaga acatcgacct cggcgggcggg 11880
 ggcgatgcct ccgctctgca tagaggaggg ttgtagtggc aagcagcaat gccaacaccg 11940
 aggcgggcca agactaggca acaataggac ggcacgcccg gttgtcagcg aggtggcggc 12000
 atcgtgtgcc gctacogaac aacatctccg gcgctggagt cggtgagtta ctgcgccacc 12060
 cggacgccct caatgcactg atatctaccg ggtctccatc gccgcccttc ctcccttccc 12120
 tctccctgtg cctccctctc ttgccctctc ccttccaact gctcccgccc cagccctagc 12180
 ccaaccacct cccgcgcagg gtcaccaa 12208

<210> 6

<211> 22

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> SECUENCIA SINTÉTICA; corresponde a SEQ ID NO:5 en 2034-2055

<400> 6

gccataaaaa ggatggtaat ga 22

<210> 7

<211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> SECUENCIA SINTÉTICA; corresponde a SEQ ID NO:5 en 11345-11367

<400> 7

ctttttctcc atattgacca tca 23

<210> 8

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

231

<223> SECUENCIA SINTÉTICA

<400> 8

ggtatccctc cagaccagca

20

<210> 9

<211> 24

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> SECUENCIA SINTÉTICA

<400> 9

gtggactcct tctggatggt gtaa

24

<210> 10

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> SECUENCIA SINTÉTICA

<400> 10

gtcagggtgc tgctgctgct a

21

<210> 11

<211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> SECUENCIA SINTÉTICA

<400> 11

ggtttaagaa ccattttgct ccc

23

<210> 12

<211> 24

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> SECUENCIA SINTÉTICA; corresponde a SEQ ID NO:5 en 2003-2026

<400> 12

tacgtcaggg tgctgctgct acta

24

<210> 13

<211> 24

<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> SECUENCIA SINTÉTICA
<400> 13
atratttycg gggatgcaac caac 24
<210> 14
<211> 16
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> SECUENCIA SINTÉTICA; corresponde a SEQ ID NO:5 en 2061-2076
<400> 14
atggatcagc aatgag 16
<210> 15
<211> 26
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> SECUENCIA SINTÉTICA
<400> 15
ctgtcaagcc aataaaaggg ttgttt 26
<210> 16
<211> 26
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> SECUENCIA SINTÉTICA
<400> 16
ctgtcaagcc aataaaaggg ttgttt 26
<210> 17
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> SECUENCIA SINTÉTICA
<400> 17

caactcgtcc gtgagcatca 20
 <210> 18
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> SECUENCIA SINTÉTICA; complemento inverso de la secuencia
 corresponde a SEQ ID NO:5 en 4605-4628
 <400> 18
 aactcagcac tacggtgtat ccaa 24
 <210> 19
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> SECUENCIA SINTÉTICA
 <400> 19
 gcctgccgca gaccaa 16
 <210> 20
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> SECUENCIA SINTÉTICA
 <400> 20
 caatgcagag ctcagcttca tc 22
 <210> 21
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> SECUENCIA SINTÉTICA; corresponde a SEQ ID NO:5 en 4587-4603
 <400> 21
 cagagctcct atgttct 17
 <210> 22
 <211> 26
 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> SECUENCIA SINTÉTICA

<400> 22

tccagtacgt gcagtcctc ctcct

26