Organizacion y
Digitalizacion CSA Ltda

CSA220581

BT

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA
República de Colombia
Ministerio de Comercio, Industria y Turismo

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD DE PCT

INVENTARIO

PATENTE DE INVENCION
PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. EXPEDIENTE No. 08-125763

54. TITULO: **PLANTA Y SEMILLA DE MAIZ CORRESPONDIENTES AL EVENTO TRANSGENICO MON89034 Y METODOS PARA SU DETECCION Y USO**

52. CLASIFICACION INTERNACIONAL: **C12N 15/29, C12N 15/09**

71. SOLICITANTE: **MONSANTO TECHNOLOGY, LLC**

DOMICILIO: **800 North Lindberg Boulevard, St. Louis, Missouri 63167, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA**

74. APODERADO: **Dra. MARGARITA CASTELLANOS A.**

22. BOGOTA, D.C., 26 NOV. 2008

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 08-125763- -00000-0000
Fecha 2008-11-26 14:15:13 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act 411 PRESENTACION Folios: 166

Industria y Co
SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRÁMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION (X) MODELO DE UTILIDAD ( )	(X)	( )
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente	(X)	( )
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	(X)	( )
- Descripción de la invención	(X)	( )
- Dibujos de ser estos pertinentes	(X)	( )
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	(X)	( )

COMPLETA (X) INCOMPLETA ( )

DISEÑO INDUSTRIAL ( )

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	( )	( )
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	( )	( )
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño	( )	( )
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	( )	( )

COMPLETA ( ) INCOMPLETA ( )

EZQUEMA DE TRAZADO ( )

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	( )	( )
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	( )	( )
- Representación gráfica del Esquema de Trazado	( )	( )
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	( )	( )

COMPLETA ( ) INCOMPLETA ( )

Firma responsable: [signature]

Fecha: 26 Nov / 08

1

PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 08-125763- -00000-0000
Fecha 2008-11-26 14:15:13 Dep 2020 NUEVACREACIONI
Tra 11 PATENTEYII Eve 379 FASENACIONALII
Act 411 PRESENTACION Folios 166

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

26 Nov. 2007

SOLICITUD DE PATENTE EN COLOMBIA

(1)

[X] Patente de Invención. [ ] Patente de Modelo de Utilidad.

[ ] Capítulo I [X] Capítulo II

(2) SOLICITANTE (71)	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 (74)	Nombre: MARGARITA CASTELLANOS A. Dirección: CALLE 94A No. 7A-09 Teléfono: 610 7420 Fax: 610 0706 E-mail: info@castellanosyco.com	IDENTIFICACIÓN C.C. [X] NIT [ ] C.E. [ ] Otro [ ] Cual Número 39'779.654 TPA 70,819
INVENTOR (ES) (72)	VER ANEXO # 1	

(5) PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2007/069662 Fecha 24/05/2007

Publicación Internacional No. WO 2007/140256 A1 Fecha 06/12/2007

(6) Título (54) PLANTA Y SEMILLA DE MAIZ CORRESPONDIENTES AL EVENTO TRANSGENICO MON89034, Y METODOS PARA SU DETECCION Y USO

(7) Clasificación Internacional (51) C12N 15/29, C12N 15/09

(8) Prioridad

SI [X] NO [ ]

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	26/05/2006	60/808,834

(9) Comprobante de pago No. 08-91,233 Fecha Noviembre 24 de 2008

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

(10) Anexos

- [X] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- [X] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- [X] Poderes, si fuere el caso, junto con la sustitución del mismo a mi favor
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- [ ] Declaraciones.
- [X] Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- [X] Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- [ ] Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- [ ] Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- [ ] De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- [X] Arte final 12x12
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [ ] De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- [X] Otros **Tarjeta Propietario y Extracto para la Publicación**

(11) FIGURA CARACTERISTICA:

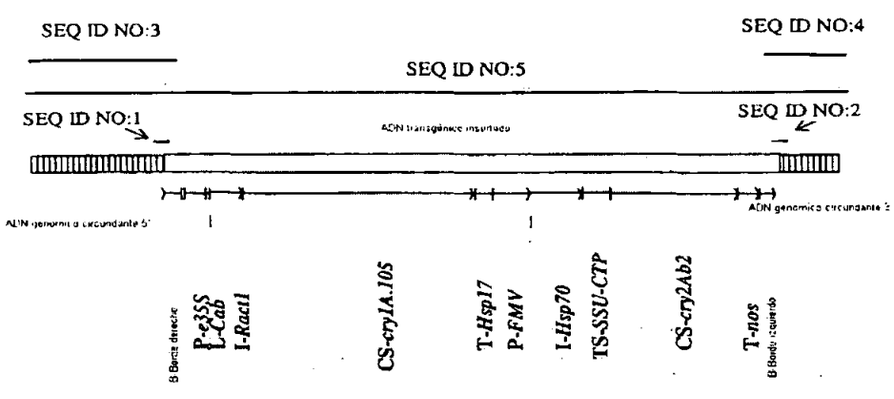


FIGURA 1

(12) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: **MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO**

FIRMA: Margarita Castellanos

C.C. No. 39'779.654 Usaquén - TPA 70.819 C.S.J.

26 NOV. 2008

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página. - MCA/gcb/P1668

CASTELLANOS & CO LTDA
ABOGADOS
Calle 94 A No. 7 A-09
Bogotá, D.C. – COLOMBIA

ANEXO # 1

INVENTOR(ES) (72)

1 **HEATHER ANDERSON**
C/o Monsanto Company
Gail Wuellner, 800 North Lindbergh Blvd..
Mail Zone E2na
St. Louis, Missouri 63167
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

2 **JENNIFER DOUGLAS**
C/o Monsanto Company
Gail Wuellner, 800 North Lindbergh Blvd..
Mail Zone E2na
St. Louis, Missouri 63167
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

3 **JEANNA GROAT**
C/o Monsanto Company
Gail Wuellner, 800 North Lindbergh Blvd..
Mail Zone E2na
St. Louis, Missouri 63167
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

4 **SCOTT JOHNSON**
C/o Monsanto Company
Gail Wuellner, 800 North Lindbergh Blvd..
Mail Zone E2na
St. Louis, Missouri 63167
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

5 **REBECCA KELLY**
C/o Monsanto Company
Gail Wuellner, 800 North Lindbergh Blvd..
Mail Zone E2na
St. Louis, Missouri 63167
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

6 **JOHN KORTE**
C/o Monsanto Company
Gail Wuellner, 800 North Lindbergh Blvd..
Mail Zone E2na
St. Louis, Missouri 63167
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

7 **JAMES RICE**
C/o Monsanto Company
Gail Wuellner, 800 North Lindbergh Blvd..
Mail Zone E2na
St. Louis, Missouri 63167
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 08-125763- -00000-0000
Fecha 2008-11-26 14:15:13 Dep 2020 NUECREACIONI
Tra 11 PATENTEIYII Eve 379 FASENACIONALII
Act 411 PRESENTACION Folios 166

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 91,233
FECHA : NOVIEMBRE 24 DE 2008

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ALVARO CASTELLANOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	81241053	24/11/2008	8,173,600.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
		TOTAL : $	501,000.00

SON: QUINIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

CASTELLANOS & CO LTDA
A B O G A D O S
Calle 94 A No. 7 A-09
Bogotá, D.C. – COLOMBIA

Señor

Jefe de la División de Nuevas Creaciones

Superintendencia de Industria y Comercio

Ministerio de Comercio, Desarrollo, Industria y Turismo

E. S. D.

Ref.: **PODER** conferido por **MONSANTO TECHNOLOGY LLC**.

Yo, **XIMENA CASTELLANOS ABONDANO,** mayor de edad, identificada y domiciliada como aparece al pié de mi firma, atentamente manifiesto a Uds. que sustituyo en la Dra. **MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO,** el poder que me confirió **MONSANTO TECHNOLOGY LLC**, con domicilio en **800 North Lindberg Boulevard, St. Louis, Missouri 63167, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA**, debidamente legalizado por Apostilla bajo el No. **142500**, el día **21 de Diciembre de 2005**, con las mismas facultades que me fueron conferidas, para tramitar la solicitud de patente PCT Entrada en Fase Nacional, para: **PLANTA Y SEMILLA DE MAIZ CORRESPONDIENTES AL EVENTO TRANSGENICO MON89304 Y METODOS PARA SU DETECCION Y USO.**

Del Señor Jefe,

Ximena Castellanos Abondano
C.C. No. **39.773.330** de Usaquén
T.P.A. No. **58.236** del C.S.J.
Calle 94 A No. 7 A-09 – Bogotá
PBX: 610 74 20

Acepto

Margarita Castellanos Abondano
C.C. No. **39.779.654** de Usaquén
T.P.A. No. **70.819** del C.S.J.
Calle 94 A No. 7 A-09 – Bogotá
PBX: 610 74 20

Bogotá, D.C.
XCA/MCA/j1668

PRESENTACION PERSONAL Y RECONOCIMIENTO
NOTARIA QUINCE (15) DEL CIRCULO DE BOGOTA, D.C.

EL ANTERIOR ESCRITO FUE PRESENTADO PERSONALMENTE POR SU SIGNATARIO

Ximena Castellanos Abondano

QUIEN SE IDENTIFICO CON LA C.C. No. 39.773.330 DE Usaquen Y

T.P. DE ABOGADO No. 58.236 DEL C.S. de la J.

Y RECONOCE SU CONTENIDO COMO CIERTO.

FIRMA COMPARECIENTE:

FECHA: 25 NOV. 2008

EL NOTARIO QUINCE

REPUBLICA DE COLOMBIA
NOTARIO QUINCE
BOGOTA
DANIEL BAUTISTA ZULUAGA

PRESENTACION PERSONAL Y RECONOCIMIENTO
NOTARIA QUINCE (15) DEL CIRCULO DE BOGOTA, D.C.

EL ANTERIOR ESCRITO FUE PRESENTADO PERSONALMENTE POR SU SIGNATARIO

Margarita Castellanos Abondano

QUIEN SE IDENTIFICO CON LA C.C. No. 39.779.654 DE Usaquen Y

T.P. DE ABOGADO No. 70.819 DEL C.S. de la J.

Y RECONOCE SU CONTENIDO COMO CIERTO.

FIRMA COMPARECIENTE:

FECHA: 25 NOV. 2008

EL NOTARIO QUINCE

REPUBLICA DE COLOMBIA
NOTARIO QUINCE
BOGOTA
DANIEL BAUTISTA ZULUAGA

7

COLOMBIA

6027-FNPCY

PODER

El (los) **MONSANTO TECHNOLOGY LLC**

Domiciliados en **800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, Missouri 63167, EEUU**

Nombran por el presente a **XIMENA CASTELLANOS A. y/o MARGARITA CASTELLANOS A.** abogadas con oficinas en la Calle 94 A No. 7 A-09, Bogotá-Colombia para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad Industrial y con este fin autorizamos a dichos apoderados para que nos representen ante cualesquiera autoridades o personas de los órdenes administrativo, contencioso –administrativo y judicial en todo lo relacionado con los siguientes actos y gestiones:

a) Obtención de patentes de invención, modelos y dibujos industriales; registro de marcas de fabrica, de servicio, colectivas o defensivas y de denominaciones de origen, depósito de nombres y enseñas comerciales; su renovación, prórroga, inscripción de traspaso y cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria y el registro de licencias de uso de esos derechos;
b) Para la obtención de registros sanitarios;
c) Acciones de oposición, observación, cancelación, nulidad, medidas cautelares y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso - administrativos que promovamos o se nos promuevan.

Pudiendo en todos los actos y gestiones arriba mencionados sustituir éste mandato, transigir, desistir, recibir, cancelar, renunciar, aceptar notificaciones y nombrar apoderados judiciales y extrajudiciales.

Finalmente, este poder ratifica la validez de todos los actos y solicitudes que, a nombre de la poderdante hubieren realizado los apoderados en relación con las facultades anteriormente enumeradas, antes de la suscripción del presente poder

Dado y firmado hoy 19 de Diciembre de 2005

en St. Louis, Missouri, USA

por MONSANTO TECHNOLOGY LLC

(El notario debe suscribir el documento en la pagina siguiente)

(Se requiere legalización consular o mediante apostilla)

POWER OF ATTORNEY

I (we) the undersigned **MONSANTO TECHNOLOGY LLC**

Of **800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, Missouri 63167, EEUU**

hereby grant(s) Power of Attorney to **XIMENA CASTELLANOS A. and /or MARGARITA CASTELLANOS** a. attorneys residing at Calle 94 A No. 7 A-09, Bogotá-Colombia, to obtain the protection of my (our Industrial Property, for which purpose we authorize the said attorneys to represent us before any authorities, or persons, specially those, administrative, contentious and judicial, in all matters concerning the following:

a) Obtainment of patents, models and designs, registration of trademarks, service, collective and defensive marks, and of designations of origin; the deposit of trade names and ensigns; its renewal, extension, recordal of assignments, change of name or domicile, voluntary cancellation, and the registration of licenses of use of the above rights;
b) For the obtainment of Sanitary registrations;
c) Actions of opposition, cancellation, nullity, infringement, granting of licenses; and in general the civil, criminal and administrative suits related to those rights; actions and suits instituted by us or against us;

In all the above matters they may substitute this power of attorney, compromise, desist, cancel, receive, renounce, accept notifications and appoint attorneys in fact, in or out of court.

Finally, this power of attorney ratifies the validity of all acts and applications made by the representatives in the name of the signatory of this power of attorney, with regard to the faculties above given, before the execution of the present power of attorney.

Given and signed this 19th December, 2005

in St. Louis, Missouri

by Dennis R. Hoerner

Dennis R. Hoerner

(Notary shall execute on the next page)

(Consular legalization or apostille is required)

Notaria Quince Circulo de Bogotá
Como Notario Quince testifico que esta copia coincide con Documento ORIGINAL presentado para su autenticación
Bogotá 25 NOV. 2008
DANIEL BAUTISTA ZULUAGA
Notario Quince

CERTIFICADO NOTARIAL (Sociedad)

NOTARIAL CERTIFICATION (Corporation)

COLOMBIA

Hoy 19 de Dic. del año 2005
compareció (eron) personalmente
DENNIS R. HOERNER

a quienes conozco como la(s) personas que firma(n) en representación de la Sociedad (Compañía) denominada
MONSANTO TECHNOLOGY LLC

Certifico :

a) Que MONSANTO TECHNOLOGY LLC

es una sociedad/Compañía legalmente constituida y existente de acuerdo con las leyes de

b) Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es
St. Louis, Missouri

c) Que el objeto u objetos para los cuales se otorga el presente poder están comprendidos dentro del objeto social de la mencionada Sociedad /Compañía.

d) Que el Sr. DENNIS R. HOERNER
esta autorizado para otorgar el presente poder. Lo anterior esta probado por medio de los siguientes documentos, que certifico he visto*

(Ciudad) St. Louis

(Estado) Missouri

Hoy 19 del Diciembre de 2005

(Notario Público)

*Los documentos debe identificarse con fecha y origen.

On this 19 day of Dec. of 2005
personally appeared

Dennis R. Hoerner

whom I know to be the person(s) who signed this document as representative(s) of the Corporation /Company named
Monsanto Technology LLC
I certify:

a) That
Monsanto Technology LLC

is a corporation (Company legally constituted and in existence in accordance with the laws of

b) That the domicile of said Corporation/Company is
St. Louis, Missouri

c) That the purpose or purposes for which the present Power of Attorney is granted are comprised within the object set forth in the charter of the mentioned Corporation/Company.

d) That Mr. Dennis R. Hoerner
is (are) authorized to grant the present Power of Attorney. The aforementioned was duly proven through the following documents and I duly certify having seen them*:

(City) St. Louis

(State) Missouri

this 19 day of Dec of the year 2005

(Notary Public) Michelle Ludwig

*Documents must be identified with date and origin

NOTARY PUBLIC NOTARY SEAL STATE OF MISSOURI

MICHELLE LUDWIG
My Commission Expires
July 13, 2009
St. Louis County
Commission #05550747

Notaria Quince Circulo de Bogotá
Como Notario Quince testifico que esta copia coincide con Documento ORIGINAL presentado para su autenticación
Bogotá 25 NOV. 2008
DANIEL BAUTISTA ZULUAGA
Notario Quince

6027-FNPCT

9

Apostille

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

2. This public document has been signed by MICHELLE LUDWIG
3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC
4. bears the seal/stamp of MICHELLE LUDWIG-NOTARY PUBLIC-STATE OF MISSOURI

Certified

5. at Jefferson City, Missouri
6. the 21ST day of DECEMBER, 2005.
7. by Robin Carnahan, Secretary of State, State of Missouri
8. No. 142500
9. Seal/Stamp
10. Signature:

Robin Carnahan

Comm. 48 (01-2005)

Notaria Quince Circulo de Bogotá
Como Notario Quince testifico que esta copia coincide con Documento ORIGINAL presentado para su autenticación
Bogotá
25 NOV 2005
DANIEL BAUTISTA ZULUAGA
Notario Quince

----------TRADUCCION OFICIAL No. 06-02-04----------

de un documento escrito en INGLES, el cual para su identificación lleva el sello de la Traductora e Intérprete Oficial, Res. 2755/68 y 01144/97 de Minjusticia, al igual que la presente.----------

(Adjunto a un documento de Poder otorgado por MONSANTO TECHNOLOGY LLC)

Sello Notarial:

MICHELLE LUDWIG

Mi comisión vence Julio 13, 2009

Condado de St. Louis – Comisión #05550747

APOSTILLA

(Convención de La Haya de octubre 5, 1961)

1. País: Estados Unidos de América

Este documento público

2. ha sido firmado por Michelle Ludwig
3. actuando en su carácter de Notario Público
4. Lleva el sello de Michelle Ludwig – Notario Público – Estado de Missouri

CERTIFICADO

5. En Jefferson City, Missouri
6. El día 21 de Diciembre de 2005

Notaria Quince Circulo de Bogotá
Como Notario Quince testifico que esta copia coincide con Documento ORIGINAL presentado para su autenticación
Bogotá 25 NOV. 2006
DANIEL BAUTISTA ZULUAGA
Notario Quince

DORA DUQUE DE BERNAL
TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL
RES. 02755/68 Y 01144/97 - MINJUSTICIA
REP. DE COLOMBIA

7. por Robin Carnahan, Secretario de Estado, Estado de Missouri

8. No. 142500

9. Sello (en dorado)

10. Firma:

(fdo) Robin Carnahan

ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA, a la cual me remito,

Bogotá, D. C., Febrero 9, 2006.

DORA DUQUE DE BERNAL
TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL
RES. 02755/68 Y 01144/97 - MINJUSTICIA
REP. DE COLOMBIA

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2006 FEB 13 A 11: 5

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

613666

COTEJA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

Notaria Quince Circulo de Bogotá
Como Notario Quince testifico que esta copia coincide con Documento ORIGINAL presentado para su autenticación
Bogotá 25 NOV 2006
DANIEL BAUTISTA ZULUAGA
Notario Quince

12

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
6 December 2007 (06.12.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/140256 A1

(51) International Patent Classification:
C12N 15/29 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2007/069662

(22) International Filing Date: 24 May 2007 (24.05.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/808,834 26 May 2006 (26.05.2006) US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: MONSANTO TECHNOLOGY, LLC [US/US]; 800 North Lindbergh Blvd, Mail Zone E2na, C/o Gail Wuellner, St Louis, Missouri 63167 (US).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: ANDERSON, Heather [US/US]; C/o Monsanto Company, Gail Wuellner, 800 North Lindbergh Blvd, Mail Zone E2na, St Louis, Missouri 63167 (US). DOUGLAS, Jennifer [US/US]; C/o Monsanto Company, Gail Wuellner, 800 North Lindbergh Blvd, Mail Zone E2na, St Louis, MO 63167 (US). GROAT, Jeanna [US/US]; C/o Monsanto Company, Gail Wuellner, 800 North Lindbergh Blvd, Mail Zone E2na, St Louis, Missouri 63167 (US). JOHNSON, Scott [US/US]; C/o Monsanto Company, Gail Wuellner, 800 North Lindbergh Blvd, Mail Zone E2na, St Louis, Missouri 63167 (US). KELLY, Rebecca [US/US]; C/o Monsanto Company, Gail Wuellner, 800 North Lindbergh Blvd, Mail Zone E2na, St Louis, Missouri 63167 (US). KORTE, John [US/US]; C/o Monsanto Company, Gail Wuellner, 800 North Lindbergh Blvd, Mail Zone E2na, St Louis, Missouri 63167 (US). RICE, James [US/US]; C/o Monsanto Company, Gail Wuellner, 800 North Lindbergh Blvd, Mail Zone E2na, St Louis, Missouri 63167 (US).

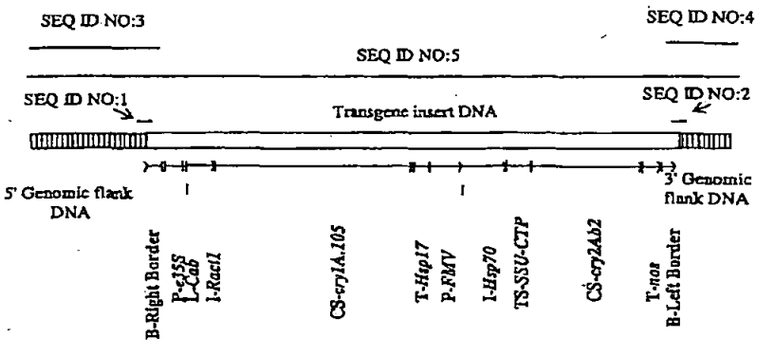
(74) Agent: BALL, Timothy; Monsanto Company, 800 North Lindbergh Blvd, Mail Zone E1na, St Louis, MO 63167 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL,

[Continued on next page]

(54) Title: CORN PLANT AND SEED CORRESPONDING TO TRANSGENIC EVENT MON89034 AND METHODS FOR DETECTION AND USE THEREOF



(57) Abstract: The present invention provides a transgenic corn event MON89034, and cells, seeds, and plants comprising DNA diagnostic for the corn event. The invention also provides compositions comprising nucleotide sequences that are diagnostic for said corn event in a sample, methods for detecting the presence of said corn event nucleotide sequences in a sample, probes and primers for use in detecting nucleotide sequences that are diagnostic for the presence of said corn event in a sample, growing the seeds of such corn event into corn plants, and breeding to produce corn plants comprising DNA diagnostic for the corn event.

WO 2007/140256 A1

PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— *with international search report*

— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments*

— *with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau*

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

APPLICATION FOR PATENT

CORN PLANT AND SEED CORRESPONDING TO TRANSGENIC EVENT MON89034 AND METHODS FOR DETECTION AND USE THEREOF

HEATHER ANDERSON; JENNIFER DOUGLAS; JEANNA GROAT; SCOTT JOHNSON; REBECCA KELLY; JOHN KORTE; JAMES RICE

CROSS REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

This application claims the benefit of priority to US Provisional Application Serial No. 60/808,834 filed May 26, 2006.

FIELD OF THE INVENTION

[0001] The present invention relates to transgenic corn event MON89034 and plant parts and seed thereof. The event exhibits resistance to insect infestation from insects in the order Lepidoptera. The invention also relates to methods for using plants and seeds comprising DNA that is diagnostic for the presence of the transgenic event when probed for the presence of nucleotide sequences that are unique to the transgenic event, and to methods for detecting the presence of said corn event in a biological sample by detecting specific nucleotide sequences that are unique to the transgenic event. The invention provides nucleotide sequences that are unique to the event.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0002] This invention relates to the Lepidopteran resistant transgenic variety of corn (Zea mays) plant referred to herein as event MON89034, and to unique DNA sequences present that, when detected in any sample or variety of corn, are diagnostic for the presence of the transgenic corn plant event MON89034 in that sample or variety, and also relates to the detection of the transgene/genomic insertion region in corn MON89034, and progeny plants and seeds derived therefrom.

[0003] The corn plant event MON89034 is particularly resistant to insects in the Lepidoptera family such as Fall armyworm (Spodoptera frugiperda), European corn borer (Ostrinia nubilalis), corn earworm (Helicoverpa zea), southwestern corn borer (Diatraea grandiosella), and black cutworm (Agrotis ipsilon) and the like, all of which are agronomically important insect pests.

[0004] Corn is an important crop and is a primary food source in many areas of the world. Biotechnology methods have been applied to corn for the purpose of improving agronomic traits and the quality of the product. One such agronomic trait is insect resistance, for example, genetically engineered resistance to lepidopteran and coleopteran species that arises in corn plants genetically engineered to contain one or more genes encoding insecticidal agents (see for example, US Patent 6,489,542 and US Patent 6,620,988). It is advantageous

to detect the presence of a particular transgenic event in a biological sample in order to determine whether one or more progeny of a sexual cross contains the transgenic material. For example, the detection of the event in a sample is important for licensing purposes, for establishing and maintaining purity standards, important for complying with regulatory agencies, for complying with food ingredient standards, for use in legal proceedings in establishing that one or more particular individuals or entities has been using the particular event without a license from the owner or licensee of any patents directed to the transgenic event, and for insuring compliance with various government regulations and/or laws.

[0005] In addition, methods that enable the detection of a particular plant would be helpful when complying with regulations requiring the pre-market approval and labeling of foods derived from the recombinant crop plants. Individuals or entities that are resistant to the presence of a transgenic event in a sample also desire reliable methods for detecting the presence of the transgene in a sample in order for them to be able to capitalize on their business, which takes advantage of an absence of transgenes in their products.

[0006] Despite these advantages, it is possible that insects may evolve resistance to plants expressing only one B. thuringiensis δ-endotoxin. Such resistance, should it become widespread, would clearly limit the commercial value of germplasm containing single Bt genes.

