

TÍTULO DE LA INVENCION

EVENTO TRANSGÉNICO DE MAÍZ MON 95379 Y MÉTODOS PARA SU DETECCIÓN Y USOS

5

REFERENCIA A SOLICITUD RELACIONADA

[01] La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense n.º 62/711 810, presentada el 30 de julio de 2018, que se incorpora a la presente mediante esta referencia en su totalidad.

10

INCORPORACIÓN DEL LISTADO DE SECUENCIAS

[02] El listado de secuencias contenido en el archivo con el nombre MONS463WO_ST25 es de 75 kilobytes (medido en Microsoft Windows®), se creó el 26 de julio de 2019, se presenta junto con la presente por vía electrónica y se incorpora mediante esta referencia.

15

CAMPO DE LA INVENCION

[03] La invención hace referencia a moléculas de ADN recombinante presentes en el evento de maíz MON 95379 y/o aisladas de este. La invención también hace referencia a plantas de maíz, partes de la planta y semillas, células y productos agrícolas transgénicos que contienen el evento de maíz MON 95379, así como también métodos para su uso y para detectar la presencia del evento de maíz MON 95379. Las plantas de maíz, partes, semillas y células transgénicas que contienen el ADN del evento de maíz MON 95379 exhiben resistencia a plagas de insectos en la familia de los lepidópteros.

25

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[04] El maíz (*zea mays*) es un cultivo importante y es una fuente de alimentos primaria en muchas áreas del mundo. Se han aplicado métodos de biotecnología al maíz para mejorar los rasgos agronómicos y la calidad del producto. Uno de dichos rasgos agronómicos es la resistencia a los insectos, lo que se logra mediante la expresión de toxinas de insectos heterólogas, también conocidas como transgenes, insertadas en el genoma de la planta de maíz.

30

[05] La expresión de dichos transgenes en una planta, parte de planta, semilla o célula transgénica puede verse influenciada por muchos factores diferentes, los que incluyen

elementos usados en los casetes que contienen la expresión del transgén y la interacción de esos elementos en un casete. Esto se complica además por una inserción transgénica que contiene dos o más casetes de expresión donde cada casete de expresión tiene un transgén que confiere un rasgo individual, también conocido como evento transgénico multigénico. Un evento transgénico multigénico útil desde el punto de vista comercial requiere que cada uno de los transgenes en la inserción transgénica se exprese en la manera necesaria para cada rasgo. Para lograr esto, en primer lugar, los casetes de expresión individuales se diseñan y se evalúan en plantas, y los casetes de expresión que muestran la mejor actividad de los insectos, si bien no resultan en fenotipos negativos debido a la expresión, se seleccionan para cada rasgo. A continuación, los casetes de expresión seleccionados para un rasgo se combinan con los casetes de expresión seleccionados para el otro rasgo en una construcción única. Se diseñan múltiples construcciones con orientaciones diferentes para proveer la mejor resistencia y prevenir la aparición de fenotipos negativos o características agronómicas negativas, tal como menor rendimiento. Las construcciones se evalúan para asegurar que todos los casetes de expresión funcionen bien juntos y que cada transgén se exprese de forma apropiada. Entonces, la combinación y la orientación seleccionadas de casetes de expresión se usan como un único inserto transgénico para producir cientos de eventos transgénicos, donde cada evento es el resultado de la inserción aleatoria de la construcción en una ubicación genómica diferente.

[06] Cada evento transgénico es único en su perfil molecular y punto de inserción cromosómica. Debido a la variabilidad implicada en la creación de eventos, se debe analizar cada evento único a través de múltiples generaciones de plantas, evaluar en cada etapa la caracterización molecular, la eficacia de la expresión de proteínas y los agentes agronómicos, para seleccionar un evento superior para su uso comercial. El rendimiento de un evento en una planta, parte de planta, semilla o célula transgénica y, por lo tanto, su eficacia, pueden verse influenciados por la ubicación genómica de la inserción del transgén. Específicamente, la eficacia del evento se puede ver impactada por factores cis y/o trans con respecto al sitio de integración o la estructura de cromatina. Los eventos pueden tener la misma inserción transgénica y, sin embargo, tener niveles diferentes de expresión transgénica y rendimiento en tejidos y etapas de desarrollo, en varios germoplasmas o en condiciones de crecimiento específicas. También pueden existir diferencias fenotípicas o agronómicas no deseadas entre algunos eventos. Por lo tanto, es necesario producir y analizar una gran cantidad de eventos individuales de

transformación de plantas para seleccionar un evento que tenga propiedades superiores respecto al rasgo deseable y las características fenotípicas y agrícolas óptimas necesarias para que sean adecuadas con fines comerciales. Además, la creación de un evento multigénico para uso comercial requiere de una caracterización molecular rigurosa, evaluación en invernadero y ensayos de campo durante varios años, en múltiples ubicaciones y en una diversidad de condiciones, de forma de poder recopilar datos agronómicos, fenotípicos y moleculares exhaustivos. Los datos resultantes, entonces, deben ser analizados por científicos y agrónomos para seleccionar un evento que sea útil para fines comerciales. Una vez seleccionado, dicho evento se puede entonces introgresar mediante métodos de reproducción de plantas como un locus único con múltiples rasgos resistentes a insectos en un germoplasma nuevo adaptado de forma adecuada a condiciones de crecimiento local específicas, y se apilan o se combinan al reproducirse con otros eventos diferentes que confieren diferentes rasgos a los rasgos conferidos por el evento de la presente invención.