[0007] One possible way of increasing the effectiveness of insecticidal agents provided via transgenic plants and directed at controlling target insect pests and contemporaneously reducing the likelihood of emergence of insect pests resistant to such insecticidal agents would be to ensure that transgenic crops express high levels of these insecticidal agents, such as Bacillus thuringiensis delta-endotoxins (McGaughey and Whalon (1992), Science 258:1451-55; Roush (1994) Biocontrol. Sci. Technol.. 4:501–516). In addition, having a repository of insecticidal genes that are effective against groups of insect pests and which manifest their effects through different modes of action can safeguard against development of resistance. The onset of resistance could be substantially delayed as a result of providing a crop that expresses two or more insecticidal activities exhibiting overlapping toxicity to the same insect species. One means for achieving such dual modes of action could be to provide a plant expressing a Bt gene toxic to a particular insect species along with a dsRNA that is provided for the purpose of targeting for suppression an essential gene of the same insect species targeted by the Bt toxin, the dsRNA eliciting an RNAi response upon ingestion by the

target pest, providing a means for redundancy in the event that the insect develops resistance either to the dsRNA or to the Bt gene. Alternatively, co-expression in a plant of two or more insecticidal toxins both toxic to the same insect species but each exhibiting a different mode of effectuating its killing activity, particularly when both are expressed at high levels, provides a means for effective resistance management. Examples of such insecticides useful in such combinations include but are not limited to Bt toxins, Xenorhabdus sp. or Photorhabdus sp. insecticidal proteins, deallergenized and de-glycosylated patatin proteins and/or permuteins, plant lectins, and the like.

[0008] The expression of foreign genes in plants is known to be influenced by their chromosomal position, perhaps due to chromatin structure (e.g., heterochromatin) or the proximity of transcriptional regulation elements (e.g., enhancers) close to the integration site (Weising et al.(19880 Ann. Rev. Genet 22:421-477). For this reason, it is often necessary to screen a large number of events in order to identify an event characterized by optimal expression of an introduced gene of interest. Even then, with dozens or even hundreds of different transgenic events in hand, there is no certainty of success in identifying a single transgenic event that provides the optimum levels of expression of the at least two different toxins or insecticidal agents and lacks any undesirable agronomic deficiencies or phytotoxic effects, either as a result of the insertion into some essential or partially essential region of the plant genome, or as a result of toxic effects brought about by the levels of expression of the transgenes. For example, it has been observed in plants and in other organisms that there may be wide variation in the levels of expression of an introduced gene among events. There may also be differences in spatial or temporal patterns of expression, for example, differences in the relative expression of a transgene in various plant tissues, that may not correspond to the patterns expected from transcriptional regulatory elements present in the introduced gene construct. For this reason, it is common to produce several hundreds to several thousands different events and screen the events for a single event that has the desired transgene expression levels and patterns for commercial purposes. An event that has the desired levels or patterns of transgene expression is useful for introgressing the transgene into other genetic backgrounds by sexual outcrossing using conventional breeding methods. Progeny of such crosses maintain the transgene expression characteristics of the original transformant. This strategy is used to ensure reliable gene expression in a number of varieties that are suitably adapted to specific local growing conditions.

[0009] It is possible to detect the presence of a transgene by any well known nucleic acid detection method such as the polymerase chain reaction (PCR) or DNA hybridization using nucleic acid probes. These detection methods generally focus on frequently used genetic elements, such as promoters, terminators, marker genes, or even the coding sequence encoding the protein or dsRNA of interest expressed from the transgene(s), etc. As a result, such methods may not be useful for discriminating between different events, particularly those produced using the same DNA construct, unless the sequence of chromosomal DNA adjacent to the inserted DNA ("flanking DNA") is known. Depending on the method used for introducing the transgene(s) into a plant genome, abberant or unusual effects can be observed, which often severly complicate the identification of the plant genome sequences flanking the transgenic DNA that was intended to be introduced into the plant. Often, rearrangements of the inserted DNA, rearrangements of the flanking genome DNA, or rearrangements of both the inserted DNA and the flanking genome DNA are prevalent, and complicate the analysis of the insertional event being evaluated. Therefore, it is advantageous to have a means for selecting, for identifying, and for insuring the purity and characteristics of a particular transgenic event in a sample, and the only way to accomplish this is to identify one or more unique sequences associated only with the desired transgenic event, and the presence of such sequences in a biological sample containing DNA of the plant species into which the transgenic DNA was inserted to give rise to the event are thus diagnostic for the event in such sample.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0010] The present invention is related to the transgenic corn plant designated MON89034 and progeny that are indistinguishable from corn event MON89034 (to the extent that they also contain at least one allele that corresponds to the inserted transgenic DNA) thereof having seed deposited on March 28, 2006 with American Type Culture Collection (ATCC) with Accession No.PTA-7455. Another aspect of the invention is the progeny plants, or seeds, or regenerable parts of the plants and seeds of the corn event MON89034 that contain a polynucleotide selected from the group consisting of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, and SEQ ID NO:5. The invention also includes plant parts of the corn event MON89034 that include, but are not limited to pollen, ovule, flowers, shoots, roots, stalks, silks, tassels, ears, and leaves, so long as these parts contain at least the

polynucleotides as set forth above. Novel genetic compositions contained in the genome of MON89034 and products such from MON89034 such as meal, flour, oil, pulp, and biomass left over in a field of corn plants corresponding to MON89034 event are an aspect of this invention.

[0011] The invention provides an insect resistant corn plant that has all of the physiological and morphological characteristics of the corn event MON89034.

[0012] According to one aspect of the invention, compositions and methods are provided for detecting the presence of the transgene/genomic insertion region from a novel corn plant designated MON89034. DNA sequences are provided that comprise at least one junction sequence of MON89034 selected from the group consisting of SEQ ID NO:1 (located at positions 2051 to 2070 on SEQ ID NO: 5) and SEQ ID NO:2 (located at positions 11367 to 11388) and complements thereof; wherein a junction sequence spans the junction between heterologous DNA inserted into the genome and the DNA from the corn cell flanking the insertion site and is diagnostic for the event (Figure 1). A corn event MON89034 and seed comprising these DNA molecules is an aspect of this invention.

[0013] DNA sequences that comprise the novel transgene/genomic insertion region, SEQ ID NO:3 and SEQ ID NO:4 (Figure 2) from corn event MON89034 are aspects of this invention. The corn plant and seed comprising these molecules are also aspects of this invention.

[0014] According to another aspect of the invention, two DNA molecules are provided for use in a DNA detection method, wherein the first DNA molecule comprises at least 11 or more contiguous polynucleotides of any portion of the transgene region of the DNA molecule of SEQ ID NO:3 and a DNA molecule of similar length of any portion of a 5' flanking corn genomic DNA region of SEQ ID NO:3, where these DNA molecules when used together are useful as DNA primers in a DNA amplification method that produces an amplicon. The amplicon produced using these DNA primers in the DNA amplification method is diagnostic for corn event MON 89304 when the amplicon contains SEQ ID NO:1. Any amplicon produced by DNA primers homologous or complementary to any portion of SEQ ID NO:3 and any amplicon that comprises SEQ ID NO:1 is an aspect of the invention.

[0015] According to another aspect of the invention, two DNA molecules are provided for use in a DNA detection method, wherein the first DNA molecule comprises at least 11 or more contiguous polynucleotides of any portion of the transgene region of the DNA molecule

of SEQ ID NO:4 and a DNA molecule of similar length of any portion of a 3' flanking corn genomic DNA of SEQ ID NO:4, where these DNA molecules are useful as DNA primers in a DNA amplification method. The amplicon produced using these DNA primers in the DNA amplification method is diagnostic for corn event MON 89304 when the amplicon contains SEQ ID NO:2. Any amplicons produced by DNA primers homologous or complementary to any portion of SEQ ID NO:4 and any amplicon that comprises SEQ ID NO:2 is an aspect of the invention.

[0016] According to another aspect of the invention, methods of detecting the presence of DNA corresponding to the corn event MON89034 in a sample are provided. Such methods comprise: (a) contacting the sample comprising DNA with a primer set that, when used in a nucleic acid amplification reaction with genomic DNA from corn event MON89034, produces an amplicon that is diagnostic for corn event MON89034; (b) performing a nucleic acid amplification reaction, thereby producing the amplicon; and (c) detecting the amplicon wherein said amplicon comprises SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2.

[0017] A corn plant, or seed, or product derived from the plant or seed MON89034 wherein the genomic DNA comprising comprises a DNA molecule consisting essentially of SEQ ID NO:5 and complements thereof. A corn plant, or seed, or product derived from the plant or seed MON89034, in which the genomic DNA when isolated from the corn plant, or seed, or product comprises a DNA molecule incorporating nucleotides 2061 to 11377 of SEQ ID NO:5 and complements thereof.

[0018] A corn plant, or seed, or product derived from the plant or seed MON89034, in which the genomic DNA when isolated from the corn plant, or seed, or product produces an amplicon in a DNA amplification method, wherein DNA primer molecules SEQ ID NO:6 and SEQ ID NO:7 is used in the DNA amplification method.

[0019] According to another aspect of the invention, methods of detecting the presence of a DNA corresponding to the MON89034 event in a sample, such methods comprising: (a) contacting the sample comprising DNA with a probe that hybridizes under stringent hybridization conditions with genomic DNA from corn event MON89034 and does not hybridize under the stringent hybridization conditions with a control corn plant; (b) subjecting the sample and probe to stringent hybridization conditions; and (c) detecting hybridization of the probe to the corn event MON89034 DNA wherein said probe comprises SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2.

[0020] Another aspect of the invention is a method of determining the zygosity of the progeny of corn event MON89034 comprising: (a) contacting the sample comprising corn DNA with a primer set comprising SQ2842 (SEQ ID NO:6), SQ2843(SEQ ID NO:7), SQ6523(SEQ ID NO:10), SQ6524(SEQ ID NO:11), PB880 (SEQ ID NO:14) and PB2931 (SEQ ID NO:15) that when used in a nucleic-acid amplification reaction with genomic DNA from corn event MON89034, produces a first amplicon that is diagnostic for corn event MON89034 and (b) performing a nucleic acid amplification reaction, thereby producing the first amplicon; and (c) detecting the first amplicon; and (d) contacting the sample comprising corn DNA with said primer set, that when used in a nucleic-acid amplification reaction with genomic DNA from corn plants produces a second amplicon comprising the native corn genomic DNA homologous to the corn genomic region of a transgene insertion identified as corn event MON89034; and (e) performing a nucleic acid amplification reaction, thereby producing the second amplicon and (f) detecting the second amplicon; and (g) comparing the first and second amplicons in a sample, wherein the presence of both amplicons indicates the sample is heterozygous for the transgene insertion.

[0021] One aspect of the invention is providing in the diet of a lepidopteran pest an insecticidally effective amount of corn event MON89034.

[0022] Another aspect of the present invention is providing a composition or biological sample in the form of a commodity or foodstuff that is derived from corn event MON89034, the commodity or foodstuff comprising ears of corn, shucked corn, corn silk, corn pollen, cracked corn, corn meal, crushed corn, corn flour, corn oil, corn starch, corn steep liquor, corn malt, corn sugar, corn syrup, margarine produced from corn oil, unsaturated corn oil, saturated corn oil, corn flakes, pop corn, ethanol and/or liquor produced from corn or corn products comprising DNA diagnostic for corn event MON89034, distillers dry goods solids (DDGS) produced from fermentation of such corn event, and animal feeds comprising such DDGS and/or corn, whether or not whole, cracked, or crushed, processed foodstuffs, a cosmetic, and a bulking agent in which there is found a detectable amount of a polynucleotide that is diagnostic for the presence of the transgenic corn event MON89034 in the biological sample. An alternative means for providing corn as a foodstuff is to provide corn in various forms of grain for feeding, such as whole corn, cracked corn, crushed corn, and various forms of the foregoing in a blend with milo, suet, millet, sunflower, oats, wheat, rice, beans, and the like. Detectable amounts of a nucleotide sequence in such commodity or foodstuff, such as is

set forth at SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2, or the complements thereof, is diagnostic for the presence of such transgenic event MON89034 DNA in the sample, and therefore, the presence of the transgenic event cells as having originated the DNA in the sample.

[0023] The foregoing and other aspects of the invention will become more apparent from the following detailed description.

DRAWINGS

[0024] Figure 1. Organization of the transgene insert present within the genome of transgenic corn event MON89034. The central open or white bar represents the inserted DNA. Below the white bar is a diagram that represents the various elements within the inserted DNA. The ends of the inserted DNA have been arbitrarily designated as 5' (to the left side of the Figure) and 3' (to the right side of the Figure). The Right Border and Left Border sequences or segments are labeled beneath each end of the diagram illustrating the various elements within the inserted DNA. The labeled elements in the expression cassettes within the inserted DNA are, in consecutive order starting from the Right Border: e35S promoter, wheat CAB untranslated leader, rice actin intron, coding sequence for Cry1A.105, wheat HSP17 3' termination and polyadenylation sequence, FMV promoter, hsp70 intron, rubisco small subunit chloroplast targeting peptide coding sequence, Cry2Ab coding sequence, nos 3' termination and polyadenylation signal sequence, and then the Left Border. The vertically hatched bars at either end of the central open or white bar correspond to the arbitrarily labeled 5' and 3' corn genome flanking sequences. The longest black line above the hatched and open or white bar represents SEQ ID NO:5 (the full length sequence represented by the figure depicting the 5' flanking sequence, the inserted DNA sequence, and the 3' flanking sequence). The shorter black lines above and below the black line labeled as SEQ ID NO:5 represent the approximate positions within SEQ ID NO:5 in which each of the specifically labeled sequences can be found (i.e., SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, and SEQ ID NO:4). SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2, and any sequence derived from corn event MON89034 containing SEQ ID NO:1 and/or SEQ ID NO:2, are diagnostic for corn event MON89034 DNA in a biological sample.

DETAILED DESCRIPTION

[0025] The following definitions and methods are provided to better define the present invention and to guide those of ordinary skill in the art in the practice of the present invention. Unless otherwise noted, terms are to be understood according to conventional usage by those of ordinary skill in the relevant art. Definitions of common terms in molecular biology may also be found in Rieger et al., Glossary of Genetics: Classical and Molecular, 5th edition, Springer-Verlag: New York, 1991; and Lewin, Genes V, Oxford University Press: New York, 1994.

[0026] As used herein, the term "corn" means Zea mays or maize and includes all plant varieties that can be bred with corn, including wild maize species.

[0027] As used herein, the term "comprising" means "including but not limited to".

[0028] A transgenic "event" is produced by transformation of plant cells with heterologous DNA, i.e., a nucleic acid construct that includes a transgene of interest, regeneration of a population of plants resulting from the insertion of the transgene into the genome of the plant, and selection of a particular plant characterized by insertion into a particular genome location. The term "event" refers to the original transformant and progeny of the transformant that include the heterologous DNA. The term "event" also refers to progeny produced by a sexual outcross between the transformant and another variety that include the heterologous DNA. Even after repeated back-crossing to a recurrent parent, the inserted DNA and flanking DNA from the transformed parent is present in the progeny of the cross at the same chromosomal location. The term "event" also refers to DNA from the original transformant comprising the inserted DNA and flanking genomic sequence immediately adjacent to the inserted DNA that would be expected to be transferred to a progeny that receives inserted DNA including the transgene of interest as the result of a sexual cross of one parental line that includes the inserted DNA (e.g., the original transformant and progeny resulting from selfing) and a parental line that does not contain the inserted DNA. The present invention relates to the event MON89034 DNA, plant cells, tissues, seeds and processed products derived from MON89034.

[0029] It is also to be understood that two different transgenic plants can also be mated to produce offspring that contain two independently segregating added, exogenous genes. Selfing of appropriate progeny can produce plants that are homozygous for both added, exogenous genes. Back-crossing to a parental plant and out-crossing with a non-transgenic plant are also contemplated, as is vegetative propagation. Descriptions of other breeding

methods that are commonly used for different traits and crops can be found in one of several references, e.g., Fehr, in Breeding Methods for Cultivar Development, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison WI (1987).

[0030] A "probe" is an isolated nucleic acid to which is attached a conventional detectable label or reporter molecule, e.g., a radioactive isotope, ligand, chemiluminescent agent, or enzyme. Such a probe is complementary to a strand of a target nucleic acid, in the case of the present invention, to a strand of genomic DNA from corn event MON89034 whether from a corn plant or from a sample that includes DNA from the event. Probes according to the present invention include not only deoxyribonucleic or ribonucleic acids but also polyamides and other probe materials that bind specifically to a target DNA sequence and can be used to detect the presence of that target DNA sequence.

[0031] "Primers" are isolated nucleic acids that are annealed to a complementary target DNA strand by nucleic acid hybridization to form a hybrid between the primer and the target DNA strand, then extended along the target DNA strand by a polymerase, e.g., a DNA polymerase. Primer pairs of the present invention refer to their use for amplification of a target nucleic acid sequence, e.g., by the polymerase chain reaction (PCR) or other conventional nucleic-acid amplification methods.

[0032] Probes and primers are generally 11 nucleotides or more in length, preferably 18 nucleotides or more, more preferably 24 nucleotides or more, and most preferably 30 nucleotides or more. Such probes and primers hybridize specifically to a target sequence under high stringency hybridization conditions. Preferably, probes and primers according to the present invention have complete sequence similarity with the target sequence, although probes differing from the target sequence and that retain the ability to hybridize to target sequences may be designed by conventional methods.

[0033] Methods for preparing and using probes and primers are described, for example, in Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., vol. 1-3, ed. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 (hereinafter, "Sambrook et al., 1989"); Current Protocols in Molecular Biology, ed. Ausubel et al., Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, 1992 (with periodic updates) (hereinafter, "Ausubel et al., 1992"); and Innis et al., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press: San Diego, 1990. PCR-primer pairs can be derived from a known sequence, for

example, by using computer programs intended for that purpose such as Primer (Version 0.5, © 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA).

[0034] Primers and probes based on the flanking DNA and insert sequences disclosed herein can be used to confirm (and, if necessary, to correct) the disclosed sequences by conventional methods, e.g., by re-cloning and sequencing such sequences.

[0035] The nucleic acid probes and primers of the present invention hybridize under stringent conditions to a target DNA sequence. Any conventional nucleic acid hybridization or amplification method can be used to identify the presence of DNA from a transgenic event in a sample. Nucleic acid molecules or fragments thereof are capable of specifically hybridizing to other nucleic acid molecules under certain circumstances. As used herein, two nucleic acid molecules are said to be capable of specifically hybridizing to one another if the two molecules are capable of forming an anti-parallel, double-stranded nucleic acid structure. A nucleic acid molecule is said to be the "complement" of another nucleic acid molecule if they exhibit complete complementarity. As used herein, molecules are said to exhibit "complete complementarity" when every nucleotide of one of the molecules is complementary to a nucleotide of the other. Two molecules are said to be "minimally complementary" if they can hybridize to one another with sufficient stability to permit them to remain annealed to one another under at least conventional "low-stringency" conditions. Similarly, the molecules are said to be "complementary" if they can hybridize to one another with sufficient stability to permit them to remain annealed to one another under conventional "high-stringency" conditions. Conventional stringency conditions are described by Sambrook et al., 1989, and by Haymes et al., In: Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach, IRL Press, Washington, DC (1985), Departures from complete complementarity are therefore permissible, as long as such departures do not completely preclude the capacity of the molecules to form a double-stranded structure. In order for a nucleic acid molecule to serve as a primer or probe it need only be sufficiently complementary in sequence to be able to form a stable double-stranded structure under the particular solvent and salt concentrations employed.

[0036] As used herein, a substantially homologous sequence is a nucleic acid sequence that will specifically hybridize to the complement of the nucleic acid sequence to which it is being compared under high stringency conditions. Appropriate stringency conditions which promote DNA hybridization, for example, 6.0 x sodium chloride/sodium citrate (SSC) at

about 45°C, followed by a wash of 2.0 x SSC at 50°C, are known to those skilled in the art or can be found in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. For example, the salt concentration in the wash step can be selected from a low stringency of about 2.0 x SSC at 50°C to a high stringency of about 0.2 x SSC at 50°C. In addition, the temperature in the wash step can be increased from low stringency conditions at room temperature, about 22°C, to high stringency conditions at about 65°C. Both temperature and salt may be varied, or either the temperature or the salt concentration may be held constant while the other variable is changed. In a preferred embodiment, a nucleic acid of the present invention will specifically hybridize to one or more of the nucleic acid molecules set forth in SEQ ID NO: 1 and 2 or complements thereof or fragments of either under moderately stringent conditions, for example at about 2.0 x SSC and about 65°C. In a particularly preferred embodiment, a nucleic acid of the present invention will specifically hybridize to one or more of the nucleic acid molecules set forth in SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2 or complements or fragments of either under high stringency conditions. In one aspect of the present invention, a preferred marker nucleic acid molecule of the present invention has the nucleic acid sequence set forth in SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2 or complements thereof or fragments of either. In another aspect of the present invention, a preferred marker nucleic acid molecule of the present invention shares between 80% and 100% or 90% and 100% sequence identity with the nucleic acid sequence set forth in SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2 or complement thereof or fragments of either. In a further aspect of the present invention, a preferred marker nucleic acid molecule of the present invention shares between 95% and 100% sequence identity with the sequence set forth in SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2 or complement thereof or fragments of either. SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2 may be used as markers in plant breeding methods to identify the progeny of genetic crosses similar to the methods described for simple sequence repeat DNA marker analysis, in "DNA markers: Protocols, applications, and overviews: (1997) 173-185, Cregan, et al., eds., Wiley-Liss NY; all of which is herein incorporated by reference in its' entirely. The hybridization of the probe to the target DNA molecule can be detected by any number of methods known to those skilled in the art, these can include, but are not limited to, fluorescent tags, radioactive tags, antibody based tags, and chemiluminescent tags.

[0037] Regarding the amplification of a target nucleic acid sequence (e.g., by PCR) using a particular amplification primer pair, "stringent conditions" are conditions that permit the

primer pair to hybridize only to the target nucleic-acid sequence to which a primer having the corresponding wild-type sequence (or its complement) would bind and preferably to produce a unique amplification product, the amplicon, in a DNA thermal amplification reaction.

[0038] The term "specific for (a target sequence)" indicates that a probe or primer hybridizes under stringent hybridization conditions only to the target sequence in a sample comprising the target sequence.

[0039] As used herein, "amplified DNA" or "amplicon" refers to the product of nucleic-acid amplification of a target nucleic acid sequence that is part of a nucleic acid template. For example, to determine whether the corn plant resulting from a sexual cross contains transgenic event genomic DNA from the corn plant of the present invention, DNA extracted from a corn plant tissue sample may be subjected to nucleic acid amplification method using a primer pair that includes a primer derived from flanking sequence in the genome of the plant adjacent to the insertion site of inserted heterologous DNA, and a second primer derived from the inserted heterologous DNA to produce an amplicon that is diagnostic for the presence of the event DNA. The amplicon is of a length and has a sequence that is also diagnostic for the event. The amplicon may range in length from the combined length of the primer pairs plus one nucleotide base pair, preferably plus about fifty nucleotide base pairs, more preferably plus about two hundred-fifty nucleotide base pairs, and even more preferably plus about four hundred-fifty nucleotide base pairs. Alternatively, a primer pair can be derived from flanking sequence on both sides of the inserted DNA so as to produce an amplicon that includes the entire insert nucleotide sequence. A member of a primer pair derived from the plant genomic sequence may be located a distance from the inserted DNA molecule, this distance can range from one nucleotide base pair up to about twenty thousand nucleotide base pairs. The use of the term "amplicon" specifically excludes primer dimers that may be formed in the DNA thermal amplification reaction.

[0040] Nucleic-acid amplification can be accomplished by any of the various nucleic-acid amplification methods known in the art, including the polymerase chain reaction (PCR). A variety of amplification methods are known in the art and are described, inter alia, in U.S. Patent Nos. 4,683,195 and 4,683,202 and in PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, ed. Innis et al., Academic Press, San Diego, 1990. PCR amplification methods have been developed to amplify up to 22 kb of genomic DNA and up to 42 kb of bacteriophage DNA (Cheng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5695-5699, 1994). These

methods as well as other methods known in the art of DNA amplification may be used in the practice of the present invention. The sequence of the heterologous DNA insert or flanking sequence from corn event MON89034 with seed samples deposited as ATCC numbers can be verified (and corrected if necessary) by amplifying such sequences from the event using primers derived from the sequences provided herein followed by standard DNA sequencing of the PCR amplicon or of the cloned DNA.

[0041] The amplicon produced by these methods may be detected by a plurality of techniques. One such method is Genetic Bit Analysis (Nikiforov, et al. Nucleic Acid Res. 22:4167-4175, 1994) where an DNA oligonucleotide is designed which overlaps both the adjacent flanking genomic DNA sequence and the inserted DNA sequence. The oligonucleotide is immobilized in wells of a microwell plate. Following PCR of the region of interest (using one primer in the inserted sequence and one in the adjacent flanking genomic sequence), a single-stranded PCR product can be hybridized to the immobilized oligonucleotide and serve as a template for a single base extension reaction using a DNA polymerase and labelled ddNTPs specific for the expected next base. Readout may be fluorescent or ELISA-based. A signal indicates presence of the insert/flanking sequence due to successful amplification, hybridization, and single base extension.

[0042] Another method is the pyrosequencing technique as described by Winge (Innov. Pharma. Tech. 00:18-24, 2000). In this method an oligonucleotide is designed that overlaps the adjacent genomic DNA and insert DNA junction. The oligonucleotide is hybridized to single-stranded PCR product from the region of interest (one primer in the inserted sequence and one in the flanking genomic sequence) and incubated in the presence of a DNA polymerase, ATP, sulfurylase, luciferase, apyrase, adenosine 5' phosphosulfate and luciferin. dNTP's are added individually and the incorporation results in a light signal which is measured. A light signal indicates the presence of the transgene insert/flanking sequence due to successful amplification, hybridization, and single or multi-base extension.

[0043] Fluorescence polarization as described by Chen, et al., (Genome Res. 9:492-498, 1999) is a method that can be used to detect the amplicon of the present invention. Using this method an oligonucleotide is designed which overlaps the genomic flanking and inserted DNA junction. The oligonucleotide is hybridized to single-stranded PCR product from the region of interest (one primer in the inserted DNA and one in the flanking genomic DNA sequence) and incubated in the presence of a DNA polymerase and a fluorescent-labeled

ddNTP. Single base extension results in incorporation of the ddNTP. Incorporation can be measured as a change in polarization using a fluorimeter. A change in polarization indicates the presence of the transgene insert/flanking sequence due to successful amplification, hybridization, and single base extension.

[0044] Taqman® (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) is described as a method of detecting and quantifying the presence of a DNA sequence and is fully understood in the instructions provided by the manufacturer. Briefly, a FRET oligonucleotide probe is designed which overlaps the genomic flanking and insert DNA junction. The FRET probe and PCR primers (one primer in the insert DNA sequence and one in the flanking genomic sequence) are cycled in the presence of a thermostable polymerase and dNTPs. Hybridization of the FRET probe results in cleavage and release of the fluorescent moiety away from the quenching moiety on the FRET probe. A fluorescent signal indicates the presence of the flanking/transgene insert sequence due to successful amplification and hybridization.

[0045] Molecular Beacons have been described for use in sequence detection as described in Tyangi, et al. (Nature Biotech.14:303-308, 1996) Briefly, a FRET oligonucleotide probe is designed that overlaps the flanking genomic and insert DNA junction. The unique structure of the FRET probe results in it containing secondary structure that keeps the fluorescent and quenching moieties in close proximity. The FRET probe and PCR primers (one primer in the insert DNA sequence and one in the flanking genomic sequence) are cycled in the presence of a thermostable polymerase and dNTPs. Following successful PCR amplification, hybridization of the FRET probe to the target sequence results in the removal of the probe secondary structure and spatial separation of the fluorescent and quenching moieties that results in the production of a fluorescent signal. The fluorescent signal indicates the presence of the flanking/transgene insert sequence due to successful amplification and hybridization.

[0046] Other described methods, such as, microfluidics (US Patent pub. 2006068398, US Patent No. 6,544,734) provide methods and devices to separate and amplify DNA samples. Optical dyes used to detect and quantitate specific DNA molecules (WO/05017181). Nanotube devices (WO/06024023) that comprise an electronic sensor for the detection of DNA molecules or nanobeads that bind specific DNA molecules and can then be detected.

[0047] DNA detection kits are provided using the compositions disclosed herein. The kits are useful for the identification of corn event MON89034 DNA in a sample and can be applied at least to methods for breeding corn plants containing the appropriate event DNA.

The kits contain DNA primers and/or probes that are homologous or complementary to segments selected from the sequences as set forth at SEQ ID NO:1-7, or DNA primers or probes homologous or complementary to DNA contained in the transgene genetic elements of DNA as set forth in the Sequence Listing. These DNA sequences can be used in DNA amplification reactions or as probes in a DNA hybridization method for detecting the presence of polynucleotides diagnostic for the presence of the target DNA in a sample. The production of a predefined amplicon in a thermal amplification reaction is diagnostic for the presence of DNA corresponding to PTO-7455 genome DNA in the sample. If hybridization is selected, detecting hybridization of the probe to the biological sample is diagnostic for the presence of the MON89034 transgenic event DNA in the sample. Typically, the sample is corn, or corn products or by-products of the use of corn.

[0048] The present invention provides a transgenic corn plant designated as corn event MON89034, progeny of the plant, and cells of the plant, as well as seed produced from the plant. Representative seed for growing the plant, for producing progeny, for obtaining cells, or for producing a crop of said seed comprising the transgenic corn event have been deposited on March 28, 2006 with the American Type Culture Collection (ATCC) and have the accession number PTA-7455.

[0049] The plant and cells and products produced from these embodiments and the like contain DNA that is diagnostic for the presence of DNA derived from any cell derived from the transgenic corn event MON89034 in any biological sample. This is because these two novel sequences are contained within the cells of the transgenic corn event MON89034. The diagnostic DNA comprises a nucleotide sequence that is selected from the group consisting of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, and SEQ ID NO:5. The relationship of these sequences is described more particularly herein and in the legend to Figure 1 and with reference to Figure 1.

[0050] Corn plants grown from seed that are homozygous for the DNA diagnostic for transgenic corn event MON89034 are also within the scope of the present invention. Corn plants grown from seed that are heterozygous for the DNA diagnostic for transgenic corn event MON89034 are also within the scope of the present invention so long as these seed also comprise the diagnostic DNA sequences. Cells, seed, and tissue produced from such plants comprising the diagnostic DNA are also within the scope of the present invention.

[0051] Corn plants and corn plant cells and the like comprising DNA diagnostic for the transgenic corn event MON89034 exhibit resistance to lepidopteran insect infestation. These cells and plants contain DNA encoding the insecticidal protein (insecticide, toxic agent) Cry2Ab and DNA having nucleotide sequences of SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2 that form a part of the genome of the cells of the plant. These plants and plant cells also contain a DNA encoding insecticidal protein (insecticide, toxic agent) Cry1A.105. These proteins can be referred to as a first and a second insecticidal protein, respectively or in the inverse. Expression of these proteins is achieved from the regulatory components/genetic elements that are embedded within the expression cassettes that provide for the expression of each of the DNA sequences encoding these toxins and are fully described herein and in the legend to Figure 1 and with reference to Figure 1 and the sequence as set forth at SEQ ID NO:5. Corn plants and corn plant cells comprising these sequences are effective for protecting plants from lepidopteran pest infestation, whether heterozygous or homozygous for the alleles in which these coding sequences are present.

[0052] The present invention also provides amplicons that can be produced from the sequences described herein that are diagnostic for the presence in a biological sample of DNA derived from DNA of the transgenic corn event MON89034. An amplicon diagnostic for the presence of transgenic corn event MON89034 DNA in a biological sample contains at least one polynucleotide segment consisting of the nucleotide sequence as set forth at SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2. These amplicons can be produced using primer sequences as described herein below from any biological sample that contains at least about 0.5 femto-mole or about 0.5 pico-gram of DNA derived from the transgenic corn event MON89034. Such biological sample sources of DNA corresponding to the transgenic corn event MON89034 can be corn meal, corn oil, corn cake, corn seed, corn germ, corn starch, and corn flour and the like derived form that transgenic event.

[0053] The invention also provides isolated polynucleotide molecules that exhibit contiguous nucleotide sequences such as those set forth in SEQ ID NO:5. These contiguous nucleotide sequences comprise: (1) from about 11 to about 12000 nucleotides and any length in-between, and further comprise the contiguous nucleotides as set forth at nucleotide position 1-11 or 9-20 in SEQ ID NO:1 and 1-11 or 9-20 as set forth in SEQ ID NO:2; (2) any contiguous nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO:3 from about 11 to about 2000 nucleotides and any length in-between, and further comprise the contiguous nucleotides as set

forth at nucleotide position 1-11 and 9-20 as set forth at SEQ ID NO:1; any contiguous nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO:4 from about 11 to about 914 nucleotides and any length in-between, and further comprise the contiguous nucleotides as set forth at nucleotide position 1-11 and 9-20 as set forth at SEQ ID NO:2. These isolated polynucleotide molecules are useful in DNA amplification methods to produce one or more amplicons from a biological sample that contains corn DNA. The detection of such an amplicon is diagnostic for the presence of transgenic corn event MON89034 DNA in the sample. The isolated polynucleotide molecules are also useful in various nucleotide detection methods for detecting the presence of DNA derived from transgenic corn event MON89034 in a biological sample. In particular, polynucleotide probes comprising at least about 11 contiguous nucleotide as set forth in SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2 are useful as probes in such methods for detecting the transgenic event MON89034 DNA in a sample. The complementary sequences of these isolated polynucleotide molecules are also useful in the same detection and/or amplification methods.

[0054] Kits for use in detecting the presence of DNA derived from the transgenic corn event MON89034 in a biological sample are also provide by the present invention. A kit uses a probe polynucleotide molecule, the probe molecule containing at least from about 11 to about 12000 contiguous nucleotides exhibiting substantial homology, or exhibiting substantial complementarity to a nucleotide segment comprising a sequence as set forth at SEQ ID NO:5, would be useful for detecting the presence of MON89034 DNA in a sample. The probe molecule should contain at least one of the sequences as set forth at SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2. The sequences set forth at SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2 can also be referred to as junction sequences, i.e., the sequences at either end of the transgenic DNA inserted into the corn plant to give rise to the transgenic corn event MON89034. These sequences, arbitrarily referred to as 5' and 3' ends respectively, contain part of the inserted DNA sequence and part of the flanking corn genome sequence. For example, SEQ ID NO:1 represents at its 5' half the 3' end terminus of the corn genome sequence flanking the 5' end of the inserted DNA, the 5' end of the inserted DNA being represented by the 3' end half of the sequence as set forth at SEQ ID NO:1. SEQ ID NO:2 represents at its 5' half the 3' end terminus of the inserted DNA, and at its 3' end half the 5' end of the corn genome sequence flanking the 3' end of the inserted DNA. In the naturally occurring corn genome at the position of the inserted sequence set forth in SEQ ID NO:5, the flanking sequence at the 5'

end of the inserted DNA and the flanking sequence at the 3' end of the inserted DNA are joined, and a first primer molecule that hybridizes to the sequence complementary to the sequence set forth at SEQ ID NO:3 (other than the 3' end 21 nucleotides of SEQ ID NO:3) and a second primer molecule that hybridizes to the sequence as set forth at SEQ ID NO:4 (other than the 5' end 20 nucleotides of SEQ ID NO:4) will produce an amplicon in a thermal amplification reaction with template that is DNA other than MON89034 DNA that is diagnostic for the absence of the inserted DNA in MON89034, and the same primers will produce an amplicon that is slightly larger than 12000 nucleotides (depending on the position of the primers in the flanking sequences set forth in SEQ ID NO:3 and SEQ ID NO:4) when using MON89034 DNA as a template. Other embodiments are also provided.

[0055] A kit for detecting the junction sequence SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2 of corn event MON89034 in a biological sample is provided. The kit contains a polynucleotide probe which is or is fully complementary to a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2 or complements thereof, and also contains a pair of primers for use in a nucleic-acid amplification reaction. The pair of primers can be referred to as a first primer consisting of at least about 15 to about 50 contiguous nucleotides from the corn genome portion of SEQ ID NO:3 and a second primer consisting of at least about 15 to about 50 contiguous nucleotides complementary to the heterologous insert DNA portion of SEQ ID NO:5. The first primer of the pair of polynucleotide primers hybridizes specifically to the reverse complement sequence corresponding to that set forth in SEQ ID NO:3 from about nucleotide position 1 through about position 2050 and the second primer of said pair of polynucleotide primers hybridizes specifically to the sequence as set forth in SEQ ID NO:5 from about nucleotide position 2060 through about nucleotide position 12,208, and are extended toward each other to form an amplicon which comprises SEQ ID NO:1, said amplicon being diagnostic for the presence of MON89034 event DNA in the sample. A different pair of primers can be referred to as a first primer consisting of at least about 15 to about 50 contiguous nucleotides complementary to the corn genome portion of SEQ ID NO:4 and a second primer consisting of at least about 15 to about 50 contiguous nucleotides from the heterologous insert DNA portion of SEQ ID NO:5. The first primer of the pair of polynucleotide primers hybridizes specifically to the reverse complement sequence corresponding to that set forth in SEQ ID NO:5 from about nucleotide position 1 through about position 11,370 and the second primer of the pair of polynucleotide primers hybridizes

specifically to the sequence as set forth SEQ ID NO:4 from about nucleotide position 1 through about nucleotide position 914, and are extended toward each other to form an amplicon which comprises SEQ ID NO:2, said amplicon being diagnostic for the presence of MON89034 event DNA in said sample.

[0056] These primer pairs are useful in producing amplicons that comprise either SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2, as the case may be, and are thus diagnostic for the presence of MON89034 DNA in a biological sample. These amplicons enable the detection of the presence of a junction sequence diagnostic corn event MON89034 in a biological sample.

[0057] A method for producing and detecting an amplicon that is diagnostic for a transgenic corn event MON89034 DNA in a biological sample comprising corn DNA is also provided. The method comprises contacting the biological sample together with two or more primers in a nucleic acid amplification reaction, performing a nucleic acid amplification reaction, then detecting the amplicon. The presence of the amplicon is diagnostic for said event DNA in the sample so long as the amplicon contains at least one of the contiguous sequences as set forth at SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2, from about nucleotide position 1-11 or 9-20, or the complementary sequences corresponding to these positions.

[0058] The nucleotide sequences diagnostic for the presence of transgenic corn event MON89034 in a biological sample can also be detected using other methods. For example, contacting a biological sample suspected of containing MON89034 DNA with a probe that hybridizes under stringent hybridization conditions with one or more of the nucleotide sequences as set forth at SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2, subjecting the sample and probe to stringent hybridization conditions; and then detecting hybridization of the probe to the nucleotide sequence. Detecting hybridization is diagnostic for the presence of the MON89034 DNA in the sample.

[0059] Primer polynucleotides for use in producing, in a thermal amplification reaction, an amplicon that is diagnostic for the presence of corn event MON89034 DNA in a biological sample are also provided by the present invention. Typically, the primers are provided in pairs, the members of the primer pair being referred to for convenience as a first primer and a second primer. A first primer can consist of at least about 15 contiguous nucleotides from the corn genome portion as set forth in SEQ ID NO:3 and a second primer can consist of at least about 15 contiguous nucleotides complementary to the heterologous insert DNA portion as set forth in SEQ ID NO:5. These two primers would produce an amplicon in a thermal

amplification reaction with template DNA obtained from corn event MON89034 DNA that contains a polynucleotide sequence as set forth at SEQ ID NO:1. Alternatively, a first primer can consist of at least about 15 contiguous nucleotides from the corn genome portion of SEQ ID NO:4, and a second primer can consist of at least about 15 contiguous nucleotides complementary to the heterologous insert DNA portion of SEQ ID NO:5. These two primers would produce an amplicon in a thermal amplification reaction with template DNA obtained from corn event MON89034 DNA that contains a polynucleotide sequence as set forth at SEQ ID NO:2.

[0060] An alternative method for detecting a junction sequence of corn event MON89034 in a biological sample comprising corn DNA, such as SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2, consists of contacting the sample with a polynucleotide probe that hybridizes under stringent hybridization conditions with one of the junction sequences, subjecting the sample and probe to stringent hybridization conditions; and detecting hybridization of the probe to the junction sequence. Detecting the binding/hybridization of the probe to the junction sequence is indicative of the presence of the MON89034 DNA in the biological sample. A stably transformed maize plant, the DNA of which produces a DNA amplicon comprising SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2 when subjected to the method set forth herein, is within the scope of the present invention. Exemplary primer sequences, in particular, a pair of primer sequences, are set forth herein in the examples and at SEQ ID NO:6 and SEQ ID NO:7.

[0061] An alternative method of detecting the presence of corn event MON89034 DNA in a biological sample can consist of the steps of contacting the sample with a probe that hybridizes under stringent hybridization conditions with MON89034 DNA and does not hybridize under stringent hybridization conditions with corn plant genomic DNA that is not MON89034 DNA, subjecting the sample and probe to stringent hybridization conditions, and then detecting hybridization of the probe to MON89034 DNA. A probe consistent with this embodiment is or is complementary to a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2. Detecting hybridization of the probe to the sample is diagnostic for the presence of the corn event MON89034 polynucleotide in the sample. The biological sample can be any sample containing MON89034 DNA including but not limited to corn oil, corn meal, corn flour, corn gluten, corn cakes, corn starch, corn steep liquor, corn tissue, corn cells, corn grain, corn pollen, corn root tissue, DDGS, and even ethanol produced as a byproduct of fermentation of such transgenic corn so long as the sample contains at least a

detectable amount of a polynucleotide diagnostic for the presence of the MON89034 event in the sample. A polynucleotide probe can be any nucleotide selected from the group consisting of a deoxyribonucleic acid, a ribonucleic acid, and a nucleotide analogue, and can be labeled with at least one fluorophores, molecule containing a radio-emitting isotope, or a hapten type molecule that can be detected specifically with an antibody or other binding type reaction.

[0062] A variety of corn comprising a DNA diagnostic for the presence of a MON89034 transgenic event DNA can be obtained by breeding a corn plant comprising transgenic corn event MON89034 DNA together with a corn plant other than event MON89034 to produce a hybrid corn plant comprising DNA diagnostic for said event. Such a hybrid corn plant comprising DNA diagnostic for the transgenic corn event MON89034 is within the scope of the present invention, as are seed produced from the hybrid (so long as the comprises DNA diagnostic for transgenic corn event MON89034), and pollen, ovule, seed, roots, or leaves of the hybrid corn plant MON89034, also to the extent these contain the diagnostic DNA sequences, and progeny produced from such embodiments.

[0063] The present invention provides a method for protecting a corn plant from lepidopteran insect infestation comprising providing in the diet of a target lepidopteran insect pest one or more transgenic corn plant cells, each corn plant cell comprising in its genome a polynucleotide corresponding to the sequence as set forth in both SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2 and the contiguous nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO:5 between SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2. The target lepidopteran insect that feeds on such transgenic corn plant cells is inhibited from further feeding on the corn plant from which the corn plant cells are derived.

[0064] Compositions are also provided by the present invention that are toxic to target lepidopteran pests of corn plants. A composition of transgenic plant cells provided in the diet of a target lepidopteran insect pest, in which each transgenic corn plant cell comprises in its genome a polynucleotide corresponding to the sequence as set forth in both SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2, along with the contiguous nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO:5 between SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2, is effective for providing protection against lepidopteran insect infestation to a corn plant or corn plant cell, so long as the corn plant or cell is expressing Cry1A.105 and/or Cry2Ab2 from the expression cassettes contained within the contiguous nucleotide sequence. Such compositions, in the form of transgenic corn seed, have been deposited with the American Type Culture Collection under accession number

PTA-9708. Such insect resistant corn plants, or parts thereof, will contain DNA in the genome of the cells of such plant that have at least one nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, and SEQ ID NO:5. Progeny and seed of the insect resistant corn plant, in which the progeny and seed have the diagnostic sequences referred to herein, are also included within the scope of the present invention. Such insect resistant corn plants can be produced in a method comprising crossing a transgenic corn plant event MON89034 with a different corn plant, and selecting insect resistant progeny by analyzing for at least one nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 and SEQ ID NO:5.

[0065] The insect resistant transgenic corn event MON89034 can be combined with other transgenic varieties of corn, such as corn resistant to herbicides such as glyphosate, glufosinate, and diacamba, and the like, or corn resistant to root devouring insects as a result of insertion of sequences encoding proteins such as PS149B1 and modified Cry3Bb, or other varieties of transgenic corn resistant to lepidopteran insect infestation as a result of insertion of sequences encoding other toxin proteins such as VIP3A, Cry1Ab, and Cry1Fa and the like. Various combinations of all of these different transgenic events are bred together with the corn plants of the present invention, i.e., the MON89034 event, to provide improved varieties of hybrid transgenic corn resistant to coleopteran and lepidopteran infestation, and resistant to selective herbicides. Such varieties exhibit improved yield and drought tolerance characteristics compared to non-transgenic and individual trait transgenic varieties.

[0066] A method of producing a corn plant resistant to insect infestation is provided, wherein the corn plant comprises an insecticidally effective amount of the toxin coding sequences as set forth in SEQ ID NO:5. The method comprises extracting the toxin coding sequences from transgenic corn event MON89034 and introducing these coding sequences, alone or together, into one or more corn cells, to produce transgenic corn cells comprising these one or more toxin coding sequences. The transgenic corn cells are then grown (regenerated) into transgenic corn plants comprising the one or more coding sequences, and the transgenic plants then exhibit resistance to insect infestation.

[0067] A method for determining the zygosity of the DNA of a transgenic corn plant comprising corn event MON89034 DNA, with respect to the DNA that is diagnostic for the presence of such MON89034 DNA in a biological sample, is provided by the present

invention. The method consists of, as a first step, contacting the sample with three different primers comprising SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, and SEQ ID NO:10, that when used together in a nucleic-acid amplification reaction comprising corn event MON89034 DNA, produces a first amplicon that is diagnostic for corn event MON89034, and when used in a nucleic-acid amplification reaction comprising corn genomic DNA other than MON89034 DNA, produces a second amplicon that is diagnostic for corn genomic DNA other than MON89034 DNA. The following steps consist of performing a nucleic acid amplification reaction, and comparing the amplicons produced during the thermal amplification reaction. Detecting the presence of both amplicons is diagnostic of the zygosity of the sample. Detecting only the first amplicon is indicative of the sample containing only MON89034 DNA, i.e., a homozygous sample. Detecting only the second amplicon is indicative of the sample containing no MON89034 DNA. Detecting both the first and second amplicons together in a sample is indicative of a sample containing (1) heterozygous DNA with reference to a pure sample containing only heterozygous starting material, or (2) a sample containing both homozygous and heterozygous starting sample DNA's, or (3) a sample containing some combination of homozygous, heterozygous, and/or samples other than MON89034 DNA.

[0068] The invention also provides for growing corn plants comprising DNA diagnostic for a transgenic DNA segment inserted into the genome of the cells of the corn plants. The DNA in the genome of the corn cells comprises any one or all of the sequences selected from the group consisting of:

(a) the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO:5;

(b) both of the nucleotide sequences as set forth SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2;

(c) the nucleotide sequence as set forth at SEQ ID NO:3; and

(d) the nucleotide sequence as set forth at SEQ ID NO:4.

[0069] The following examples are included to demonstrate examples of certain preferred embodiments of the invention. It should be appreciated by those of skill in the art that the techniques disclosed in the examples that follow represent approaches the inventors have found function well in the practice of the invention, and thus can be considered to constitute examples of preferred modes for its practice. However, those of skill in the art should, in light of the present disclosure, appreciate that many changes can be made in the specific

embodiments that are disclosed and still obtain a like or similar result without departing from the spirit and scope of the invention.

EXAMPLES

[0070] Example 1

[0071] This Example illustrates the construction and molecular characterization of transgenic corn event MON89034.

[0072] The corn plant MON89034 was produced by an Agrobacterium mediated transformation process of an inbred corn line with the plasmid construct pMON38850 (the expression cassette is shown in Figure 1). The transformation method used is similar to that described in US Patent No. 6,603,061. The plasmid construct pMON38850 contains the linked plant expression cassettes with the regulatory genetic elements necessary for expression of the Cry1A.105 insecticidal protein in corn plant cells. Corn cells were regenerated into intact corn plants consisting of at least about 23,000 different transgenic events. Individual transgenic events (plants) were selected from the population of events that showed integrity of the plant expression cassettes and resistance to Lepidopteran insect larvae feeding damage. A corn plant that contains in its genome the linked plant expression cassettes of pMON38850 is an aspect of the present invention. After substantial analysis of these transgenic events, the MON89034 transgenic event was selected on the basis of its molecular characterization and the absence of any undesirable phenotypic or agronomic deficiency effects.

[0073] The sequences of the transgene genetic elements contained in MON89034 corn genome as illustrated in Figure 1 consists of the following elements each in operable linkage to each other. First at the arbitrarily defined 5' end of the sequence (i.e., near the left central portion of the segment depicted in Figure 1) is labeled a portion of the right border region (RB) from Agrobacterium tumefaciens. This is followed in sequence by an expression cassette consisting of an enhanced CaMV 35S promoter element (herein referred to as P-CaMV35Sen, located at positions 2350 to 2651 on SEQ ID NO:5); a wheat chlorophyll A/B binding protein untranslated leader sequence (herein referred to as L-Ta.lhcb1, located at positions 2678 to 2738 on SEQ ID NO:5); a rice actin intron sequence (herein referred to as I-Os.Act1, located at positions 2755 to 3234 on SEQ ID NO:5); a non-naturally occurring sequence encoding the chimeric gene Cry1A.105 (located at positions 3244 to 6777 on SEQ ID NO:5); and a 3' termination region from wheat (herein referred to as T-Ta.Hsp17-1:1:1, located at positions 6809 to 7018 on SEQ ID NO:5). The combination of the above referenced elements, other than the border sequence, function together when in a corn plant to

cause the expression of the Cry1A.105 insecticidal protein. These elements are then linked in sequence to another expression cassette consisting of the following elements: a Figwort mosaic promoter (located at positions 7086 to 7649 on SEQ ID NO:5), a Zea mays Hsp70 leader (herein referred to as HSP70 or I-Hsp70, located at positions 7672 to 8475 on SEQ ID NO:5), and a Zea mays chloroplast transit peptide coding sequence (herein referred to as CTP2 or TS-SSU-CTP, located at positions 8492 to 8892 on SEQ ID NO:5). These operably linked segments are then linked to a nucleotide sequence encoding the insecticidal protein Cry2Ab (located at positions 8893 to 10800 on SEQ ID NO:5), which is linked at its 3' end to a 3' non-translated region of the nopaline synthase gene of Agrobacterium tumefaciens (herein referred to as T-AGRtu.nos-1:1:13, located at positions 10827 to 11377 on SEQ ID NO:5). These elements flanking the Cry2Ab coding sequence function together to direct the expression of Cry2Ab when present in a corn plant. The Cry2Ab expression cassette is then followed in sequence by a nucleotide sequence consisting of a sufficient portion of the left border (LB) region from Agrobacterium tumefaciens.

[0074] DNA molecules useful as primers in DNA amplification methods can be derived from the sequences of the genetic elements of the transgene insert contained in the MON89034 event. These primer molecules can be used as part of a primer set that also includes a DNA primer molecule derived from the genome of event flanking the transgene insert.

[0075] The portion of the pMON38850 plasmid DNA inserted into the corn genome, giving rise to the transgenic corn plant event MON89034, consisting of the left and right border segments and the two linked plant expression cassettes (a first expression cassette encoding Cry1A.105, and a second expression cassette encoding Cry2Ab, wherein each cassette can be interchangeable as to whether one is designated as being a first or a second cassette) in between the border segments was characterized by detailed molecular analyses. These analyses were conducted to identify events that contained only a single and intact inserted segment consisting of the borders and the desired two expression cassettes in between the borders (number of integration sites within the corn genome), the copy number (the number of copies of the T-DNA within one locus), and the integrity of the inserted gene cassettes (i.e., absence of any rearrangements or sequence variation from the sequence known to be present in the plasmid pMON38850). DNA molecular probes were used that included the intact Cry1A.105 coding region and its respective regulatory elements, the promoters,

introns, and polyadenylation sequences of the plant expression cassettes, and plasmid pMON38850 backbone DNA region. The data obtained from the analyses of all events demonstrated that MON89034 contains a single T-DNA insertion with one copy of the Cry1A.105 expression cassette. No additional elements from the transformation vector pMON38850, linked or unlinked to intact gene cassettes, were detected in the genome of MON89034. Finally, PCR and DNA sequence analyses were performed to determine the 5' and 3' insert-to-plant genome junctions, confirm the organization of the elements within the insert (see for example, Figure 1), and determine the complete sequence of the DNA inserted into the corn plant genome that gave rise to the transgenic corn event MON89034. The complete inserted sequence, together with a portion of the corn genome flanking sequences at either end of the inserted DNA, is depicted in the sequence as set forth at SEQ ID NO:5.

[0076] Genomic DNA from MON89034, and non transgenic DNA from corn other than MON89034 (control DNA) was extracted from corn seed by first processing the seed (up to 200 seeds) to a fine powder in a Harbil 5G-HD paint shaker (Harbil Inc, Cincinnati, Ohio). Briefly, the powdered seed was extracted in extraction buffer (EM Science Cat. No. 3700, EM Science, Gibbstown, New Jersey, USA) and DNA precipitated from solution with isopropanol (Sigma Cat. No. I-0398, Sigma, St. Louis, MO, USA). The precipitated DNA was spooled into a microcentrifuge tube containing 70 percent ethanol. The DNA was pelleted in a microcentrifuge at maximum speed (~14,000 rpm) for ~5 minutes, vacuum-dried, and re-dissolved in TE buffer (pH 8.0). The DNA was then stored in a 4°C refrigerator. This method can be modified by one skilled in the art to extract DNA from a single corn seed.

[0077] Exemplary methods used to identify event MON89034 in a sample are described in an event specific endpoint Taqman PCR for which examples of conditions are described in Table 1 and Table 2. The DNA primers used in the assay are primers SQ2842 (SEQ ID NO:6), SQ2843 (SEQ ID NO:7), 6FAM™ labeled primer PB880 (SEQ ID NO:14) and VIC™ labeled primer PB2931 (SEQ ID NO:15), 6FAM and VIC are florescent dye products of Applied Biosystems (Foster City, CA) attached to the DNA primers. For Taqman MGB probes, the 5'-exonuclease activity of Taq DNA polymerase cleaves the probe from the 5'-end, between the fluorophore and quencher. When hybridized to the target DNA strand, quencher and fluorophore are separated sufficiently in three dimensional space to produce a fluorescent (fluorophore excitation wavelength) signal.

[0078] SQ2842 (SEQ ID NO:6), and SQ2843 (SEQ ID NO:7), when used in these reaction methods with PB880 (SEQ ID NO:14) produce a DNA amplicon that is diagnostic for event MON89034 DNA. The controls for this analysis should include a positive control from corn containing event MON89034 DNA, a negative control from non-transgenic corn or from transgenic corn other than event MON89034, and a negative control that contains no template DNA.

[0079] SQ1564 (SEQ ID NO:17) and SQ1565 (SEQ ID NO:18) when used in these reaction methods with PB351 (SEQ ID NO:21) produce an amplicon that is diagnostic of Cry1A.105 in MON89034.

[0080] These assays are optimized for use with an Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700 or Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700, or Eppendorf Mastercycler Gradient thermocycler. Other methods and apparatus known to those skilled in the art that produce amplicons that identify the identify event MON89034 DNA is within the skill of the art.

[0081] Any probe that binds specifically to SEQ ID NO:1 or to its perfect complementary sequence in a biological sample and contains at least 11 contiguous nucleotides as set forth in SEQ ID NO:1, or as the case may be, the reverse complement of the sequence in SEQ ID NO:1, so long as the binding can be detected, is diagnostic for the presence of corn event MON89034 DNA in that sample. Any probe that binds specifically to SEQ ID NO:2 or to its perfect complementary sequence in a biological sample and contains at least 11 contiguous nucleotides as set forth in SEQ ID NO:2, or as the case may be, the reverse complement of the sequence in SEQ ID NO:2, so long as the binding can be detected, is diagnostic for the presence of corn event MON89034 DNA in that sample.

[0082] Any pair of primers that is used for or designed for use in producing an amplicon from a biological sample comprising corn DNA, and the amplicon comprises either SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2, or as the case may be, comprises both sequences, is considered to be within the scope of the present invention. Any such amplicon comprising either SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2 or both is considered, for the purposes of the invention disclosed herein, to be diagnostic for the presence of the corn event MON89034 DNA in such biological sample. The following example is provided as reference for one skilled in the art.

Table 1. Corn MON89034 Event Specific Endpoint Taqman PCR

Step	Reagent	Amount	Comments
1	Nuclease-free water	add to10 µl final volume	-
2	2X Universal Master Mix (Applied Biosystems cat. # 4304437)	5µl	1 X final concentration
3	Primers SQ2842 (SEQ ID NO:6), and SQ2843(SEQ ID NO:7) resuspended in nuclease-free water to a concentration of 20 µM each)	0.5 µl	1.0 µM final concentration
4	Primer 6FAM™ (resuspended in nuclease-free water to a concentration of 10 µM)	0.2 µl	0.2 µM final concentration
5	Internal Control Primer -SQ2842 and internal control primer SQ2843	0.2 µl	0.2 µM final concentration
6	Extracted DNA (template): • Samples to be analyzed (individual leaves) • Negative control • Negative control • Positive control • Positive control	3.0 µl • 4-80 ng of genomic DNA • 4 ng of non-transgenic corn genomic DNA • no DNA template (solution in which DNA was resuspended) • 4 ng of genomic DNA from known event MON89034 heterozygous corn • 4 ng of genomic DNA from known event MON89034 homozygous corn	Diluted in water
7	Gently mix, add 1-2 drops of mineral oil on top of each reaction.		

[0083] The DNA amplification can be set up and conducted using any means for thermocycling, including manual manipulations or electronically controlled manipulations of temperature steps and cycles. Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700, or Eppendorf Mastercycler Gradient thermocycler or Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700 or MJ Research DNA Engine PTC-225 thermal cyclers have been used successfully to conduct the following cycling parameters. When running the PCR in the

Eppendorf Mastercycler Gradient or MJ Engine, the thermocycler was cycled in the calculated mode. When using the Perkin-Elmer 9700, the cycling conditions were conducted with the ramp speed set at maximum.

Table 2. Zygosity assay thermocycler conditions

Cycle No.	Settings: Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700
1	50°C 2 minutes
1	95°C 10 minutes
10	95°C 15 seconds 64°C 1 minute (-1°C/ cycle)
30	95°C 15 seconds 54°C 1 minute
1	10°C soak

[0084] Example 2

[0085] This example illustrates the identification of a corn plant comprising DNA diagnostic for the transgenic corn event MON89034 in its genome and the determination of the zygosity of such corn plant.

[0086] The methods used to identify heterozygous from homozygous progeny containing event MON89034 DNA in its genome are described in a zygosity assay for which conditions are exemplified in Table 3 and Table 4. The exemplary DNA primers used in the zygosity assay are primers SQ2842 (SEQ ID NO: 6), SQ2843(SEQ ID NO:7), SQ6523(SEQ ID NO:10), SQ6524(SEQ ID NO:11), 6FAM™ labeled primer PB880(SEQ ID NO:14) and VIC™ labeled primer PB2931(SEQ ID NO:15). As indicated above, 6FAM and VIC are florescent dye products of Applied Biosystems (Foster City, CA) attached to the DNA primer.

[0087] SQ2842 (SEQ ID NO:6), SQ2843(SEQ ID NO:7), SQ6523(SEQ ID NO:10), SQ6524(SEQ ID NO:11), when used together in a thermal amplification reaction in which a biological sample containing template DNA contains DNA that is diagnostic for the presence corn event MON89034 in the sample, produces a DNA amplicon diagnostic for corn DNA other than corn event MON89034 DNA (independent of whether the corn DNA is derived from non transgenic or from some other transgenic sample). Alternatively, the reaction will

produce two different DNA amplicons from a biological sample containing DNA derived from a corn genome that is heterozygous for the allele corresponding to the inserted DNA present in transgenic corn event MON89034. These two different amplicons will correspond to a first amplicon that is derived from the wild type corn genome locus, and a second amplicon that is diagnostic for the presence of corn event MON89034 DNA. A sample of corn DNA that gives rise only to a single amplicon corresponding to the second amplicon described for the heterozygous genome is diagnostic for the presence of corn event MON89034 in the sample and is diagnostic for determining that the corn DNA used as template arise from a corn seed that is homozygous for the allele corresponding to the transgenic corn event MON89034 inserted DNA. The controls for this analysis should include a positive control from homozygous and heterozygous corn containing event MON89034 DNA, a negative control from non-transgenic corn or any other transgenic variety of corn, and a negative control that contains no template DNA. This assay is optimized for use with a Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700, or Eppendorf Mastercycler Gradient thermocycler. Other methods and apparatus known to those skilled in the art that produce amplicons that identify the zygosity of the progeny of crosses made with MON89034 plants is within the skill of the art.

Table 3. Zygosity assay reaction solutions

Step	Reagent	Amount	Comments
1	Nuclease-free water	add to 5 µl final volume	-
2	2X Universal Master Mix (Applied Biosystems cat. # 4304437)	2.5µl	1 X final concentration
3	Primers SEQ ID NO:6, and SEQ ID NO:7 (resuspended in nuclease-free water to a concentration of 20 µM)	0.05 µl	0.25 µM final concentration
4	PB880 SEQ ID NO:14 Primer 6FAM™ (resuspended in nuclease-free water to a concentration of 10 µM)	0.01 µl	0.4 µM final concentration
5	PB2931 SEQ ID NO:15 Primer VIC™ (resuspended in nuclease-free water to a concentration of 10 µM)	0.01 µl	0.15 µM final concentration
6	*REDTaq* DNA polymerase (1 unit/µl)	1.0 µl (recommended to switch pipets prior to next step)	1 unit/reaction
7	Extracted DNA (template): • Samples to be analyzed (individual leaves) • Negative control • Negative control • Positive control • Positive control	2.0 µl • 4-80 ng of genomic DNA • 4 ng of non-transgenic corn genomic DNA • no DNA template (solution in which DNA was resuspended) • 4 ng of genomic DNA from known event MON89034 heterozygous corn • 4 ng of genomic DNA from known event MON89034 homozygous corn	Diluted in water
8	Gently mix, add 1-2 drops of mineral oil on top of each reaction.		

[0088] DNA amplificaition in a Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700, or Eppendorf Mastercycler Gradient thermocycler or Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700 or MJ Research DNA Engine PTC-225 thermal cycler have been used

successfully to conduct the following cycling parameters. When using the Eppendorf Mastercycler Gradient or MJ Engine, the cycles were conducted in the calculated mode. When using the Perkin-Elmer 9700, the cycles were conducted with the ramp speed set at maximum.

Table 4. Zygosity assay thermocycler conditions[a]

No. of Cycles in Consecutive Order	Temperature and Duration
1	50°C 2 minutes
1	95°C 10 minutes
10	95°C 15 seconds 64°C 1 minute (-1°C/cycle)
30	95°C 15 seconds 54°C 1 minute
1	10°C soak

a: using Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700

[0089] Seed corresponding to the transgenic event MON89034 have been deposited on March 28, 2006 under the Budapest Treaty with the American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110. The ATCC accession number or patent deposit designation is PTA-7455. The deposit will be maintained in the depository for a period of 30 years, or 5 years after the last request, or for the effective life of the patent, whichever is longer, and will be replaced as necessary during that period.

[0090] Having illustrated and described the principles of the present invention, it should be apparent to persons skilled in the art that the invention can be modified in arrangement and detail without departing from such principles. We claim all modifications that are within the spirit and scope of the appended claims.

[0091] All publications and published patent documents cited in this specification are incorporated herein by reference to the same extent as if each individual publication or patent application was specifically and individually indicated to be incorporated by reference.

What is claimed is:

1. A transgenic corn plant designated as transgenic corn event MON89034, representative seed for obtaining said plant, for producing progeny, for obtaining growing plants, or for producing a crop of seed comprising said transgenic corn event, deposited with American Type Culture Collection (ATCC) having accession number PTA-7455.

2. The transgenic corn plant according to claim 1, comprising DNA diagnostic for said event, wherein said DNA comprises a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, and SEQ ID NO:5.

3. The transgenic corn plant, progeny of said plant, cells of a plant grown from said plant, or seed produced from said plant, according to claim 2, wherein said DNA diagnostic for said event is further selected from the group consisting of SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2.

4. The transgenic corn plant according to claim 3 processed into a commodity or foodstuff selected from the group consisting of corn meal, corn flour, corn oil, corn protein, ethanol, and DDGS.

5. The transgenic corn plant of claim 1, exhibiting resistance to lepidopteran insect infestation.

6. The transgenic corn plant according to claim 1, comprising in the genome of the cells of said plant a DNA molecule selected from the group consisting of SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2.

7. An amplicon diagnostic for the presence of transgenic corn event MON89034 DNA in a biological sample, said amplicon comprising a polynucleotide sequence selected from the group consisting of the sequences as set forth at SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2.

8. The amplicon of claim 7, wherein said biological sample comprises corn meal, corn oil, corn cake, corn seed, corn germ, corn starch, and corn flour.

9. An isolated polynucleotide molecule comprising contiguous nucleotides selected from the group of contiguous nucleotides as set forth in SEQ ID NO:5, wherein said contiguous nucleotides comprise from about 11 to about 12000 nucleotides, and further comprise the contiguous nucleotides selected from the group consisting of nucleotides 1-11 or 9-20 as set forth at SEQ ID NO:1 and nucleotides 1-11 or 9-20 as set forth at SEQ ID NO:2.

10. An isolated polynucleotide molecule comprising contiguous nucleotides selected from the group of contiguous nucleotides as set forth in SEQ ID NO:3, wherein said contiguous nucleotides comprise from about 11 to about 2000 nucleotides, and further comprise the contiguous nucleotides selected from the group consisting of nucleotides 1-11 and 9-20 as set forth at SEQ ID NO:1.

11. An isolated polynucleotide molecule comprising contiguous nucleotides selected from the group of contiguous nucleotides as set forth in SEQ ID NO:4, wherein said contiguous nucleotides comprise from about 11 to about 914 nucleotides, and further comprise the contiguous nucleotides selected from the group consisting of nucleotides 1-11 and 9-20 as set forth at SEQ ID NO:2.

12. The isolated polynucleotide molecule of any of claims 9-11 wherein said contiguous nucleotides, or the complement thereof is useful in a DNA amplification method to produce an amplicon from a biological sample comprising corn DNA, wherein said detection of said amplicon is diagnostic for the presence of transgenic corn event MON89034 DNA in said sample.

13. The isolated polynucleotide molecule of any of claims 9-11 wherein said contiguous nucleotides, or the complement thereof is useful in a nucleotide detection method for detecting the presence of transgenic corn event MON89034 in a biological sample.

14. A kit for detecting the presence of transgenic corn event MON89034 DNA in a biological sample comprising a probe polynucleotide molecule consisting of at least from about 11 to about 12000 contiguous nucleotides exhibiting substantial homology, or exhibiting substantial complementarity to a nucleotide segment comprising a sequence as set forth at SEQ ID NO:5, wherein said probe comprises a nucleotide sequence selected from the group consisting of sequences as set forth at SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2.

15. A method for detecting an amplicon that is diagnostic for a transgenic corn event MON89034 DNA in a biological sample comprising corn DNA, the method comprising:

(a) contacting said biological sample together with two or more primers in a nucleic acid amplification reaction;

(b) performing a nucleic acid amplification reaction; and

(c) detecting the amplicon;

wherein the amplicon comprises a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2; and

wherein the presence of said amplicon is diagnostic for said event DNA in said sample.

16. The method of claim 15, wherein said amplicon comprises a nucleotide sequence selected from the group consisting of contiguous nucleotides 1-11 or 9-20 of SEQ ID NO:1 and 1-11 or 9-20 of SEQ ID NO:2.

17. A method for detecting the presence of a polynucleotide molecule diagnostic for the presence of transgenic corn event MON89034 in a sample, the method comprising:

(a) contacting said sample with a probe that hybridizes under stringent hybridization conditions with said polynucleotide molecule;

(b) subjecting said sample and probe to stringent hybridization conditions; and

(c) detecting hybridization of said probe to said polynucleotide molecule;

wherein said polynucleotide molecule comprises a sequence selected form the group consisting of SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2; and

wherein detecting hybridization in said detecting step is diagnostic for the presence of said polynucleotide molecule in said sample.

18. An isolated and purified polynucleotide molecule comprising a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2.

19. A hybrid corn plant comprising DNA diagnostic for transgenic corn event MON89034 produced by breeding a transgenic corn event MON89034 together with a corn plant other than event MON89034.

20. Seed of the hybrid corn plant of Claim 20, wherein sa id seed comprise said DNA.

21. A hybrid corn plant comprising DNA diagnostic for the transgenic corn event MON89034.

22. Seed of the hybrid corn plant of claim 21, wherein said seed comprises DNA diagnostic for transgenic corn event MON89034.

23. A corn plant grown from seed comprising DNA diagnostic for transgenic corn event MON89034.

24. A cell, seed produced from, or tissue collected from the corn plant of claim 23, wherein said cell, seed, or tissue comprises said DNA.

25. A method for protecting a corn plant from lepidopteran insect infestation comprising providing in the diet of a target lepidopteran insect pest one or more transgenic corn plant cells, each corn plant cell comprising in its genome a polynucleotide corresponding to the sequence as set forth in both SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2 and the contiguous nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO:5 between SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2, wherein a target lepidopteran insect that feeds on said transgenic corn plant cell is inhibited from further feeding on said corn plant.

26. The method of claim 25, wherein said corn plant further comprises a different insecticidal agent selected from the group consisting of a protein toxin to an insect of a class other than a lepidopteran, a protein toxic to a nematode, a dsRNA targeting a gene in a target pest for suppression, and an antifungal protein.

27. A composition of transgenic plant cells for protecting a corn plant from lepidopteran insect infestation, said composition being provided in the diet of a target lepidopteran insect pest, wherein each said transgenic corn plant cell comprises in its genome a polynucleotide corresponding to the sequence as set forth in both SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2 and the contiguous nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO:5 between said SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2.

28. An insect resistant corn plant, or parts thereof, seed of said corn plant having been deposited with the American Type Culture Collection under accession number PTA-7455.

29. An insect resistant corn plant cell, wherein DNA having at least one nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, and SEQ ID NO:5 form part of the plant cell's genome.

30. Progeny cells of the insect resistant corn plant cell of claim 28 wherein DNA having at least one nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, and SEQ ID NO:5 form part of the plant cell's genome.

31. The progeny cells of claim 30, wherein said cells are found within a seed of a plant regenerated or grown from the corn plant cell or progeny cells of claim 29, wherein said seed comprises said at least one nucleotide sequence.

32. A method of producing an insect resistant corn plant comprising regenerating a corn plant from the cell or progeny cell of claim 30 and crossing said corn plant with a different corn plant to produce progeny corn plants, and selecting insect resistant progeny plants by analyzing each for at least one nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 and SEQ ID NO:5.

33. An insect resistant corn plant, or a part thereof, wherein DNA encoding Cry2Ab and DNA having nucleotide sequences of SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2 form a part of the genome in the cells of said plant or part thereof.

34. The insect resistant corn plant cell of claim 33, further comprising a DNA encoding Cry1A.105.

35. The insect resistant corn plant of claim 34, wherein the cells of the corn plant (other than the gametes) are heterozygous for the nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, and SEQ ID NO:5.

36. The insect resistant corn plant cell of claim 28, wherein the corn plant cell is homozygous for the nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, and SEQ ID NO:5.

37. A method of detecting a polynucleotide in a biological sample comprising corn DNA diagnostic for corn event MON89034, wherein said polynucleotide comprises a junction sequence as set forth at SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2, the method comprising:

(a) contacting said sample with a pair of primers that when used in a nucleic-acid amplification reaction with DNA from corn event MON89034, produces an amplicon that is diagnostic for corn event MON89034;

(b) performing a nucleic acid amplification reaction, thereby producing the amplicon; and

(c) detecting the amplicon;

wherein said pair of primers is selected from the group consisting of (1) a first primer comprising at least about 15 contiguous nucleotides from the corn genome portion of SEQ ID NO:3 and a second primer comprising at least about 15 contiguous nucleotides complementary to the heterologous insert DNA portion of SEQ ID NO:5, and (2) a first primer comprising at least about 15 contiguous nucleotides complementary to the corn genome portion of SEQ ID NO:4 and a second primer comprising at least about 15 contiguous nucleotides from the heterologous insert

DNA portion of SEQ ID NO:5; wherein said amplicon in (1) comprises SEQ ID NO:1 and in (2) comprises SEQ ID NO:2.

38. A pair of polynucleotide primers for use in producing in a thermal amplification reaction an amplicon diagnostic for the presence of corn event MON89034 DNA in a biological sample, the primer pair being selected from the group consisting of:

(a) a first primer comprising at least about 15 contiguous nucleotides from the corn genome portion of SEQ ID NO:3; and a second primer comprising at least about 15 contiguous nucleotides complementary to the heterologous insert DNA portion of SEQ ID NO:5; and

(b) a first primer comprising at least about 15 contiguous nucleotides complementary to the corn genome portion of SEQ ID NO:4; and a second primer comprising at least about 15 contiguous nucleotides from the heterologous insert DNA portion of SEQ ID NO:5,

wherein said amplicon produced with the primer pair in (1) comprises SEQ ID NO:1 or its complement and said amplicon in (2) comprises SEQ ID NO:2 or its complement.

39. A kit for detecting junction sequence SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2 of corn event MON89034 in a biological sample, said kit comprising: (1) a nucleotide probe which is or is fully complementary to a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2, and (2) a pair of primers for use in a nucleic-acid amplification reaction, said pair of primers being selected from the group consisting of:

(a) a first primer comprising at least about 15 contiguous nucleotides from the corn genome portion of SEQ ID NO:3 and a second primer comprising at least about 15 contiguous nucleotides complementary to the heterologous insert DNA portion of SEQ ID NO:5; and

(b) a first primer comprising at least about 15 contiguous nucleotides complementary to the corn genome portion of SEQ ID NO:4; and a second primer comprising at least about 15 contiguous nucleotides from the heterologous insert DNA portion of SEQ ID NO:5.

40. A method for detecting junction sequence SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2 of corn event MON89034 in a biological sample comprising corn DNA, said method comprising:

(a) contacting said sample with a probe that hybridizes under stringent hybridization conditions with said junction sequence;

(b) subjecting the sample and probe to stringent hybridization conditions; and

(c) detecting hybridization of the probe to the junction sequence;

wherein detecting hybridization of the probe to the biological sample is indicative of the presence of said junction sequence in said sample.

41. A DNA detection kit comprising a polynucleotide probe that hybridizes under stringent hybridization conditions with one or more DNA sequences that comprise (1) at least 20 contiguous nucleotides from SEQ ID NO: 3 and comprises SEQ ID NO:1 or complements thereof or (2) at least 20 contiguous nucleotides from SEQ ID NO:4 and comprises SEQ ID NO:2, or complements thereof.

42. A DNA detection kit comprising a pair of polynucleotide primers for use in detecting the presence of a junction sequence diagnostic corn event MON89034 in a biological sample, wherein the first primer of said pair of polynucleotide primers hybridizes specifically to the reverse complement sequence corresponding to that set forth in SEQ ID NO:3 from about nucleotide position 1 through about position 2050 and the second primer of said pair of polynucleotide primers hybridizes specifically to the sequence as set forth SEQ ID NO:5 from about nucleotide position 2060 through about nucleotide position 12,208, and are extended toward each other to form an amplicon which comprises SEQ ID NO:1, said amplicon being diagnostic for the presence of MON89034 event DNA in said sample.

43. The DNA detection kit of claim 42 wherein said primer pair is selected from the group consisting of a first primer comprising any contiguous nucleotide sequence at least from about 11 to about 2000 nucleotides in length as set forth in SEQ ID NO:3 and a second primer comprising the reverse complement of any contiguous nucleotide sequence at least from about 11 to about 914 nucleotides in length as set forth in SEQ ID NO:4.

44. A DNA detection kit comprising a pair of polynucleotide primers for use in detecting the presence of a junction sequence diagnostic corn event MON89034 in a biological sample, wherein the first primer of said pair of polynucleotide primers hybridizes specifically to the reverse complement sequence corresponding to that set forth in SEQ ID NO:5 from about nucleotide position 1 through about position 11,370 and the second primer of said pair of polynucleotide primers hybridizes specifically to the sequence as set forth SEQ ID NO:4 from about nucleotide position 1 through about nucleotide position 914, and are extended toward each other to form an amplicon which comprises SEQ ID NO:2, said amplicon being diagnostic for the presence of MON89034 event DNA in said sample.

45. An isolated DNA molecule which is or is complementary to a DNA molecule selected from the group consisting of SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2.

46. An isolated DNA molecule for use as a DNA probe, wherein the presence of said isolated DNA molecule in a biological sample is diagnostic for corn event MON89034 DNA in a biological sample, comprising at least 11 contiguous nucleotides of SEQ ID NO:1, or the complement thereof.

47. An isolated DNA molecule for use as a DNA probe, the presence of said isolated DNA molecule in a biological sample being diagnostic for the presence of corn event MON89034 in said biological sample, wherein said molecule comprises at least 11 contiguous nucleotides of SEQ ID NO:2, or the complement thereof.

48. A method of detecting the presence of a corn event MON89034 polynucleotide in a biological sample, the method comprising:

(a) contacting the sample with a DNA primer pair;

(b) performing a nucleic acid amplification reaction, thereby producing an amplicon; and

(c) detecting said amplicon;

wherein said amplicon comprises SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2 and the detection of said amplicon is diagnostic for the presence of corn event MON89034 in said sample.

49. A stably transformed maize plant cell, the DNA of which produces a DNA amplicon comprising SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2 when subjected to the method of Claim 48.

50. The method of claim 48, wherein said DNA primer pair comprises the nucleotide sequences as set forth in SEQ ID NO:6 and SEQ ID NO:7.

51. A method of detecting the presence of corn event MON89034 DNA in a biological sample comprising:

(a) contacting the sample with a probe that hybridizes under stringent hybridization conditions with MON89034 DNA and does not hybridize under said conditions with corn plant genomic DNA that is other than MON89034 DNA, wherein said probe is or is complementary to a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2;

(b) subjecting the sample and probe to stringent hybridization conditions; and

(c) detecting hybridization of the probe to MON89034 DNA;

wherein detecting hybridization is diagnostic for the presence of said corn event MON89034 in said biological sample.

52. A method of determining the zygosity of DNA of a corn plant comprising corn event MON89034 DNA in a biological sample comprising:

(a) contacting the sample with three different primers comprising SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, and SEQ ID NO:10, that (1) when used in a nucleic-acid amplification reaction comprising corn event MON89034 DNA, produces a first amplicon that is diagnostic for corn event MON89034, and (2) when used in a nucleic-acid amplification reaction comprising corn genomic DNA other than MON89034 DNA produces a second amplicon that is diagnostic for corn genomic DNA other than MON89034 DNA;

(b) performing a nucleic acid amplification reaction; and

(c) comparing the amplicons produced, wherein the presence of one or both amplicons is diagnostic of the zygosity of the sample.

53. A hybrid corn plant wherein at least one parent is corn event MON89034.

54. Pollen, ovule, seed, roots, or leaves produced from a corn plant generated or grown from the hybrid corn plant of claim 53, wherein said pollen, ovule, seed, roots, or leaves comprise DNA diagnostic for the transgenic corn event MON89034.

55. Progeny of the hybrid corn plant MON89034 of claim 53, wherein cells of said progeny comprise in their genome the sequences as set forth in SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2.

56. An isolated polynucleotide segment comprising at least from about 11 to about 20 consecutive nucleotides selected from the group consisting of SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2, wherein said segment is derived from a cell of the transgenic corn plant MON89034.

57. An isolated polynucleotide segment derived from transgenic corn plant genome MON89034 comprising a nucleotide sequence which is or is complementary to a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2.

58. A method of detecting the presence of a corn event MON89034 polynucleotide in a biological sample, the method comprising:

(a) contacting the sample with a probe under stringent hybridization conditions, wherein said probe comprises a contiguous nucleotide sequence that is or is complementary to a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2; and

(b) detecting hybridization of said probe to said sample;

wherein hybridization of said probe to said sample is diagnostic for the presence of said corn event MON89034 polynucleotide in said sample.

59. A composition comprising a polynucleotide comprising a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2, wherein said composition is a commodity product selected from the group consisting of corn meal, corn flour, corn oil, corn silk, corn starch, and processed foodstuffs.

60. A polynucleotide probe comprising from about 11 to about 20 consecutive nucleotides in length for use in detecting the presence of corn event MON89034 DNA in a biological sample, wherein said consecutive nucleotides are selected from the group consisting of SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2.

61. The polynucleotide probe as set forth in Claim 60 wherein said probe comprises a nucleotide selected from the group consisting of a deoxyribonucleic acid, a ribonucleic acid, and a nucleotide analogue.

62. The polynucleotide probe as set forth in Claim 61 wherein said probe is labeled with at least one fluorophore.

63. A commodity or foodstuff comprising corn event MON89034 nucleotide sequences, wherein said sequences are selected from the group consisting of SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2.

64. The commodity or foodstuff of claim 63 selected from the group consisting of corn oil, corn starch, corn meal, corn flour, a cosmetic, and a bulking agent.

65. Detecting the presence of a nucleotide sequence diagnostic for the presence of corn event MON89034 in a biological sample, wherein said biological sample is selected from the group consisting of corn oil, corn meal, corn flour, corn gluten, corn cakes, and corn starch.

66. Growing corn cells comprising DNA diagnostic for the inserted DNA segment inserted into the genome corresponding to the transgenic corn event MON89034, wherein said inserted DNA segment comprises the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO:5.

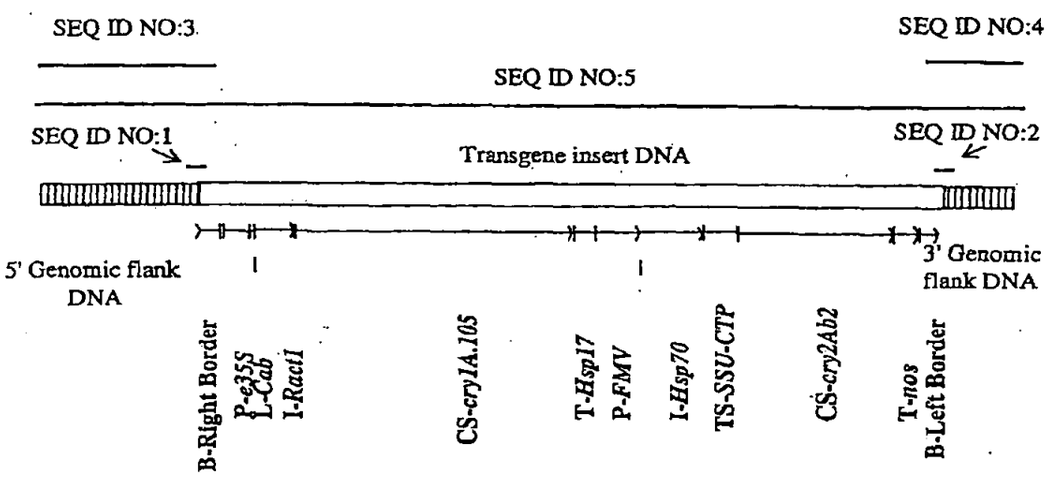

SEQ ID NO:3
SEQ ID NO:4
SEQ ID NO:5
SEQ ID NO:1
SEQ ID NO:2
Transgene insert DNA
5' Genomic flank DNA
3' Genomic flank DNA
B-Right Border
P-e35S
L-Cab
I-Ract1
CS-cry1A.105
T-Hsp17
P-FMV
I-Hsp70
TS-SSU-CTP
CS-cry2Ab2
T-nos
B-Left Border

Figure 1

SEQUENCE LISTING

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

<120> CORN PLANT AND SEED CORRESPONDING TO TRANSGENIC EVENT MON89034
AND METHODS FOR DETECTION THEREOF

<130> 38-21(53618)0001

<150> 60/808,834
<151> 2006-05-26

<160> 22

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 21
<212> DNA
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> 5' JUNCTION SEQUENCE; corresponding to SEQ ID NO:5 at 2051-2071

<400> 1
aatgagtatg atggatcagc a 21

<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> 3' JUNCTION SEQUENCE; corresponding to SEQ ID NO:5 at 11369-11388

<400> 2
actcattgca tccccggaaa 20

<210> 3
<211> 2071
<212> DNA
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> 5' FLANKING SEQUENCE PLUS JUNCTION;
corresponding to SEQ ID NO:5 at 1-2071

<400> 3
aatatttaaa aatggaagta atactatatt aaaatgattc atgtggaact cctgcgcttc 60

tttttgaagt ttcaaaaggg agctttcagg gtcgcttaga gtttgtttgg ttggaaatac 120

aagcgaaaag agagctaatg agggggacat ccatattttc tatggtgttt gaataagagt 180

cacgcgggaa taagatgaac accgaaacaa tttttttgta gctacgtggt tccaaaaaat 240

cgagtagacg gtgtcgcttc cacctcatac 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 ctggtgttgt tgacggactc gaacggggcc 540

gggcgtgtgg tgtggctagc tgtggtggtt tgctcgccag ccagccagcc acacatcagc 600

gagcatgcag agcttaagca tgtatgtacg gatcggcttg cttagcggtt aagggtgtgt 660

ttggtttggc ttttggcttt ggcttttgcc ccctaaaagc caaaagccaa ccaagggtgt 720

atttggtttg acttttggct tttggctttt gtcccctaaa agccaaaagc caaacaaagg 780

gttagatcta ggaagcagct ttttctaaaa gctggctttc tcacagtgca aatctgaaag 840

cacccctgaa cctgctttta gtggcttttc gaatggaact gtgaaaacat atatcgaaga 900

acttttaacg acttttagtg gtttccacca aacagtttag ctttttaacg gcttacagcc 960

tacaacagct ttttccacag ctcacagccc acagcaactt ttttcacagc cacagcccaa 1020

ccaaacagac cccaaagggc tgaatccagg aagcagcttt ttctaaaagc cgactttctc 1080

gtagtgtaaa actgaaaaca cccctggacc tgcttttagt ggcttttgga tggaactgtg 1140

aaaacatata tcgaagaact tttaacgact tttagtggtt tccaccaaac 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 ccgccgtcca ctcaccaatc aacacggaac gcccaaaaca cacacacacg 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 tcgccgcagc gcagctacct agcacgctca 1740

cgcatgctac actgcctaca cgcacacggc cggcccaaaa gcgttccctg 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 a 2071

<210> 4
<211> 914
<212> DNA
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> 3' FLANKING SEQUENCE PLUS JUNCTION;
corresponding to SEQ ID NO:5 at 11369-12282

<400> 4
actcattgca tccccggaaa ttatgttttt ttaaaaacca cggtattata gataccgtgt 60

tattttttga gtattggaaa tttcatttca acccaaagtt tcttcatggc acatctagct 120

tttgcctaat accatgtagg gctacatctt aaaaatctat actactatat taaagctgca 180

ggggtagcct gtctccacct ggttctgcct cgagccaatc taaaccgtcc atctatatcc 240

atcaaatcag caccgtccgg tccgtgcgca cctcctctcc cgctattcag ttgcatactt 300

gcagcaggtt ctccctcctc accatttcct ctgcctcctc tctcgctcac tggtcagatt 360

catcctgcct ctcccgcatg cgctccctcc ccatgccccg tctcgcacta tcgccacacc 420

tcaccgcggg gagacgaaga cggtggacgc atcctcacct cctccgctag ttgtcgctct 480

tccatcctct tcaacaactt ctacataggg agaggcggtt cggcgtcccg acgccgccgc 540

ttctcccctc cccatggagg acgagaacat cgacctcggc ggcgggggcg atgcctccgc 600

tctgcataga ggagggttgt agtggcaagc agcaatgcca acaccgaggc gggccaagac 660

taggcaacaa taggacggca cgcccggttg tcagcgaggt ggcggcatcg tgtgccgcta 720

ccgaacaaca tctccggcgc tggagtcggt gagttactgc gccacccgga cgccctcaat 780

gcactgatat ctacccggtc tccatcgccg cccttcctcc cttccctctc cctgtgcctc 840

cctctcttgc cctctccctt ccaactgctc ccgccccagc cctagcccaa ccacctcccg 900

cgcagggtca ccaa 914

<210> 5
<211> 12208
<212> DNA
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> INSERTED DNA SEQUENCE

<400> 5
aatatttaaa aatggaagta atactatatt aaaatgattc atgtggaact cctgcgcttc 60

tttttgaagt ttcaaaaggg agctttcagg gtcgcttaga gtttgtttgg ttggaaatac 120

aagcgaaaag agagctaatg agggggacat ccatattttc tatggtgttt gaataagagt 180

cacgcgggaa taagatgaac accgaaacaa tttttttgta gctacgtggt tccaaaaaat 240

cgagtagacg gtgtcgcttc cacctcatac 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 ctggtgttgt tgacggactc gaacggggcc 540

gggcgtgtgg tgtggctagc tgtggtggtt tgctcgccag ccagccagcc acacatcagc 600

gagcatgcag agcttaagca tgtatgtacg gatcggcttg cttagcggtt aagggtgtgt 660

ttggtttggc ttttggcttt ggcttttgcc ccctaaaagc caaaagccaa ccaagggtgt 720

atttggtttg acttttggct tttggctttt gtcccctaaa agccaaaagc caaacaaagg 780

gttagatcta ggaagcagct ttttctaaaa gctggctttc tcacagtgca aatctgaaag 840

cacccctgaa cctgctttta gtggcttttc gaatggaact gtgaaaacat atatcgaaga 900

acttttaacg acttttagtg gtttccacca aacagtttag ctttttaacg gcttacagcc 960

tacaacagct ttttccacag ctcacagccc acagcaactt ttttcacagc cacagcccaa 1020

ccaaacagac cccaaagggc tgaatccagg aagcagcttt ttctaaaagc cgactttctc 1080

gtagtgtaaa actgaaaaca cccctggacc tgcttttagt ggcttttgga tggaactgtg 1140

aaaacatata tcgaagaact tttaacgact tttagtggtt tccaccaaac 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 ccgccgtcca ctcaccaatc aacacggaac gcccaaaaca cacacacacg 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 tcgccgcagc gcagctacct agcacgctca 1740
cgcatgctac actgcctaca cgcacacggc cggcccaaaa gcgttccctg 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 ttaccaattt tttttcaatt caaaaatgta gatgtccgca gcgttattat 2160
aaaatgaaag tacattttga taaaacgaca aattacgatc cgtcgtattt ataggcgaaa 2220
gcaataaaca aattattcta attcggaaat ctttatttcg acgtgtctac attcacgtcc 2280
aaatgggggc ttagatgaga aacttcacga tttggcgcgc caaagcttgg tcgagtggaa 2340
gctagctttc cgatcctacc tgtcacttca tcaaaaggac agtagaaaag gaaggtggct 2400
cctacaaatg ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc tctgccgaca 2460
gtggtcccaa agatggaccc ccacccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa gacgttccaa 2520
ccacgtcttc aaagcaagtg gattgatgtg atatctccac tgacgtaagg gatgacgcac 2580
aatcccacta tccttcgcaa gacccttcct ctatataagg aagttcattt catttggaga 2640
ggacacgctg acaagctgac tctagcagat cctctagaac catcttccac acactcaagc 2700
cacactattg gagaacacac agggacaaca caccataaga tccaagggag gcctccgccg 2760
ccgccggtaa ccaccccgcc cctctcctct ttctttctcc gtttttttt ccgtctcggt 2820
ctcgatcttt ggccttggta gtttgggtgg gcgagaggcg gcttcgtgcg cgcccagatc 2880
ggtgcgcggg aggggcggga tctcgcggct ggggctctcg ccggcgtgga tccggcccgg 2940
atctcgcggg gaatggggct ctcggatgta gatctgcgat ccgccgttgt tgggggagat 3000
gatgggggt ttaaaatttc cgccgtgcta aacaagatca ggaagagggg aaaagggcac 3060
tatggtttat atttttatat atttctgctg cttcgtcagg cttagatgtg ctagatcttt 3120
ctttcttctt tttgtgggta gaatttgaat ccctcagcat tgttcatcgg tagtttttct 3180
tttcatgatt tgtgacaaat gcagcctcgt gcggagcttt tttgtaggta gaagtgatca 3240
accatggaca acaacccaaa catcaacgag tgcatcccgt acaactgcct cagcaaccct 3300
gaggtcgagg tgctcggcgg tgagcgcatc gagaccggtt acacccccat cgacatctcc 3360
ctctccctca cgcagttcct gctcagcgag ttcgtgccag gcgctggctt cgtcctgggc 3420
ctcgtggaca tcatctgggg catctttggc ccctcccagt gggacgcctt cctggtgcaa 3480

atcgagcagc tcatcaacca gaggatcgag gagttcgcca ggaaccaggc catcagccgc 3540
ctggagggcc tcagcaacct ctaccaaatc tacgctgaga gcttccgcga gtgggaggcc 3600
gaccccacta acccagctct ccgcgaggag atgcgcatcc agttcaacga catgaacagc 3660
gccctgacca ccgccatccc actcttcgcc gtccagaact accaagtccc gctcctgtcc 3720
gtgtacgtcc aggccgccaa cctgcacctc agcgtgctga gggacgtcag cgtgtttggc 3780
cagaggtggg gcttcgacgc cgccaccatc aacagccgct acaacgacct caccaggctg 3840
atcggcaact acaccgacca cgctgtccgc tggtacaaca ctggccgtcc tggacattgt 3900
gtccctcttc ccgaactacg actcccgcac ctacccgatc cgcaccgtgt cccaactgac 3960
ccgcgaaatc tacaccaacc ccgtcctgga gaacttcgac ggtagcttca ggggcagcgc 4020
ccagggcatc gagggctcca tcaggagccc acacctgatg gacatcctca acagcatcac 4080
tatctacacc gatgcccacc gcggcgagta ctactggtcc ggccaccaga tcatggcctc 4140
cccggtcggc ttcagcggcc ccgagtttac ctttcctctc tacggcacga tgggcaacgc 4200
cgctccacaa caacgcatcg tcgctcagct gggccagggc gtctaccgca ccctgagctc 4260
caccctgtac cgcaggccct tcaacatcgg tatcaacaac cagcagctgt ccgtcctgga 4320
tggcactgag ttcgcctacg gcacctcctc caacctgccc tccgctgtct accgcaagag 4380
cggcacggtg gattccctgg acgagatccc accacagaac aacaatgtgc cccccaggca 4440
gggtttttcc cacaggctca gccacgtgtc catgttccgc tccggcttca gcaactcgtc 4500
cgtgagcatc atcagagctc ctatgttctc ttggatacac cgtagtgctg agttcaacaa 4560
catcattgca tccgacagca ttactcaaat acccttggtg aaagcacata cacttcagtc 4620
aggtactact gttgtcagag gtccagggtt tacaggagga gacattcttc gtcgcacaag 4680
tggaggaccc tttgcttaca ctattgttaa catcaatggc caattgcccc aaaggtatcg 4740
tgcaagaatc cgctatgcct ctactacaaa tctcaggatc tacgtgactg ttgcaggtga 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
gaacgccctc tttacctcca ccaatcagct tggcttgaaa actaacgtta ctgactatca 5100
cattgaccaa gtgtccaact tggtcaccta ccttagcgat gagttctgcc tcgacgagaa 5160
gcgtgaactc tccgagaaag ttaaacacgc caagcgtctc agcgacgaga ggaatctctt 5220
gcaagactcc aacttcaaag acatcaacag gcagccagaa cgtggttggg gtggaagcac 5280
cgggatcacc atccaaggag gcgacgatgt gttcaaggag aactacgtca ccctctccgg 5340
aactttcgac gagtgctacc ctacctactt gtaccagaag atcgatgagt ccaaactcaa 5400
agccttcacc aggtatcaac ttagaggcta catcgaagac agccaagacc ttgaaatcta 5460
ctcgatcagg tacaatgcca agcacgagac cgtgaatgtc ccaggtactg gttccctctg 5520
gccactttct gcccaatctc ccattgggaa gtgtggagag cctaacagat gcgctccaca 5580
ccttgagtgg aatcctgact tggactgctc ctgcagggat ggcgagaagt gtgcccacca 5640
ttctcatcac ttctccttgg acatcgatgt gggatgtact gacctgaatg aggacctcgg 5700

agtctgggtc atcttcaaga tcaagaccca agacggacac gcaagacttg gcaaccttga 5760
gtttctcgaa gagaaaccat tggtcggtga agctctcgct cgtgtgaaga gagcagagaa 5820
gaagtggagg gacaaacgtg agaaactcga atgggaaact aacatcgttt acaaggaggc 5880
caaagagtcc gtggatgctt tgttcgtgaa ctcccaatat gatcagttgc aagccgacac 5940
caacatcgcc atgatccacg ccgcagacaa acgtgtgcac agcattcgtg aggcttactt 6000
gcctgagttg tccgtgatcc ctggtgtgaa cgctgccatc ttcgaggaac ttgagggacg 6060
tatctttacc gcattctcct tgtacgatgc cagaaacgtc atcaagaacg gtgacttcaa 6120
caatggcctc agctgctgga atgtgaaagg tcatgtggac gtggaggaac agaacaatca 6180
gcgttccgtc ctggttgtgc ctgagtggga agctgaagtg tcccaagagg ttagagtctg 6240
tccaggtaga ggctacattc tccgtgtgac cgcttacaag gagggatacg gtgagggttg 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 ccgagggaac 6660
cttcatcgtg gacagcgtgg agcttctctt gatggaggaa taatgagatc tatcgattct 6720
agaaggcctg aattctgcat gcgtttggac gtatgctcat tcaggttgga gccaatttgg 6780
ttgatgtgtg tgcgagttct tgcgagtctg atgagacatc tctgtattgt gtttctttcc 6840
ccagtgtttt ctgtacttgt gtaatcggct aatcgccaac agattcggcg atgaataaat 6900
gagaaataaa ttgttctgat tttgagtgca aaaaaaaagg aattagatct gtgtgtgttt 6960
tttggatccc cggggcggcc gcgttaacaa gcttgagctc aggatttagc agcattccag 7020
attgggttca atcaacaagg tacgagccat atcactttat tcaaattggt 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
cctaccaaaa 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
gagagtggtt tagctggatc tagaattaca ctctgaaatc gtgttctgcc tgtgctgatt 7740
acttgccgtc ctttgtagca gcaaaatata gggacatggt agtacgaaac gaagatagaa 7800
cctacacagc aatacgagaa atgtgtaatt tggtgcttag cggtatttat ttaagcacat 7860
gttggtgtta tagggcactt ggattcagaa gtttgctgtt aatttaggca caggcttcat 7920

actacatggg tcaatagtat agggattcat attataggcg atactataat aatttgttcg 7980
tctgcagagc ttattatttg ccaaaattag atattcctat tctgtttttg tttgtgtgct 8040
gttaaattgt taacgcctga aggaataaat ataaatgacg aaattttgat gtttatctct 8100
gctcctttat tgtgaccata agtcaagatc agatgcactt gttttaaata ttgttgtctg 8160
aagaaataag tactgacagt attttgatgc attgatctgc ttgtttgttg taacaaaatt 8220
taaaaataaa gagtttcctt tttgttgctc tccttacctc ctgatggtat ctagtatcta 8280
ccaactgaca ctatattgct tctctttaca tacgtatctt gctcgatgcc ttctccctag 8340
tgttgaccag tgttactcac atagtctttg ctcatttcat tgtaatgcag ataccaagcg 8400
gcctctagag gatcagcatg gcgcccaccg tgatgatggc ctcgtcggcc accgccgtcg 8460
ctccgttcca ggggctcaag tccaccgcca gcctccccgt cgcccgccgc tcctccagaa 8520
gcctcggcaa cgtcagcaac ggcggaagga tccggtgcat gcaggtaaca aatgcatcct 8580
agctagtagt tctttgcatt gcagcagctg cagctagcga gttagtaata ggaagggaac 8640
tgatgatcca tgcatggact gatgtgtgtt gcccatccca tcccatttcc caaccccaaa 8700
cgaaccaaaa cacacgtact acgtgcaggt gtggccggcc tacggcaaca agaagttcga 8760
gacgctgtcg tacctgccgc cgctgtcgac cggcgggcgc 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 aaggtcggct ctctcgtcgg gaagcgcatc ctctcggaac tccgcaacct 9060
gatctttcca tctggctcca ccaacctcat gcaagacatc ctcagggaga ccgagaagtt 9120
tctcaaccag cgcctcaaca ctgataccct tgctcgcgtc aacgctgagc tgacgggtct 9180
gcaagcaaac gtggaggagt tcaaccgcca agtggacaac ttcctcaacc ccaaccgcaa 9240
tgcggtgcct ctgtccatca cttcttccgt gaacaccatg caacaactgt tcctcaaccg 9300
cttgcctcag ttccagatgc aaggctacca gctgctcctg ctgccactct ttgctcaggc 9360
tgccaacctg cacctctcct tcattcgtga cgtgatcctc aacgctgacg agtggggcat 9420
ctctgcagcc acgctgagga cctaccgcga ctacctgaag aactacacca gggactactc 9480
caactattgc atcaacacct accagtcggc cttcaagggc ctcaatacga ggcttcacga 9540
catgctggag ttcaggacct acatgttcct gaacgtgttc gagtacgtca gcatctggtc 9600
gctcttcaag taccagagcc tgctggtgtc cagcggcgcc aacctctacg ccagcggctc 9660
tggtccccaa caaactcaga gcttcaccag ccaggactgg ccattcctgt attcgttgtt 9720
ccaagtcaac tccaactacg tcctcaacgg cttctctggt gctcgcctct ccaacacctt 9780
ccccaacatt gttggcctcc ccggctccac cacaactcat gctctgcttg ctgccagagt 9840
gaactactcc ggcggcatct cgagcggcga cattggtgca tcgccgttca accagaactt 9900
caactgctcc accttcctgc cgccgctgct caccccgttc gtgaggtcct ggctcgacag 9960
cggctccgac cgcgagggcg tggccaccgt caccaactgg caaaccgagt ccttcgagac 10020
cacccttggc ctccggagcg gcgccttcac ggcgcgtgga aattctaact acttccccga 10080
ctacttcatc aggaacatct ctggtgttcc tctcgtcgtc cgcaacgagg acctccgccg 10140

tccactgcac tacaacgaga tcaggaacat cgcctctccg tccgggacgc ccggaggtgc 10200
aagggcgtac atggtgagcg tccataacag gaagaacaac atccacgctg tgcatgagaa 10260
cggctccatg atccacctgg cgcccaatga ttacaccggc ttcaccatct ctccaatcca 10320
cgccacccaa gtgaacaacc agacacgcac cttcatctcc gagaagttcg gcaaccaggg 10380
cgactccctg aggttcgagc agaacaacac caccgccagg tacaccctgc gcggcaacgg 10440
caacagctac aacctgtacc tgcgcgtcag ctccattggc aactccacca tcagggtcac 10500
catcaacggg agggtgtaca cagccaccaa tgtgaacacg acgaccaaca atgatggcgt 10560
caacgacaac ggcgcccgct tcagcgacat caacattggc aacgtggtgg ccagcagcaa 10620
ctccgacgtc ccgctggaca tcaacgtgac cctgaactct ggcacccagt tcgacctcat 10680
gaacatcatg ctggtgccaa ctaacatctc gccgctgtac tgataggagc tctgatcccc 10740
atgggaattc ccgatcgttc aaacatttgg caataaagtt tcttaagatt gaatcctgtt 10800
gccggtcttg cgatgattat catataattt ctgttgaatt acgttaagca tgtaataatt 10860
aacatgtaat gcatgacgtt atttatgaga tgggttttta tgattagagt cccgcaatta 10920
tacatttaat acgcgataga aaacaaaata tagcgcgcaa actaggataa attatcgcgc 10980
gcggtgtcat ctatgttact agatcgggga tatccccggg gcggccgcgg ggaattcggt 11040
accaagcttt ggcgcgccaa atcgtgaagt ttctcatcta agcccccatt tggacgtgaa 11100
tgtagacacg tcgaaataaa gatttccgaa ttagaataat ttgtttattg ctttcgccta 11160
taaatacgac ggatcgtaat ttgtcgtttt atcaaaatgt actttcattt tataataacg 11220
ctgcggacat ctacattttt gaattgaaaa aaaattggta attactcttt ctttttctcc 11280
atattgacca tcatactcat tgcatccccg gaaattatgt ttttttaaaa accacggtat 11340
tatagatacc gtgttatttt ttgagtattg gaaatttcat ttcaacccaa agtttcttca 11400
tggcacatct agcttttgcc taataccatg tagggctaca tcttaaaaat ctatactact 11460
atattaaagc tgcaggggta gcctgtctcc acctggttct gcctcgagcc aatctaaacc 11520
gtccatctat atccatcaaa tcagcaccgt ccggtccgtg cgcacctcct ctcccgctat 11580
tcagttgcat acttgcagca ggttctccct cctcaccatt tcctctgcct cctctctcgc 11640
tcactggtca gattcatcct gcctctcccg catgcgctcc ctccccatgc cccgtctcgc 11700
actatcgcca cacctcaccg cggggagacg aagacggtgg acgcatcctc acctcctccg 11760
ctagttgtcg ctcttccatc ctcttcaaca acttctacat agggagaggc ggttcggcgt 11820
cccgacgccg ccgcttctcc cctccccatg gaggacgaga acatcgacct cggcggcggg 11880
ggcgatgcct ccgctctgca tagaggaggg ttgtagtggc aagcagcaat gccaacaccg 11940
aggcgggcca agactaggca acaataggac ggcacgcccg gttgtcagcg aggtggcggc 12000
atcgtgtgcc gctaccgaac aacatctccg gcgctggagt cggtgagtta ctgcgccacc 12060
cggacgccct caatgcactg atatctaccc ggtctccatc gccgcccttc ctcccttccc 12120
tctccctgtg cctccctctc ttgccctctc ccttccaact gctcccgccc cagccctagc 12180
ccaaccacct cccgcgcagg gtcaccaa 12208

<210> 6
<211> 22

<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> SYNTHETIC SEQUENCE; corresponding to SEQ ID NO:5 at 2034-2055

<400> 6

gccaataaaa ggatggtaat ga 22

<210> 7
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> SYNTHETIC SEQUENCE; corresponding to SEQ ID NO:5 at 11345-11367

<400> 7

ctttttctcc atattgacca tca 23

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 8

ggtatccctc cagaccagca 20

<210> 9
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 9

gtggactcct tctggatgtt gtaa 24

<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 10

gtcagggtgc tgctgctgct a 21

<210> 11
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 11

ggtttaagaa ccattttgct ccc 23

<210> 12
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> SYNTHETIC SEQUENCE; corresponding to SEQ ID NO:5 at 2003-2026

<400> 12

tacgtcaggg tgctgctgct acta 24

<210> 13
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 13

atratttycg gggatgcaac caac 24

<210> 14
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> SYNTHETIC SEQUENCE; corresponding to SEQ ID NO:5 at 2061-2076

<400> 14

atggatcagc aatgag 16

<210> 15
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 15

ctgtcaagcc aataaaaggg ttgttt 26

<210> 16
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 16

ctgtcaagcc aataaaaggg ttgttt 26

<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 17

caactcgtcc gtgagcatca 20

<210> 18
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> SYNTHETIC SEQUENCE; reverse complement of sequence corresponding to SEQ ID NO:5 at 4605-4628

<400> 18

aactcagcac tacggtgtat ccaa 24

<210> 19
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 19

gcctgccgca gaccaa 16

<210> 20
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 20

caatgcagag ctcagcttca tc 22

<210> 21
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> SYNTHETIC SEQUENCE;corresponding to SEQ ID NO:5 at 4587-4603

<400> 21

cagagctcct atgttct 17

<210> 22
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 22

tccagtacgt gcagtccctc ctccct 26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2007/069662

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/29(2006.01)i, C12N 15/09(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 8 C12N 15/29, A01B 79/00, A01H 5/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKIPASS, NCBI PubMed database, Delphion Research Intellectual Property Network database

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Marta Hernandez, et al. 'A specific real-time quantitative PCR detection system for event MON810 in maize yieldgard based on the 3'-transgenic integration sequence.', Transgenic Res., Vol.12(2) : 179-189 (Apr. 2003) See the whole document.	1 - 64
A	Herman RA, et al. 'Compositional equivalency of Cry1F corn event TC6275 and conventional corn(Zea may L.).' J. Agric. Food Chem., Vol.52(9) : 2726-2734 (05 May 2004) See the wole document.	1 - 64
A	US 6,868,634 B2 (Parker) 22 March 2005. See the whole document.	1 - 64
A	US 2004/0172671 A1 (Ali et al.) 02 Sep. 2004 See the whole document.	1 - 64

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
08 NOVEMBER 2007 (08.11.2007)	08 NOVEMBER 2007 (08.11.2007)
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office 920 Dunsan-dong, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer JEONG Eui Jun Telephone No. 82-42-481-5549

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2007)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2007/069662

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 65 and 66
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Claims 65 and 66 are not clear and concise as required by PCT Article 6. The reason is as follows:
1) Detecting in claim 65 is not clear and concise.
2) Growing corn cells in claim 66 is not clear and concise.

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US2007/069662

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US06868634 B2	22.03.2005	US20030084606A1	08.05.2003
US20040172671A1	02.09.2004	AU2002322499AA	03.12.2002
		WO2002094008A2	28.11.2002
		WO2002094008A3	11.03.2004

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 de los EEUU con Nº 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 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 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 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 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 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 Nº 6489542 y la Patente de los EEUU Nº 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 permuteínas 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 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 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, 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 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 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 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 INVENCIÓN

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 Nº 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 Nº 1, SEQ ID Nº 2, SEQ ID Nº 3, SEQ ID Nº 4 y SEQ ID Nº 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 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 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 MON89034 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nº 1 (localizada entre las posiciones 2051 y 2070 de SEQ ID Nº 5) y SEQ ID Nº 2 (localizada entre las posiciones 11367 y 11388), 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 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 Nº 3 y SEQ ID Nº 4 (Figura 2) del evento de maíz 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 cualquier porción de la región transgénica de la molécula de ADN de SEQ ID Nº 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 Nº 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 Nº 1. Todos los amplicones producidos con cebadores de ADN homólogos o complementarios con cualquier porción SEQ ID Nº 3, y todos los amplicones que comprenden SEQ ID Nº 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 Nº 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 Nº 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 Nº 2. Todos los amplicones producidos con los cebadores de ADN homólogos o complementarios con cualquier porción de SEQ ID Nº 4, y todos los amplicones que comprenden SEQ ID Nº 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 Nº 1 o SEQ ID Nº 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 Nº 5, y complementos de ésta. 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, comprende una molécula de ADN que tiene incorporados los nucleótidos 2061 a 11377 de SEQ ID Nº 5, y complementos de ésta.

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 Nº 6 y SEQ ID Nº 7 se usan en el método de amplificación de ADN.

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 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 Nº 1 y SEQ ID Nº 2.

Otro aspecto de la invención es un método para determinar la cigosidad de 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 Nº 6), SQ2843 (SEQ ID Nº 7), SQ6523 (SEQ ID Nº 10), SQ6524 (SEQ ID Nº 11), PB880 (SEQ ID Nº 14) y PB2931 (SEQ ID Nº 15), que cuando se usan en una reacción de amplificación de ácidos nucleicos con 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 Nº 1 o SEQ ID Nº 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 Nº 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 Nº 5 representan las posiciones aproximadas dentro de SEQ ID Nº 5 donde puede hallarse cada una de las secuencias indicadas específicamente (es decir, SEQ ID Nº 1, SEQ ID Nº 2, SEQ ID Nº 3 y SEQ ID Nº 4). SEQ ID Nº 1 y SEQ ID Nº 2, y cualquier secuencia derivada del evento de maíz MON89034 que contiene SEQ ID Nº 1 y/o SEQ ID Nº 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.

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 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 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 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 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 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 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 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 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. 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 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 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 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 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 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 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 Nº 1 y 2, o 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 Nº 1 y SEQ ID Nº 2, o complementos o fragmentos 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 Nº 1 y SEQ ID Nº 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 Nº 1 y SEQ ID Nº 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 Nº 1 y SEQ ID Nº 2, o complementos o fragmentos de cualquiera de ellas. SEQ ID Nº 1 y SEQ ID Nº 2 pueden usarse como marcadores en métodos de cruzamiento de plantas para identificar la progenie de cruzamientos genéticos, similares a los métodos descriptos 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 hibiridiza 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 Nº 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 incuba 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 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 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 incuba en presencia de una ADN polimerasa y ddNTP 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.

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 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 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 Nº 2006068398, Patente de los EEUU Nº 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 Nº 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 especifica 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 amplicon predefinido en una reacción de amplificación térmica es diagnóstico de la presencia de ADN correspondiente a ADN con el genoma PTO-7455 en la muestra. Si se selecciona la hibridización, la detección de hibridización de la sonda en la muestra biológica es diagnóstico de la presencia de ADN del evento transgénico MON89034 en la muestra. Típicamennte, la muestra es maíz, o 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 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 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 Nº 1, SEQ ID Nº 2, SEQ ID Nº 3, SEQ ID Nº 4 y SEQ ID Nº 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 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 Nº 1 y SEQ ID Nº 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 Nº 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 descriptas 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 Nº 1 o SEQ ID Nº 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 fentomoles o aproximadamente 0,5 picogramos de ADN derivado del evento transgénico de maíz MON89034. Estas fuentes de muestras biológicas de ADN que corresponde 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 SEQ ID Nº 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 Nº 1, y 1-11 ó 9-20, como se indica en SEQ ID Nº 2; (2) cualquier secuencia de nucleótidos contiguos como se indica en SEQ ID Nº 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 Nº 1; cualquier secuencia de nucleótidos contiguos como se indica en SEQ ID Nº 4, de entre aproximadamente 11 y 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 Nº 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 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 sondas de polinucleótidos que comprenden al menos aproximadamente 11 nucleótidos contigua, como se indica en SEQ ID Nº 1 o SEQ ID Nº 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.

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 presentan homología sustancial o complementariedad sustancial con un segmento de nucleótidos que comprende una secuencia indicada en SEQ ID Nº 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 Nº 1 y SEQ ID Nº 2. Las secuencias indicadas en SEQ ID Nº 1 y SEQ ID Nº 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 circundante. Por ejemplo, en su mitad 5', SEQ ID Nº 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 Nº 1. En su mitad 5', SEQ ID Nº 2 representa el extremo 3' del ADN insertado, y en su mitad 3', el extremo 5' de la secuencia 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 Nº 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 al secuencia complementaria con la secuencia indicada en SEQ ID Nº 3 (distinta

de los 21 nucleótidos del extremo 3' de SEQ ID Nº 3,) y una segunda molécula cebadora, que hibridice con la secuencia indicada en SEQ ID Nº 4 (distinta de los 20 nucleótidos del extremo 5' de SEQ ID Nº 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 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 Nº 3 y SEQ ID Nº 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 unión SEQ ID Nº 1 o SEQ ID Nº 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 Nº 1 o SEQ ID Nº 2, o complementos de ésta, y también contiene un par de cebadores para usar en una reacción de amplificación de 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 Nº 3, y un segundo cebador, que comprende al menos entre aproximadamente 15 y aproximadamente 50 nucleótidos contiguos complementarios con la porción de ADN heterólogo insertado de SEQ ID Nº 5. El primer cebador del par de polinucleótidos cebadores hibridiza específicamente con la secuencia complementaria inversa correspondiente a la indicada en SEQ ID Nº 3, aproximadamente entre las

posiciones de nucleótidos 1 y 2050, y el segundo cebador de dicho par de polinucleótidos cebadores hibridiza con la secuencia indicada en SEQ ID Nº 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 Nº 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 comprende al menos entre aproximadamente 15 y aproximadamente 50 nucleótidos contiguos complementarios con la porción del genoma de maíz de SEQ ID Nº 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 Nº 5. El primer cebador del par de polinucleótidos cebadores hibridiza específicamente con la secuencia complementaria inversa que corresponde a la indicada en SEQ ID Nº 5, aproximadamente entre las posiciones de nucleótidos 1 y 11370, y el segundo cebador del par de polinucleótidos cebadores hibridiza específicamente con la secuencia indicada en SEQ ID Nº 4, aproximadamente entre las posiciones de nucleótidos 1 y 914, donde cada uno de dichos cebadores se extiende hacia el otro para formar un amplicón que comprende a la SEQ ID Nº 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 Nº 1 o SEQ ID Nº 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 Nº 1 y SEQ ID Nº 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 Nº 1 o SEQ ID Nº 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 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 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 Nº 3, y un segundo cebador puede consistir en al menos aproximadamente 15 nucleótidos contiguos complementarios con la porción de ADN heterólogo insertado indicada en SEQ ID Nº 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 Nº 1. Como alternativa, un primer cebador puede consistir en al menos aproximadamente 15 nucleótidos contiguos de la porción del genoma de maíz de SEQ ID Nº 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 Nº 5. En una reacción de amplificación térmica, estos dos cebadores producirían un amplicón con un ADN molde obtenido de ADN del evento de maíz MON89034 que contuviera una secuencia de polinucleótidos como la indicada en SEQ ID Nº 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 Nº 1 o SEQ ID Nº 2, consiste en poner en contacto la muestra con una 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 Nº 1 o SEQ ID Nº 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 Nº 6 y SEQ ID Nº 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 hibridizacion 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 Nº 1 y SEQ ID Nº 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 Nº 1 y SEQ ID Nº 2, y la secuencia de nucleótidos contiguos indicada en SEQ ID Nº 5, entre SEQ ID Nº 1 y SEQ ID Nº 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 Nº 1 y SEQ ID Nº 2, junto con la secuencia de nucleótidos contiguos indicada en SEQ ID Nº 5, entre SEQ ID Nº 1 y SEQ ID Nº 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. 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-9708. 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 Nº 1, SEQ ID Nº 2, SEQ ID Nº 3, SEQ ID Nº 4 y SEQ ID Nº 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 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 Nº 1, SEQ ID Nº 2, SEQ ID Nº 3, SEQ ID Nº 4 y SEQ ID Nº 5.

El evento transgénico de maíz resistente a los insectos MON89034 puede 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 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 infestaciones de coleópteros y lepidópteros, y resistentes a herbicidas selectivos. Estas variedades pueden presentar características de rendimiento y tolerancia a la 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 Nº 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 Nº 6, SEQ ID Nº 7 y SEQ ID Nº 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 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 inserado en el 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 Nº 5;

(b) las secuencias de nucleótidos indicadas en SEQ ID Nº 1 y SEQ ID Nº 2;

(c) la secuencia de nucleótidos indicada en SEQ ID Nº 3; y

(d) la secuencia de nucleótidos indicada en SEQ ID Nº 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 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 descriptas, y aún así puede obtenerse un 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.

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 descripto en la Patente de los EEUU Nº 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 Nº 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 Nº 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 Nº 5); una secuencia de ocurrencia no natural que codifica el gen quimérico Cry1A.105 (localizada entre las posiciones 3244 y 6777 de SEQ ID Nº 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 Nº 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 Nº 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 Nº 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 Nº 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 Nº 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 Nº 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 ADN-T 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 Nº 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. Nº 3700, EM Science, Gibbstown, Nueva Jersey, EEUU), y se precipitó el ADN de la solución con isopropanol (Sigma Cat. Nº 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 Nº 6), SQ2843 (SEQ ID Nº 7), el cebador marcado 6FAM™ PB880 (SEQ ID Nº 14) y el cebador marcado VIC™ PB2931 (SEQ ID

Nº 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 Nº 14), SQ2842 (SEQ ID Nº 6) y SQ2843 (SEQ ID Nº 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 Nº 21), SQ1564 (SEQ ID Nº 17) y SQ1565 (SEQ ID Nº 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 Robocicler, MJ Engine, Perkin-Elmer 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 específicamente con SEQ ID Nº 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 Nº 1, o según sea el caso, el complemento inverso de la secuencia de SEQ ID Nº 1, servirá para diagnosticar la presencia de ADN del evento de maíz MON89034 en dicha muestra. Siempre que sea posible detectar la unión, cualquier sonda que se una específicamente con SEQ ID Nº 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 Nº 2, o según sea el caso, el complemento inverso de la secuencia de SEQ ID Nº 2, servirá para diagnosticar la presencia de ADN del evento de maíz 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 Nº 1 o SEQ ID Nº 2, o según sea el caso, comprende ambas secuencias, está dentro del alcance de la presente invención. Para los propósitos de la invención descripta en la presente documentación, se considera que cualquiera de estos amplicones que comprenden SEQ ID Nº 1, SEQ ID Nº 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.

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 Nº 6) y SQ2843 (SEQ ID Nº 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 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 Nº	**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

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 Tabla 3 y la Tabla 4. Los ejemplos de cebadores de ADN

usados en el ensayo de cigosidad son los cebadores SQ2842 (SEQ ID Nº 6), SQ2843 (SEQ ID Nº 7), SQ6523 (SEQ ID Nº 10), SQ6524 (SEQ ID Nº 11), el cebador marcado 6FAM™ PB880 (SEQ ID Nº 14) y el cebador marcado VIC™ PB2931 (SEQ ID Nº 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 (SEQ ID Nº 6), SQ2843 (SEQ ID Nº 7), SQ6523 (SEQ ID Nº 10) y SQ6524 (SEQ ID Nº 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 descripto 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 Robocicler, 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 Nº 6, y SEQ ID Nº 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 Nº 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 Nº 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

[a]usando 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 descripto 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:

1. Una planta de maíz transgénica CARACTERIZADA PORQUE ha sido designada como el evento transgénico de maíz MON89034, semillas representativas para obtener dicha planta, para producir progenie, para obtener plantas que se desarrollen, o para producir una semilla de cultivo que comprenda dicho evento transgénico de maíz, que ha sido depositada en la Colección Americana de Tipos de Cultivo (ATCC) con el número de acceso PTA-7455.

2. La planta transgénica de maíz de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADA PORQUE comprende ADN diagnóstico de dicho evento, donde dicho ADN comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nº 1, SEQ ID Nº 2, SEQ ID Nº 3, SEQ ID Nº 4 y SEQ ID Nº 5.

3. La planta transgénica de maíz, progenie de dicha planta, células de una planta desarrollada a partir de dicha planta, o semillas producidas por dicha planta, de acuerdo con la reivindicación 2, CARACTERIZADAS PORQUE dicho ADN diagnóstico de dicho evento se selecciona adicionalmente del grupo que consiste en SEQ ID Nº 1 y SEQ ID Nº 2.

4. La planta transgénica de maíz de acuerdo con la reivindicación 3, CARACTERIZADA PORQUE ha sido procesada para obtener un producto basico o un alimento seleccionado del grupo que consiste en masa de maíz, harina de maíz, aceite de maíz, proteína de maíz, etanol y DDGS.

5. La planta transgénica de maíz de la reivindicación 1, CARACTERIZADA PORQUE presenta resistencia a la infestación de insectos lepidópteros.

6. La planta de maíz transgénica de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADA PORQUE comprende en el genoma de las células de dicha planta una molécula de ADN seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nº 1 y SEQ ID Nº 2.

7. Un amplicón diagnóstico de la presencia de ADN transgénico del evento de maíz MON89034 en una muestra biológica, CARACTERIZADO PORQUE dicho amplicón comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias indicadas en SEQ ID Nº 1 y SEQ ID Nº 2.

8. El amplicón de la reivindicación 7, CARACTERIZADO PORQUE dicha muestra biológica comprende masa de maíz, aceite de maíz, tortas de maíz, semillas de maíz, germen de maíz, almidón de maíz y harina de maíz.

9. Una molécula de polinucleótido aislada CARACTERIZADA PORQUE comprende nucleótidos contiguos seleccionados del grupo de nucleótidos contiguos indicados en SEQ ID Nº 5, donde dichos nucleótidos contiguos comprenden entre aproximadamente 11 y aproximadamente 12000 nucleótidos, y además comprenden los nucleótidos contiguos seleccionados del grupo que consiste en los nucleótidos 1-11 ó 9-20 indicados en SEQ ID Nº 1, y los nucleótidos 1-11 ó 9-20 indicados en SEQ ID Nº 2.

10. Una molécula de polinucleótido aislada CARACTERIZADA PORQUE comprende nucleótidos contiguos seleccionados del grupo de nucleótidos contiguos indicados en SEQ ID Nº 3, donde dichos nucleótidos contiguos comprenden entre aproximadamente 11 y aproximadamente 2000 nucleótidos, y además comprenden los nucleótidos contiguos seleccionados del grupo que consiste en los nucleótidos 1-11 y 9-20 indicados en SEQ ID Nº 1.

11. Una molécula de polinucleótido aislada CARACTERIZADA PORQUE comprende nucleótidos contiguos seleccionados del grupo de nucleótidos contiguos indicados en SEQ ID Nº 4, donde dichos nucleótidos contiguos comprenden entre aproximadamente 11 y aproximadamente 914 nucleótidos, y además comprenden los nucleótidos contiguos seleccionados del grupo que consiste en los nucleótidos 1-11 y 9-20 indicados en SEQ ID Nº 2.

12. La molécula de polinucleótido aislada de cualquiera de las reivindicaciones 9-11, CARACTERIZADA PORQUE dichos nucleótidos contiguos, o su complemento, son útiles en un método de amplificación de ADN para producir un amplicón a partir de una muestra biológica que comprende ADN de maíz, donde la detección de dicho amplicón sirve para diagnosticar la presencia de ADN transgénico del evento de maíz MON89034 en dicha muestra.

13. La molécula de polinucleótido aislada de cualquiera de las reivindicaciones 9-11, CARACTERIZADA PORQUE dichos nucleótidos contiguos, o su complemento, son útiles en un método de detección de nucleótidos para detectar la presencia del evento transgénico de maíz MON89034 en una muestra biológica.

14. Un conjunto de elementos para detectar la presencia de ADN transgénico del evento de maíz MON89034 en una muestra biológica, CARACTERIZADO PORQUE comprende una molécula de sonda de polinucleótido que consiste en al menos entre aproximadamente 11 y aproximadamente 12000 nucleótidos contiguos que presentan homología sustancial, o que presentan complementariedad sustancial, con un segmento de nucleótidos que comprende una secuencia indicada en SEQ ID Nº 5, donde dicha sonda

comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias indicadas en SEQ ID Nº 1 y SEQ ID Nº 2.

15. Un método para detectar un amplicón que sirve para diagnosticar un ADN transgénico del evento de maíz MON89034 en una muestra biológica que comprende ADN de maíz, CARACTERIZADO PORQUE comprende:

(a) poner en contacto dicha muestra biológica con dos o más cebadores en una reacción de amplificación de ácidos nucleicos;

(b) llevar a cabo una reacción de amplificación de ácidos nucleicos; y

(c) detectar el amplicón;

donde el amplicon comprende una secuencia de nucleótidos que se selecciona entre el grupo que consiste en SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2; y donde la presencia de dicho amplicón sirve para diagnosticar dicho evento ADN en dicha muestra.

16. El método de la reivindicación 15, CARACTERIZADO PORQUE dicho amplicon comprende una secuencia de nucleótidos que se selecciona entre el grupo que consiste en nucleótidos contiguos 1-11 o 9-20 con SEQ ID NO:1 y 1-11 o 9-20 con SEQ ID NO:2.

17. Un método para detectar la presencia de una molécula de polinucleótido que sirve como diagnóstico para la presencia del evento transgénico de maíz MON89034 en una muestra, CARACTERIZADO PORQUE el método comprende:

(a) poner en contacto dicha muestra con una sonda que hibridiza en condiciones de hibridización severas con dicha molécula de polinucleótido;

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

(c) detectar la hibridización de dicha sonda a dicha molécula de polinucleótido;

donde dicha molécula de polinucleótido comprende una secuencia que se selecciona entre el grupo que consiste en SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2; y donde detectar la hibridización en dicho paso de detección es diagnóstico de la presencia de dicha molécula de polinucleótido en dicha muestra.

18. Una molécula de polinucleótido aislada y purificada CARACTERIZADA PORQUE comprende una secuencia que se selecciona entre el grupo que consiste en SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2.

19. Una planta de maíz híbrido que comprende ADN diagnóstico para un evento transgénico de maíz MON89034 CARACTERIZADA PORQUE se produce por cría de un evento transgénico de maíz MON89034 junto con una planta de maíz diferente del evento MON89034.

20. Semilla de la planta de maíz híbrido de la reivindicación 20, CARACTERIZADA PORQUE dicha semilla comprende a dicho ADN.

21. Una planta de maíz híbrido CARACTERIZADA PORQUE comprende ADN diagnóstico del evento transgénico de maíz MON89034.

22. Semilla de la planta de maíz híbrido de la reivindicación 21, CARACTERIZADA PORQUE dicha semilla comprende ADN diagnóstico de un evento transgénico de maíz MON89034.

23. Una planta de maíz cultivada a partir de semilla CARACTERIZADA PORQUE comprende ADN diagnóstico de un evento transgénico de maíz MON89034.

24. Una célula, semilla que se produce a partir de la misma, o tejido recolectado de la planta de maíz de la reivindicación 23, CARACTERIZADA PORQUE dicha célula, semilla, o tejido comprende a dicho ADN.

25. Un método para proteger una planta de maíz de la infestación por insectos lepidópteros CARACTERIZADO PORQUE comprende proveer en la dieta de un insecto lepidóptero objetivo qe considerado plaga una o más células de una planta de maíz transgénico, donde cada célula de la planta de maíz comprende en su genoma un polinucleótido correspondiente a la secuencia según se establece tanto en SEQ ID NO:1 como en SEQ ID NO:2 y la secuencia de nucleótidos contiguos según se establece en la SEQ ID NO:5 entre SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2, donde un insecto lepidóptero objetivo que se alimenta con dicha célula de la planta de maíz transgénico es inhibido se seguir alimentándose con dicha planta de maíz.

26. El método de la reivindicación 25, donde dicha planta de maíz también comprende un agente insecticida diferente que se selecciona entre el grupo que consiste en una proteína que es una toxina para un insecto de una clase diferente de los lepidópteros, una proteína tóxica para un nematodo, un dsARN dirigido a un gen en una plaga objetivo para su supresión, y una proteína antifúngica.

27. Una composición de células vegetales transgénicas para proteger a una planta de maíz de la infestación por insectos lepidópteros, CARACTERIZADA PORQUE dicha composición se provee en la dieta de un insecto lepidóptero objetivo que es una plaga, donde cada una de dichas células de la planta de maíz transgénico comprende en su genoma un polinucleótido correspondiente a la secuencia según se establece tanto en SEQ ID NO:1 como en SEQ ID

NO:2 y la secuencia de nucleótidos contiguos según se establece en la SEQ ID NO:5 entre dichas SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2.

28. Una planta de maíz resistente a los insectos, o partes de la misma, CARACTERIZADA PORQUE las semillas de dicha planta de maíz han sido depositadas en la American Type Culture Collection con el número de acceso PTA-7455.

29. Una célula de la planta de maíz resistente a los insectos, CARACTERIZADA PORQUE el ADN que tiene por lo menos una secuencia de nucleótidos que se selecciona entre el grupo que consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, y SEQ ID NO:5 forma parte del genoma de la célula de la planta.

30. Células de progenie de la célula de la planta de maíz resistente a los insectos de la reivindicación 28 CARACTERIZADAS PORQUE el ADN que tiene por lo menos una secuencia de nucleótidos que se selecciona entre el grupo que consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, y SEQ ID NO:5 forma parte del genoma de la célula de la planta.

31. Las células de progenie de la reivindicación 30, CARACTERIZADAS PORQUE dichas células se encuentran dentro de una semilla de una planta regenerada o cultivada a partir de la célula de la planta de maíz o células de progenie de la reivindicación 29, donde dicha semilla comprende a dicha por lo menos una secuencia de nucleótidos.

32. Un método para producir una planta de maíz resistente a los insectos CARACTERIZADO PORQUE comprende regenerar una planta de maíz a partir de la célula o progenie de la célula de la reivindicación 30 y cruzar dicha planta de maíz con una planta de maíz diferente para producir una progenie de

plantas de maíz, y seleccionar la progenie de plantas con resistencia a los insectos analizando cada una en búsqueda de por lo menos una secuencia de nucleótidos que se selecciona entre el grupo que consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:5.

33. Una planta de maíz resistente a los insectos, o una parte de la misma, CARACTERIZADA PORQUE el ADN que codifica Cry2Ab y ADN que tiene las secuencias de nucleótidos con SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2 forman parte del genoma en las células de dicha planta o parte del mismo.

34. La célula de la planta de maíz resistente a los insectos de la reivindicación 33, CARACTERIZADA PORQUE además comprende un ADN que codifica Cry1A.105.

35. La planta de maíz resistente a los insectos de la reivindicación 34, CARACTERIZADA PORQUE las células de la planta de maíz (diferentes de los gametos) son heterocigotas para la secuencia de nucleótidos que se selecciona entre el grupo que consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, y SEQ ID NO:5.

36. La célula de la planta de maíz resistente a los insectos de la reivindicación 28, CARACTERIZADA PORQUE la célula de la planta de maíz es homocigota para la secuencia de nucleótidos que se selecciona entre el grupo que consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, y SEQ ID NO:5.

37. Un método para detectar un polinucleótido en una muestra biológica que comprende ADN de maíz que comprende el evento de maíz MON89034, donde dicho polinucleótido comprende una secuencia de unión como se indica en SEQ ID Nº 1 o SEQ ID Nº 2, CARACTERIZADO PORQUE comprende:

(a) poner en contacto dicha muestra con un par de cebadores que, cuando se usan en una reacción de amplificación de ácidos nucleicos con ADN del evento de maíz MON89034, producen 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 par de cebadores se selecciona del grupo que consiste en (1) un primer cebador que comprende al menos aproximadamente 15 nucleótidos contiguos de la porción del genoma de maíz de SEQ ID Nº 3, y un segundo cebador que comprende al menos aproximadamente 15 nucleótidos contiguos complementarios con la porción de ADN heterólogo insertado de SEQ ID Nº 5, y (2) un primer cebador que comprende al menos aproximadamente 15 nucleótidos contiguos complementarios con la porción del genoma de maíz de SEQ ID Nº 4, y un segundo cebador que comprende al menos aproximadamente 15 nucleótidos contiguos de la porción de ADN heterólogo insertado de SEQ ID Nº 5; donde dicho amplicón en (1) comprende a la SEQ ID Nº 1, y en (2) comprende a la SEQ ID Nº 2.

38. Un par de polinucleótidos cebadores para usar en la producción de un amplicón diagnóstico de la presencia de ADN del evento de maíz MON89034 en una muestra biológica a través de una reacción de amplificación térmica, CARACTERIZADO PORQUE el par de cebadores se selecciona del grupo que consiste en:

(a) un primer cebador que comprende al menos aproximadamente 15 nucleótidos contiguos de la porción del genoma de maíz de SEQ ID Nº

3; y un segundo cebador que comprende al menos aproximadamente 15 nucleótidos contiguos complementarios con la porción de ADN heterólogo insertado de SEQ ID Nº 5; y

(b) un primer cebador que comprende al menos aproximadamente 15 nucleótidos contiguos complementarios con la porción del genoma de maíz de SEQ ID Nº 4; y un segundo cebador que comprende al menos aproximadamente 15 nucleótidos contiguos de la porción de ADN heterólogo insertado de SEQ ID Nº 5;

donde dicho amplicón producido con el par de cebadores de (1) comprende a la SEQ ID Nº 1 o su complemento, y dicho amplicón de (2) comprende a la SEQ ID Nº 2 o su complemento.

39. Un conjunto de elementos para detectar la secuencia de unión SEQ ID Nº 1 o SEQ ID Nº 2 del evento de maíz MON89034 en una muestra biológica, CARACTERIZADO PORQUE dicho conjunto de elementos comprende: (1) una sonda de nucleótidos que es o es completamente complementaria con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nº 1 o SEQ ID Nº 2, y (2) un par de cebadores para usar en una reacción de amplificación de ácidos nucleicos, donde dicho par de cebadores se selecciona del grupo que consiste en:

(a) un primer cebador que comprende al menos aproximadamente 15 nucleótidos contiguos de la porción del genoma de maíz de SEQ ID Nº 3; y un segundo cebador que comprende al menos aproximadamente 15 nucleótidos contiguos complementarios con la porción de ADN heterólogo insertado de SEQ ID Nº 5; y

(b) un primer cebador que comprende al menos aproximadamente 15 nucleótidos contiguos complementarios con la porción del genoma de maíz de SEQ ID Nº 4; y un segundo cebador que comprende al menos aproximadamente 15 nucleótidos contiguos de la porción de ADN heterólogo insertado de SEQ ID Nº 5.

40. Un método para detectar la secuencia de unión SEQ ID Nº 1 o SEQ ID Nº 2 del evento de maíz MON89034 en una muestra biológica que comprende ADN de maíz, CARACTERIZADO PORQUE comprende:

(a) poner en contacto dicha muestra con una sonda que hibridiza bajo condiciones de hibridación severas con dicha secuencia de unión;

(b) someter la muestra y la sonda a condiciones de hibridación severas; y

(c) detectar la hibridación de la sonda con la secuencia de unión;

donde la detección de hibridización de la sonda en la muestra biológica es un indicador de la presencia de dicha secuencia de unión en dicha muestra.

41. Un conjunto de elementos para la detección de ADN CARACTERIZADO PORQUE comprende una sonda de polinucleótido que se hibridiza en condiciones de hibridización severas con una o más secuencias de ADN que comprenden (1) por lo menos 20 nucleótidos contiguos a la SEQ ID NO: 3 y comprende a la SEQ ID NO:1 o complementos de la misma o (2) por lo menos 20 nucleótidos contiguos a la SEQ ID NO:4 y comprende a la SEQ ID NO:2, o complementos de la misma.

42. Un conjunto de elementos para la detección de ADN CARACTERIZADO PORQUE comprende un par de cebadores polinucleótidos para usar en la

detección de la presencia de una secuencia de unión diagnóstico del evento MON89034 de maíz en una muestra biológica, donde el primer cebador de dicho par de cebadores polinucleótidos hibridiza específicamente a la secuencia complementaria inversa correspondiente a aquella que se establece en la SEQ ID NO:3 aproximadamente desde la posición 1 del nucleótido hasta aproximadamente la posición 2050 y el segundo cebador de dicho par de cebadores polinucleótidos hibridiza específicamente a la secuencia según se establece SEQ ID NO:5 aproximadamente desde la posición 2060 del nucleótido aproximadamente hasta la posición 12.208 del nucleótido, y se extienden uno hacia el otro para formar un amplicon que comprende a la SEQ ID NO:1, donde dicho amplicon es diagnóstico de la presencia de ADN del evento MON89034 en dicha muestra.

43. El conjunto de elementos para la detección de ADN de la reivindicación 42 CARACTERIZADO PORQUE dicho primer par se selecciona entre el grupo que consiste en un primer cebador que comprende cualquier secuencia de nucleótidos contiguos de por lo menos entre aproximadamente 11 y aproximadamente 2000 nucleótidos de longitud según se establece en la SEQ ID NO:3 y un segundo cebador que comprende a la complementaria inversa de cualquier secuencia de nucleótidos contiguos de por lo menos entre aproximadamente 11 y aproximadamente 914 nucleótidos de longitud según se establece en la SEQ ID NO:4.

44. Un conjunto de elementos para la detección de ADN CARACTERIZADO PORQUE comprende un par de cebadores polinucleótidos para usar en la detección de la presencia de una secuencia de unión diagnóstico del evento MON89034 de maíz en una muestra biológica, donde el primer cebador de

dicho par de cebadores polinucleótidos hibridiza específicamente a la secuencia complementaria inversa correspondiente a aquella que se establece en la SEQ ID NO:5 aproximadamente desde la posición 1 del nucleótido hasta aproximadamente la posición 11,370 y el segundo cebador de dicho par de cebadores polinucleótidos hibridiza específicamente a la secuencia según se establece SEQ ID NO:4 aproximadamente desde la posición 1 del nucleótido aproximadamente hasta la posición 914 del nucleótido, y se extienden uno hacia el otro para formar un amplicon que comprende a la SEQ ID NO:2, donde dicho amplicon es diagnóstico de la presencia de ADN del evento MON89034 en dicha muestra.

45. Una molécula de ADN aislada CARACTERIZADA PORQUE es una molécula de ADN que se selecciona entre el grupo que consiste en SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2 o es complementaria a la misma.

46. Una molécula de ADN aislada para usar como sonda de ADN, CARACTERIZADA PORQUE la presencia de dicha molécula de ADN aislada en una muestra biológica es diagnóstico del ADN del evento MON89034 de maíz en una muestra biológica, que comprende por lo menos 11 nucleótidos contiguos con la SEQ ID NO:1, o el complemento de la misma.

47. Una molécula de ADN aislada para usar como sonda de ADN, CARACTERIZADA PORQUE la presencia de dicha molécula de ADN aislada en una muestra biológica es diagnóstico de la presencia del evento MON89034 de maíz en dicha muestra biológica, donde dicha molécula comprende por lo menos 11 nucleótidos contiguos con SEQ ID NO:2, o el complemento de la misma.

48. Un método para detectar la presencia de un polinucleótido correspondiente al evento MON89034 de maíz en una muestra biológica, CARACTERIZADO PORQUE el método comprende:

(a) poner en contacto la muestra con un par cebador de ADN;

(b) llevar a cabo una reacción de amplificación de ácido nucleico, produciendo de esa manera un amplicon; y

(c) detectar dicho amplicon;

donde dicho amplicon comprende a la SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2 y la detección de dicho amplicon es diagnóstico de la presencia del evento MON89034 de maíz en dicha muestra.

49. Una célula de una planta de maíz transformada de manera estable, CARACTERIZADA PORQUE su ADN produce un amplicon de ADN que comprende a la SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2 cuando se somete al método de la reivindicación 48.

50. El método de la reivindicación 48, CARACTERIZADO PORQUE dicho par cebador de ADN comprende la secuencias de nucleótidos según se establecen en las SEQ ID NO:6 y SEQ ID NO:7.

51. Un método para detectar la presencia de ADN del evento MON89034 de maíz en una muestra biológica CARACTERIZADO PORQUE comprende:

(a) poner en contacto la muestra con una sonda que hibridiza con ADN MON89034 en condiciones de hibridización severas y en dichas condiciones no hibridiza con ADN genómico de la planta de maíz que es diferente del ADN de MON89034, donde dicha sonda es una secuencia

que se selecciona entre el grupo que consiste en SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2 o es complementaria a la misma;

(b) someter a la muestra y a sonda a condiciones de hibridización severas; y

(c) detectar la hibridización de la sonda con el ADN de MON89034;

donde la detección de la hibridización es diagnóstico de la presencia de dicho evento MON89034 de maíz en dicha muestra biológica.

52. Un método para determining la cigosidad del ADN de una planta de maíz que comprende ADN del evento MON89034 de maíz en una muestra biológica CARACTERIZADO PORQUE comprende:

(a) poner en contacto la muestra con tres cebadores diferentes que comprenden a las 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 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) comparar los amplicones que se producen, donde la presencia de uno a ambos amplicones es diagnóstico de la cigosidad de la muestra.

53. Una planta de maíz híbrido CARACTERIZADA PORQUE por lo menos un progenitor es un evento MON89034 de maíz.

54. Polen, óvulos, semillas, raíces, u hojas que se producen a partir de una planta de maíz generada o cultivada a partir de la planta de maíz híbrido de la reivindicación 53, CARACTERIZADOS PORQUE dicho polen, óvulos, semillas, raíces, u hojas comprenden ADN diagnóstico del evento transgénico de maíz MON89034.

55. Progenie de la planta de maíz híbrido MON89034 de la reivindicación 53, CARACTERIZADA PORQUE las células de dicha progenie comprenden en su genoma a las secuencias que se establecen en SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2.

56. Un segmento de polinucleótido aislado que comprende por lo menos entre aproximadamente 11 y aproximadamente 20 nucleótidos consecutivos que se seleccionan entre el grupo que consiste en SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2, CARACTERIZADO PORQUE dicho segmento se deriva de una célula de la planta de maíz transgénico MON89034.

57. Un segmento de polinucleótido aislado derivado del genoma MON89034 de la planta de maíz transgénico CARACTERIZADO PORQUE comprende una secuencia de nucleótidos que es una secuencia que se selecciona entre el grupo que consiste en SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2 o es complementaria a la misma.

58. Un método para detectar la presencia de un polinucleótido correspondiente al evento MON89034 de maíz en una muestra biológica, CARACTERIZADO PORQUE el método comprende:

(a) poner en contacto la muestra con una sonda en condiciones de hibridización severas, donde dicha sonda comprende una secuencia de nucleótidos contiguos que es una secuencia que se selecciona entre el

grupo que consiste en SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2 o es complementaria a la misma; y

(b) detectar la hibridización de dicha sonda a dicha muestra;

donde la hibridización de dicha sonda a dicha muestra es diagnóstico de la presencia de dicho polinucleótido correspondiente al evento MON89034 de maíz en dicha muestra.

59. Una composición que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que se selecciona entre el grupo que consiste en SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2, CARACTERIZADO PORQUE dicha composición es un producto básico que se selecciona entre el grupo que consiste en harina gruesa de maíz, harina de maíz , aceite de maíz , barbas de maíz, almidón de maíz , y productos alimenticios procesados.

60. Una sonda de polinucleótido que comprende entre aproximadamente 11 y aproximadamente 20 nucleótidos consecutivos de longitud para usar en la detección de la presencia de ADN del evento MON89034 de maíz en una muestra biológica, CARACTERIZADA PORQUE dichos nucleótidos consecutivos se seleccionan entre el grupo que consiste en SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2.

61. La sonda de polinucleótido según se establece en la reivindicación 60 CARACTERIZADA PORQUE dicha sonda comprende un nucleótido que se selecciona entre el grupo que consiste en un ácido desoxirribonucleico , un ácido ribonucleico, y un análogo del nucleótido .

62. La sonda de polinucleótido según se establece en la reivindicación 61 CARACTERIZADA PORQUE dicha sonda se marca con por lo menos un fluoróforo.

63. Un producto básico o producto alimenticio que comprende secuencias de nucleótidos del evento MON89034 de maíz , CARACTERIZADO PORQUE dichas secuencias se seleccionan entre el grupo que consiste en SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2.

64. El producto básico o producto alimenticio de la reivindicación 63 CARACTERIZADO PORQUE se selecciona entre el grupo que consiste en aceite de maíz , almidón de maíz , harina gruesa de maíz, harina de maíz , un cosmético, y un agente de carga.

65. Detección de la presencia de una secuencia de nucleótidos diagnóstico para la presencia del evento MON89034 de maíz en una muestra biológica, CARACTERIZADA PORQUE dicha muestra biológica se selecciona entre el grupo que consiste en aceite de maíz , harina gruesa de maíz, harina de maíz , gluten de maíz , torta de maíz [*subproducto de la extracción de aceite*], y almidón de maíz .

66. El cultivo de células de maíz que comprenden ADN diagnóstico del segmento de ADN insertado en el genoma que corresponde al evento transgénico de maíz MON89034, CARACTERIZADO PORQUE dicho segmento de ADN insertado comprende la secuencia de nucleótidos indicada en SEQ ID Nº 5.

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

RESUMEN

Un evento transgénico de maíz MON89034, y células, semillas y plantas que comprenden ADN diagnóstico del evento de maíz. En la invención también se proveen composiciones que comprenden secuencias de nucleótidos diagnósticas de dicho evento de maíz en una muestra, métodos para detectar la presencia de secuencias de nucleótidos de dicho evento de maíz en una muestra, y sondas y cebadores para usar en la detección de secuencias de nucleótidos que sirven para diagnosticar la presencia de dicho evento de maíz en una muestra; para cultivar las semillas de dicho evento de maíz para obtener plantas de maíz; y para cruzarlas para producir plantas de maíz que comprenden ADN diagnóstico del evento de maíz.

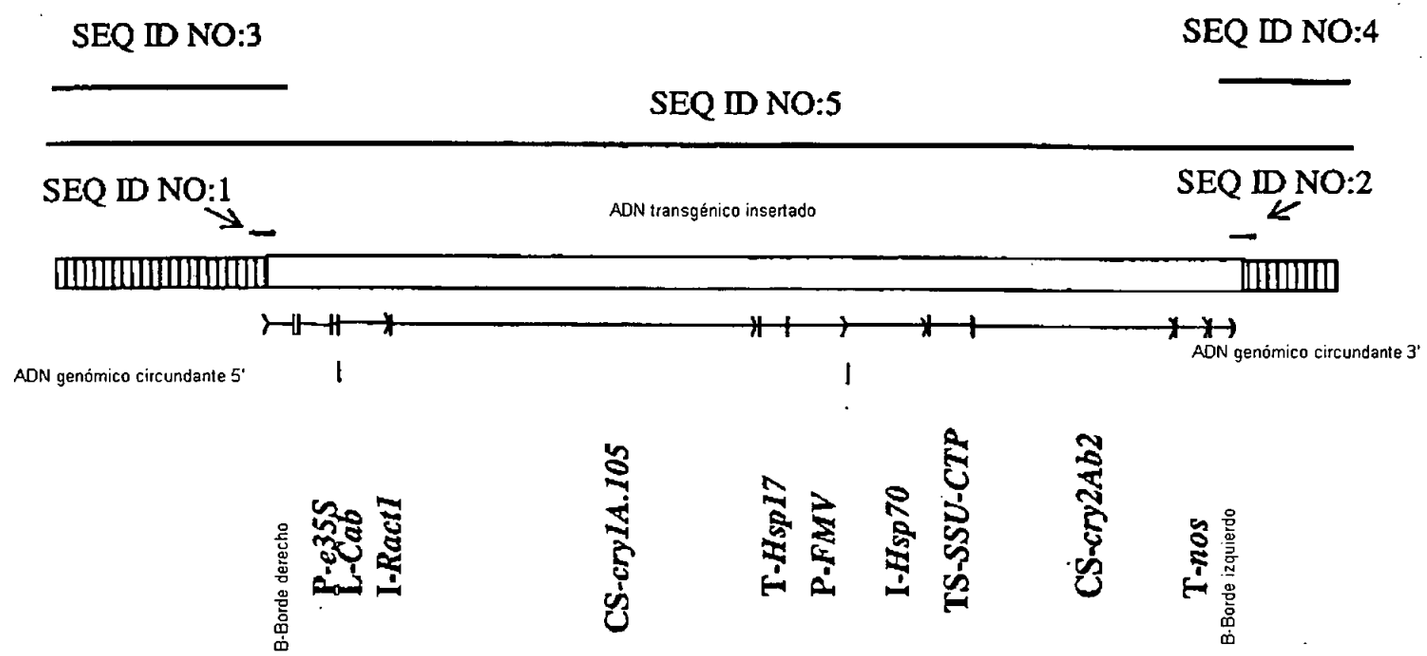

SEQ ID NO:3
SEQ ID NO:4
SEQ ID NO:5
SEQ ID NO:1
SEQ ID NO:2
ADN transgénico insertado
ADN genómico circundante 5'
ADN genómico circundante 3'
B-Borde derecho
P-e35S
L-Cab
I-Ract1
CS-cry1A.105
T-Hsp17
P-FMV
I-Hsp70
TS-SSU-CTP
CS-cry2Ab2
T-nos
B-Borde izquierdo

FIGURA 1

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> 38-21(53618)0001

<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 11369-11388

<400> 2

actcattgca tccccggaaa 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 gtttgtttgg ttggaaatac 120
aagcgaaaag agagctaatg agggggacat ccatattttc tatggtgttt gaataagagt 180
cacgcgggaa taagatgaac accgaaacaa tttttttgta gctacgtggt tccaaaaaat 240
cgagtagacg gtgtcgcttc cacctcatac 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 ctggtgttgt tgacggactc gaacggggcc 540
gggcgtgtgg tgtggctagc tgtggtggtt tgctcgccag ccagccagcc acacatcagc 600
gagcatgcag agcttaagca tgtatgtacg gatcggcttg cttagcggtt aagggtgtgt 660
ttggtttggc ttttggcttt ggcttttgcc ccctaaaagc caaaagccaa ccaagggtgt 720
atttggtttg acttttggct tttggctttt gtcccctaaa agccaaaagc caaacaaagg 780
gttagatcta ggaagcagct ttttctaaaa gctggctttc tcacagtgca aatctgaaag 840
cacccctgaa cctgctttta gtggcttttc gaatggaact gtgaaaacat atatcgaaga 900
acttttaacg acttttagtg gtttccacca aacagtttag ctttttaacg gcttacagcc 960
tacaacagct ttttccacag ctcacagccc acagcaactt ttttcacagc cacagcccaa 1020
ccaaacagac cccaaagggc tgaatccagg aagcagcttt ttctaaaagc cgactttctc 1080
gtagtgtaaa actgaaaaca cccctggacc tgcttttagt ggcttttgga tggaactgtg 1140
aaaacatata tcgaagaact tttaacgact tttagtggtt tccaccaaac 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 ccgccgtcca ctcaccaatc aacacggaac gcccaaaaca cacacacacg 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 tcgccgcagc gcagctacct agcacgctca 1740
cgcatgctac actgcctaca cgcacacggc cggcccaaaa gcgttccctg 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 a 2071

<210> 4
<211> 914
<212> ADN
<213> ARTIFICIAL
<220>
<223> SECUENCIA CIRCUNDANTE 3' MÁS UNIÓN;
corresponde a SEQ ID NO:5 en 11369-12282
<400> 4
actcattgca tccccggaaa ttatgttttt ttaaaaacca cggtattata gataccgtgt 60
tattttttga gtattggaaa tttcatttca acccaaagtt tcttcatggc acatctagct 120
tttgcctaat accatgtagg gctacatctt aaaaatctat actactatat taaagctgca 180
ggggtagcct gtctccacct ggttctgcct cgagccaatc taaaccgtcc atctatatcc 240
atcaaatcag caccgtccgg tccgtgcgca cctcctctcc cgctattcag ttgcatactt 300
gcagcaggtt ctccctcctc accatttcct ctgcctcctc tctcgctcac tggtcagatt 360
catcctgcct ctcccgcatg cgctccctcc ccatgccccg tctcgcacta tcgccacacc 420
tcaccgcggg gagacgaaga cggtggacgc atcctcacct cctccgctag ttgtcgctct 480
tccatcctct tcaacaactt ctacataggg agaggcggtt cggcgtcccg acgccgccgc 540
ttctcccctc cccatggagg acgagaacat cgacctcggc ggcgggggcg atgcctccgc 600
tctgcataga ggagggttgt agtggcaagc agcaatgcca acaccgaggc gggccaagac 660
taggcaacaa taggacggca cgcccggttg tcagcgaggt ggcggcatcg tgtgccgcta 720
ccgaacaaca tctccggcgc tggagtcggt gagttactgc gccacccgga cgccctcaat 780
gcactgatat ctacccggtc tccatcgccg cccttcctcc cttccctctc cctgtgcctc 840
cctctcttgc cctctccctt ccaactgctc ccgccccagc cctagcccaa ccacctcccg 900
cgcagggtca ccaa 914
<210> 5
<211> 12208
<212> ADN
<213> ARTIFICIAL
<220>
<223> SECUENCIA DE ADN INSERTADA
<400> 5
aatatttaaa aatggaagta atactatatt aaaatgattc atgtggaact cctgcgcttc 60
tttttgaagt ttcaaaaggg agctttcagg gtcgcttaga gtttgtttgg ttggaaatac 120
aagcgaaaag agagctaatg agggggacat ccatattttc tatggtgttt gaataagagt 180
cacgcgggaa taagatgaac accgaaacaa tttttttgta gctacgtggt tccaaaaaat 240
cgagtagacg gtgtcgcttc cacctcatac 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 ctggtgttgt tgacggactc gaacggggcc 540
gggcgtgtgg tgtggctagc tgtggtggtt tgctcgccag ccagccagcc acacatcagc 600
gagcatgcag agcttaagca tgtatgtacg gatcggcttg cttagcggtt aagggtgtgt 660
ttggtttggc ttttggcttt ggcttttgcc ccctaaaagc caaaagccaa ccaagggtgt 720
atttggtttg acttttggct tttggctttt gtcccctaaa agccaaaagc caaacaaagg 780
gttagatcta ggaagcagct ttttctaaaa gctggctttc tcacagtgca aatctgaaag 840
cacccctgaa cctgctttta gtggcttttc gaatggaact gtgaaaacat atatcgaaga 900
acttttaacg acttttagtg gtttccacca aacagtttag ctttttaacg gcttacagcc 960
tacaacagct ttttccacag ctcacagccc acagcaactt ttttcacagc cacagcccaa 1020
ccaaacagac cccaaagggc tgaatccagg aagcagcttt ttctaaaagc cgactttctc 1080
gtagtgtaaa actgaaaaca cccctggacc tgcttttagt ggcttttgga tggaactgtg 1140
aaaacatata tcgaagaact tttaacgact tttagtggtt tccaccaaac 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 ccgccgtcca ctcaccaatc aacacggaac gcccaaaaca cacacacacg 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 tcgccgcagc gcagctacct agcacgctca 1740
cgcatgctac actgcctaca cgcacacggc cggcccaaaa gcgttccctg 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 ttaccaattt tttttcaatt caaaaatgta gatgtccgca gcgttattat 2160
aaaatgaaag tacattttga taaaacgaca aattacgatc cgtcgtattt ataggcgaaa 2220
gcaataaaca aattattcta attcggaaat ctttatttcg acgtgtctac attcacgtcc 2280
aaatgggggc ttagatgaga aacttcacga tttggcgcgc caaagcttgg tcgagtggaa 2340
gctagctttc cgatcctacc tgtcacttca tcaaaaggac agtagaaaag gaaggtggct 2400
cctacaaatg ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc tctgccgaca 2460
gtggtcccaa agatggaccc ccacccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa gacgttccaa 2520
ccacgtcttc aaagcaagtg gattgatgtg atatctccac tgacgtaagg gatgacgcac 2580

aatcccacta tccttcgcaa gacccttcct ctatataagg aagttcattt catttggaga 2640
ggacacgctg acaagctgac tctagcagat cctctagaac catcttccac acactcaagc 2700
cacactattg gagaacacac agggacaaca caccataaga tccaagggag gcctccgccg 2760
ccgccggtaa ccaccccgcc cctctcctct ttctttctcc gtttttttt ccgtctcggt 2820
ctcgatcttt ggccttggta gtttgggtgg gcgagaggcg gcttcgtgcg cgcccagatc 2880
ggtgcgcggg aggggcggga tctcgcggct ggggctctcg ccggcgtgga tccggcccgg 2940
atctcgcggg gaatggggct ctcggatgta gatctgcgat ccgccgttgt tgggggagat 3000
gatgggggt ttaaaatttc cgccgtgcta aacaagatca ggaagagggg aaaagggcac 3060
tatggtttat atttttatat atttctgctg cttcgtcagg cttagatgtg ctagatcttt 3120
ctttcttctt tttgtgggta gaatttgaat ccctcagcat tgttcatcgg tagtttttct 3180
tttcatgatt tgtgacaaat gcagcctcgt gcggagcttt tttgtaggta gaagtgatca 3240
accatggaca acaacccaaa catcaacgag tgcatcccgt acaactgcct cagcaaccct 3300
gaggtcgagg tgctcggcgg tgagcgcatc gagaccggtt acacccccat cgacatctcc 3360
ctctccctca cgcagttcct gctcagcgag ttcgtgccag gcgctggctt cgtcctgggc 3420
ctcgtggaca tcatctgggg catctttggc ccctcccagt gggacgcctt cctggtgcaa 3480
atcgagcagc tcatcaacca gaggatcgag gagttcgcca ggaaccaggc catcagccgc 3540
ctggagggcc tcagcaacct ctaccaaatc tacgctgaga gcttccgcga gtgggaggcc 3600
gaccccacta acccagctct ccgcgaggag atgcgcatcc agttcaacga catgaacagc 3660
gccctgacca ccgccatccc actcttcgcc gtccagaact accaagtccc gctcctgtcc 3720
gtgtacgtcc aggccgccaa cctgcacctc agcgtgctga gggacgtcag cgtgtttggc 3780
cagaggtggg gcttcgacgc cgccaccatc aacagccgct acaacgacct caccaggctg 3840
atcggcaact acaccgacca cgctgtccgc tggtacaaca ctggccgtcc tggacattgt 3900
gtccctcttc ccgaactacg actcccgcac ctacccgatc cgcaccgtgt cccaactgac 3960
ccgcgaaatc tacaccaacc ccgtcctgga gaacttcgac ggtagcttca ggggcagcgc 4020
ccagggcatc gagggctcca tcaggagccc acacctgatg gacatcctca acagcatcac 4080
tatctacacc gatgcccacc gcggcgagta ctactggtcc ggccaccaga tcatggcctc 4140
cccggtcggc ttcagcggcc ccgagtttac ctttcctctc tacggcacga tgggcaacgc 4200
cgctccacaa caacgcatcg tcgctcagct gggccagggc gtctaccgca ccctgagctc 4260
caccctgtac cgcaggccct tcaacatcgg tatcaacaac cagcagctgt ccgtcctgga 4320
tggcactgag ttcgcctacg gcacctcctc caacctgccc tccgctgtct accgcaagag 4380
cggcacggtg gattccctgg acgagatccc accacagaac aacaatgtgc cccccaggca 4440
gggtttttcc cacaggctca gccacgtgtc catgttccgc tccggcttca gcaactcgtc 4500
cgtgagcatc atcagagctc ctatgttctc ttggatacac cgtagtgctg agttcaacaa 4560
catcattgca tccgacagca ttactcaaat acccttggtg aaagcacata cacttcagtc 4620
aggtactact gttgtcagag gtccagggtt tacaggagga gacattcttc gtcgcacaag 4680
tggaggaccc tttgcttaca ctattgttaa catcaatggc caattgcccc aaaggtatcg 4740
tgcaagaatc cgctatgcct ctactacaaa tctcaggatc tacgtgactg ttgcaggtga 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
gaacgccctc tttacctcca ccaatcagct tggcttgaaa actaacgtta ctgactatca 5100
cattgaccaa gtgtccaact tggtcaccta ccttagcgat gagttctgcc tcgacgagaa 5160
gcgtgaactc tccgagaaag ttaaacacgc caagcgtctc agcgacgaga ggaatctctt 5220
gcaagactcc aacttcaaag acatcaacag gcagccagaa cgtggttggg gtggaagcac 5280
cgggatcacc atccaaggag gcgacgatgt gttcaaggag aactacgtca ccctctccgg 5340
aactttcgac gagtgctacc ctacctactt gtaccagaag atcgatgagt ccaaactcaa 5400
agccttcacc aggtatcaac ttagaggcta catcgaagac agccaagacc ttgaaatcta 5460
ctcgatcagg tacaatgcca agcacgagac cgtgaatgtc ccaggtactg gttccctctg 5520
gccactttct gcccaatctc ccattgggaa gtgtggagag cctaacagat gcgctccaca 5580
ccttgagtgg aatcctgact tggactgctc ctgcagggat ggcgagaagt gtgcccacca 5640
ttctcatcac ttctccttgg acatcgatgt gggatgtact gacctgaatg aggacctcgg 5700
agtctgggtc atcttcaaga tcaagaccca agacggacac gcaagacttg gcaaccttga 5760
gtttctcgaa gagaaaccat tggtcggtga agctctcgct cgtgtgaaga gagcagagaa 5820
gaagtggagg gacaaacgtg agaaactcga atgggaaact aacatcgttt acaaggaggc 5880
caaagagtcc gtggatgctt tgttcgtgaa ctcccaatat gatcagttgc aagccgacac 5940
caacatcgcc atgatccacg ccgcagacaa acgtgtgcac agcattcgtg aggcttactt 6000
gcctgagttg tccgtgatcc ctggtgtgaa cgctgccatc ttcgaggaac ttgagggacg 6060
tatctttacc gcattctcct tgtacgatgc cagaaacgtc atcaagaacg gtgacttcaa 6120
caatggcctc agctgctgga atgtgaaagg tcatgtggac gtggaggaac agaacaatca 6180
gcgttccgtc ctggttgtgc ctgagtggga agctgaagtg tcccaagagg ttagagtctg 6240
tccaggtaga ggctacattc tccgtgtgac cgcttacaag gagggatacg gtgagggttg 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 ccgagggaac 6660
cttcatcgtg gacagcgtgg agcttctctt gatggaggaa taatgagatc tatcgattct 6720
agaaggcctg aattctgcat gcgtttggac gtatgctcat tcaggttgga gccaatttgg 6780
ttgatgtgtg tgcgagttct tgcgagtctg atgagacatc tctgtattgt gtttctttcc 6840
ccagtgtttt ctgtacttgt gtaatcggct aatcgccaac agattcggcg atgaataaat 6900
gagaaataaa ttgttctgat tttgagtgca aaaaaaaagg aattagatct gtgtgtgttt 6960
tttggatccc cggggcggcc gcgttaacaa gcttgagctc aggatttagc agcattccag 7020

attgggttca atcaacaagg tacgagccat atcactttat tcaaattggt 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
cctaccaaaa 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
gagagtggtt tagctggatc tagaattaca ctctgaaatc gtgttctgcc tgtgctgatt 7740
acttgccgtc ctttgtagca gcaaaatata gggacatggt agtacgaaac gaagatagaa 7800
cctacacagc aatacgagaa atgtgtaatt tggtgcttag cggtatttat ttaagcacat 7860
gttggtgtta tagggcactt ggattcagaa gtttgctgtt aatttaggca caggcttcat 7920
actacatggg tcaatagtat agggattcat attataggcg atactataat aatttgttcg 7980
tctgcagagc ttattatttg ccaaaattag atattcctat tctgtttttg tttgtgtgct 8040
gttaaattgt taacgcctga aggaataaat ataaatgacg aaattttgat gtttatctct 8100
gctcctttat tgtgaccata agtcaagatc agatgcactt gttttaaata ttgttgtctg 8160
aagaaataag tactgacagt attttgatgc attgatctgc ttgtttgttg taacaaaatt 8220
taaaaataaa gagtttcctt tttgttgctc tccttacctc ctgatggtat ctagtatcta 8280
ccaactgaca ctatattgct tctctttaca tacgtatctt gctcgatgcc ttctccctag 8340
tgttgaccag tgttactcac atagtctttg ctcatttcat tgtaatgcag ataccaagcg 8400
gcctctagag gatcagcatg gcgcccaccg tgatgatggc ctcgtcggcc accgccgtcg 8460
ctccgttcca ggggctcaag tccaccgcca gcctccccgt cgcccgccgc tcctccagaa 8520
gcctcggcaa cgtcagcaac ggcggaagga tccggtgcat gcaggtaaca aatgcatcct 8580
agctagtagt tctttgcatt gcagcagctg cagctagcga gttagtaata ggaagggaac 8640
tgatgatcca tgcatggact gatgtgtgtt gcccatccca tcccatttcc caaccccaaa 8700
cgaaccaaaa cacacgtact acgtgcaggt gtggccggcc tacggcaaca agaagttcga 8760
gacgctgtcg tacctgccgc cgctgtcgac cggcgggcgc 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 aaggtcggct ctctcgtcgg gaagcgcatc ctctcggaac tccgcaacct 9060
gatctttcca tctggctcca ccaacctcat gcaagacatc ctcagggaga ccgagaagtt 9120
tctcaaccag cgcctcaaca ctgataccct tgctcgcgtc aacgctgagc tgacgggtct 9180
gcaagcaaac gtggaggagt tcaaccgcca agtggacaac ttcctcaacc ccaaccgcaa 9240

tgcggtgcct ctgtccatca cttcttccgt gaacaccatg caacaactgt tcctcaaccg 9300
cttgcctcag ttccagatgc aaggctacca gctgctcctg ctgccactct ttgctcaggc 9360
tgccaacctg cacctctcct tcattcgtga cgtgatcctc aacgctgacg agtggggcat 9420
ctctgcagcc acgctgagga cctaccgcga ctacctgaag aactacacca gggactactc 9480
caactattgc atcaacacct accagtcggc cttcaagggc ctcaatacga ggcttcacga 9540
catgctggag ttcaggacct acatgttcct gaacgtgttc gagtacgtca gcatctggtc 9600
gctcttcaag taccagagcc tgctggtgtc cagcggcgcc aacctctacg ccagcggctc 9660
tggtccccaa caaactcaga gcttcaccag ccaggactgg ccattcctgt attcgttgtt 9720
ccaagtcaac tccaactacg tcctcaacgg cttctctggt gctcgcctct ccaacacctt 9780
ccccaacatt gttggcctcc ccggctccac cacaactcat gctctgcttg ctgccagagt 9840
gaactactcc ggcggcatct cgagcggcga cattggtgca tcgccgttca accagaactt 9900
caactgctcc accttcctgc cgccgctgct caccccgttc gtgaggtcct ggctcgacag 9960
cggctccgac cgcgagggcg tggccaccgt caccaactgg caaaccgagt ccttcgagac 10020
cacccttggc ctccggagcg gcgccttcac ggcgcgtgga aattctaact acttccccga 10080
ctacttcatc aggaacatct ctggtgttcc tctcgtcgtc cgcaacgagg acctccgccg 10140
tccactgcac tacaacgaga tcaggaacat cgcctctccg tccgggacgc ccggaggtgc 10200
aagggcgtac atggtgagcg tccataacag gaagaacaac atccacgctg tgcatgagaa 10260
cggctccatg atccacctgg cgcccaatga ttacaccggc ttcaccatct ctccaatcca 10320
cgccacccaa gtgaacaacc agacacgcac cttcatctcc gagaagttcg gcaaccaggg 10380
cgactccctg aggttcgagc agaacaacac caccgccagg tacaccctgc gcggcaacgg 10440
caacagctac aacctgtacc tgcgcgtcag ctccattggc aactccacca tcagggtcac 10500
catcaacggg agggtgtaca cagccaccaa tgtgaacacg acgaccaaca atgatggcgt 10560
caacgacaac ggcgcccgct tcagcgacat caacattggc aacgtggtgg ccagcagcaa 10620
ctccgacgtc ccgctggaca tcaacgtgac cctgaactct ggcacccagt tcgacctcat 10680
gaacatcatg ctggtgccaa ctaacatctc gccgctgtac tgataggagc tctgatcccc 10740
atgggaattc ccgatcgttc aaacatttgg caataaagtt tcttaagatt gaatcctgtt 10800
gccggtcttg cgatgattat catataattt ctgttgaatt acgttaagca tgtaataatt 10860
aacatgtaat gcatgacgtt atttatgaga tgggttttta tgattagagt cccgcaatta 10920
tacatttaat acgcgataga aaacaaaata tagcgcgcaa actaggataa attatcgcgc 10980
gcggtgtcat ctatgttact agatcgggga tatccccggg gcggccgcgg ggaattcggt 11040
accaagcttt ggcgcgccaa atcgtgaagt ttctcatcta agcccccatt tggacgtgaa 11100
tgtagacacg tcgaaataaa gatttccgaa ttagaataat ttgtttattg ctttcgccta 11160
taaatacgac ggatcgtaat ttgtcgtttt atcaaaatgt actttcattt tataataacg 11220
ctgcggacat ctacattttt gaattgaaaa aaaattggta attactcttt ctttttctcc 11280
atattgacca tcatactcat tgcatccccg gaaattatgt ttttttaaaa accacggtat 11340
tatagatacc gtgttatttt ttgagtattg gaaatttcat ttcaacccaa agtttcttca 11400
tggcacatct agcttttgcc taataccatg tagggctaca tcttaaaaat ctatactact 11460

atattaaagc tgcaggggta gcctgtctcc acctggttct gcctcgagcc aatctaaacc 11520
gtccatctat atccatcaaa tcagcaccgt ccggtccgtg cgcacctcct ctcccgctat 11580
tcagttgcat acttgcagca ggttctccct cctcaccatt tcctctgcct cctctctcgc 11640
tcactggtca gattcatcct gcctctcccg catgcgctcc ctccccatgc cccgtctcgc 11700
actatcgcca cacctcaccg cggggagacg aagacggtgg acgcatcctc acctcctccg 11760
ctagttgtcg ctcttccatc ctcttcaaca acttctacat agggagaggc ggttcggcgt 11820
cccgacgccg ccgcttctcc cctccccatg gaggacgaga acatcgacct cggcggcggg 11880
ggcgatgcct ccgctctgca tagaggaggg ttgtagtggc aagcagcaat gccaacaccg 11940
aggcgggcca agactaggca acaataggac ggcacgcccg gttgtcagcg aggtggcggc 12000
atcgtgtgcc gctaccgaac aacatctccg gcgctggagt cggtgagtta ctgcgccacc 12060
cggacgccct caatgcactg atatctaccc 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
gccaataaaa 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>
<223> SECUENCIA SINTÉTICA
<400> 8
ggtatccctc cagaccagca 20

<210> 9
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> SECUENCIA SINTÉTICA
<400> 9
gtggactcct tctggatgtt 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; compremento 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

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

PATENTE DE INVENCION ____ PCT _X_ MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____

(21) Nº de solicitud: (22) Fecha de solicitud:
(51) Clasificación Internacional :

(71)Solicitante(s) **MONSANTO TECHNOLOGY, LLC.**

(72) Inventor(es) **HEATHER ANDERSON, JENNIFER DOUGLAS, JEANNA GROAT, SCOTT JOHNSON, REBECCA KELLY, JOHN KORTE, JAMES RICE**

(74) Apoderado: **DRA. MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO**

(30) Prioridad	(31) **No. Prioridad**	32) **Fecha**	(33) **País**
	60/808.834	**26/05/2006**	**US**

(85) Fecha inicio fase nacional:
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT
Fecha de presentación de la solicitud: **24/05/2007**
No. de solicitud **PCT/US2007/069662**

(87) Publicación internacional
Fecha: **06/12/2007**
Nº publicación: **WO 2007/140256 A1**

(54) Titulo: **PLANTA Y SEMILLA DE MAIZ CORRESPONDIENTES AL EVENTO TRANSGENICO MON89034 Y METODOS PARA SU DETECCION Y USO**

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN PCT

(21) Nº de solicitud:

22) Fecha de solicitud:

(30) Prioridad (31) Nº Prioridad **60/808.834** 32) Fecha **26/05/2006** (33) País **US**

(51) int. Cl.:

(71)Solicitante(s) **MONSANTO TECHNOLOGY, LLC**

(72) Inventor(es) **HEATHER ANDERSON**
JENNIFER DOUGLAS
JEANNA GROAT
Y OTROS

(74) Apoderado: **MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO**

(85) Fecha limite inicio fase nacional:
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT
Fecha de presentación de la solicitud: **24/05/2007**
Nº de solicitud **PCT/US2007/069662**

(87) Publicación internacional
Fecha: **06/12/2007**
Nº publicación: **WO 2007/140256 A1**

(54) Titulo: **PLANTA Y SEMILLA DE MAIZ CORRESPONDIENTES AL EVENTO TRANSGENICO MON89034, Y METODOS PARA SU DETECCION Y USO**

Reivindicación(es):

1. Una planta de maíz transgénica CARACTERIZADA PORQUE ha sido designada como el evento transgénico de maiz MON89034, semillas representativas para obtener dicha planta, para producir progenie, para obtener plantas que se desarrollen, o para producir una semilla de cultivo que comprenda dicho evento transgénico de maíz, que ha sido depositada en la Colección Americana de Tipos de Cultivo (ATCC) con el número de acceso PTA-7455.
2. La planta transgénica de maíz de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADA PORQUE comprende ADN diagnóstico de dicho evento, donde dicho ADN comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nº 1, SEQ ID Nº 2, SEQ ID Nº 3, SEQ ID Nº 4 y SEQ ID Nº 5.
3. La planta transgénica de maíz, progenie de dicha planta, células de una planta desarrollada a partir de dicha planta, o semillas producidas por dicha planta, de acuerdo con la reivindicación 2, CARACTERIZADAS PORQUE dicho ADN diagnóstico de dicho evento se selecciona adicionalmente del grupo que consiste en SEQ ID Nº 1 y SEQ ID Nº 2.
4. La planta transgénica de maiz de acuerdo con la reivindicación 3, CARACTERIZADA PORQUE ha sido procesada para obtener un producto basico o un alimento seleccionado del grupo que consiste en masa de maiz, harina de maíz, aceite de maiz, proteína de maiz, etanol y DDGS.
5. La planta transgénica de maiz de la reivindicación 1, CARACTERIZADA PORQUE presenta resistencia a la infestación de insectos lepidópteros.
6. La planta de maiz transgénica de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADA PORQUE comprende en el genoma de las células de dicha planta una molécula de ADN seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nº 1 y SEQ ID Nº 2.
7. Un amplicón diagnóstico de la presencia de ADN transgénico del evento de maiz MON89034 en una muestra biológica, CARACTERIZADO PORQUE dicho amplicón comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias indicadas en SEQ ID Nº 1 y SEQ ID Nº 2.
8. El amplicón de la reivindicación 7, CARACTERIZADO PORQUE dicha muestra biológica comprende masa de maiz, aceite de maiz, tortas de maiz, semillas de maiz, germen de maiz, almidón de maiz y harina de maiz.
9. Una molécula de polinucleótido aislada CARACTERIZADA PORQUE comprende nucleótidos contiguos seleccionados del grupo de nucleótidos contiguos indicados en SEQ ID Nº 5, donde dichos nucleótidos contiguos comprenden entre aproximadamente 11 y aproximadamente 12000 nucleótidos, y además comprenden los nucleótidos contiguos seleccionados del grupo que consiste en los nucleótidos 1-11 ó 9-20 indicados en SEQ ID Nº 1, y los nucleótidos 1-11 ó 9-20 indicados en SEQ ID Nº 2.
10. Una molécula de polinucleótido aislada CARACTERIZADA PORQUE comprende nucleótidos contiguos seleccionados del grupo de nucleótidos contiguos indicados en SEQ ID Nº 3, donde dichos nucleótidos contiguos comprenden entre aproximadamente 11 y aproximadamente 2000 nucleótidos, y además comprenden los nucleótidos contiguos seleccionados del grupo que consiste en los nucleótidos 1-11 y 9-20 indicados en SEQ ID Nº 1.
11. Una molécula de polinucleótido aislada CARACTERIZADA PORQUE comprende nucleótidos contiguos seleccionados del grupo de nucleótidos contiguos indicados en SEQ ID Nº 4, donde dichos nucleótidos contiguos comprenden entre aproximadamente 11 y aproximadamente 914 nucleótidos, y además comprenden los nucleótidos contiguos seleccionados del grupo que consiste en los nucleótidos 1-11 y 9-20 indicados en SEQ ID Nº 2.
12. La molécula de polinucleótido aislada de cualquiera de las reivindicaciones 9-11, CARACTERIZADA PORQUE dichos nucleótidos contiguos, o su complemento, son útiles en un método de amplificación de ADN para producir un amplicón a partir de una muestra biológica que comprende ADN de maiz, donde la detección de dicho amplicón sirve para diagnosticar la presencia de ADN transgénico del evento de maiz MON89034 en dicha muestra.

...

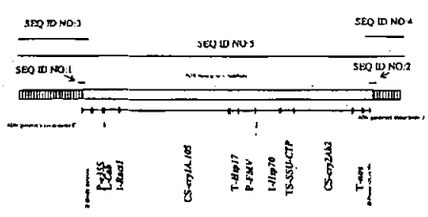


FIGURA 1

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
CASTELLANOS ABONDANO MARGARITA
Apoderado(a) y/o Representante de
MONSANTO TECHNOLOGY LLC

REFERENCIA	Radicación No.	8 125763
	Solicitud internacional	PCT/US2007/069662
	Fecha inicio fase nacional	26/12/2008
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	0588

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. Si fuere el caso, el solicitante debe adjuntar la traducción de los anexos del reporte de examen preliminar internacional (Art. 36.2.b) del tratado PCT.

2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

Continua en la página siguiente...

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación No.:8 125763

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 23 ENE. 2009
jfernand