15

COMPENDIO DE LA INVENCION

[07] La invención provee un evento de maíz transgénico novedoso, MON 95379, que provee control insecticida sobre plagas de lepidópteros de maíz. La invención también provee plantas, células vegetales, semillas, partes de planta y productos básicos transgénicos que comprenden el evento MON 95379. En otra modalidad, la invención provee polinucleótidos específicos para el evento MON 95379 y plantas, células vegetales, semillas, partes de plantas, plantas de progenie y los productos básicos que comprenden el evento MON 95379. En aun otra modalidad, se proveen métodos con relación al evento MON 95379.

[08] Por lo tanto, en un aspecto, la invención provee una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8; SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 y un complemento completo de estas.

[09] En una modalidad, la molécula de ADN recombinante deriva del evento de maíz MON 95379 en una muestra de semilla que contiene dicho evento que se ha depositado con el n.º de acceso de ATCC PTA-125027.

[10] Otro aspecto de la invención provee una molécula de ADN que comprende un segmento de polinucleótidos de una longitud suficiente para funcionar como una sonda de

ADN que se hibrida específicamente en condiciones rigurosas de hibridación con el ADN del evento de maíz MON 95379 en una muestra, en donde la detección de la hibridación de dicha molécula de ADN en dichas condiciones de hibridación rigurosas es un diagnóstico para determinar la presencia de ADN del evento de maíz MON 95379 en dicha muestra. En determinadas modalidades, la muestra comprende una planta de maíz, célula vegetal de maíz, semilla de maíz, parte de planta de maíz, planta de progenie de maíz, semilla de maíz procesada, ración para animales que comprende maíz, aceite de maíz, maíz triturado, harina de maíz, copos de maíz, salvado de maíz, pasta de maíz, biomasa de maíz y productos de combustible producidos con maíz y partes de maíz.

[11] Aun otro aspecto de la invención provee un par de moléculas de ADN que comprende una primera molécula de ADN y una segunda molécula de ADN diferente de la primera molécula de ADN, que funcionan como cebadores de ADN cuando se utilizan juntas en una reacción de amplificación con una muestra que contiene el ADN plantilla del evento de maíz MON 95379 para producir un amplicón de diagnóstico para determinar la presencia de dicho ADN del evento de maíz MON 95379 en dicha muestra, en donde dicho amplicón comprende la secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10.

[12] Otra modalidad de la invención es un método para detectar la presencia de un diagnóstico de segmento de ADN para el ADN del evento de maíz MON 95379 en una muestra, dicho método comprende: a) poner la muestra en contacto con una molécula de ADN que actúa como una sonda y se hibrida específicamente en condiciones rigurosas con el evento de maíz MON 95379; b) someter dicha muestra y dicha molécula de ADN a condiciones de hibridación rigurosas; y c) detectar la hibridación de dicha molécula de ADN a dicho ADN en dicha muestra, en donde dicha detección es el diagnóstico para determinar la presencia de dicho ADN de evento de maíz MON 95379 en dicha muestra.

[13] Aun otra modalidad de la invención es un método para detectar la presencia de un diagnóstico de segmento de ADN para el ADN del evento de maíz MON 95379 en una muestra, el que comprende: a) poner dicha muestra en contacto con el par de moléculas de ADN de la invención; b) realizar una reacción de amplificación suficiente para producir un amplicón de ADN; y c) detectar la presencia de dicho amplicón de ADN en dicha reacción, en donde dicho amplicón de ADN comprende la 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, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 y SEQ

ID NO:10.

[14] Otra modalidad de la invención es una planta de maíz, parte de planta de maíz, célula de maíz o parte de esta que comprende una molécula de polinucleótidos recombinantes que comprende la secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que
5 consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10. Esta planta de maíz, parte de planta de maíz, célula de maíz o parte de esta es insecticida cuando se provee en la dieta de una plaga de insectos lepidópteros. Las plagas de lepidópteros pueden incluir cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*), gusano elotero (*Helicoverpa*
10 *zea*), barrenador del maíz del suroeste (*Diatraea grandiosella*), barrenador de la caña de azúcar (*Diatraea saccharalis*) y barrenador menor del tallo de maíz (*Elasmopalpus lignosellus*). Además, la planta de maíz se puede definir adicionalmente como progenie de cualquier generación de una planta de maíz que comprende el evento de maíz MON 95379.

[15] Aun otra modalidad de la invención es un método para proteger una planta de maíz de la infestación de insectos, donde dicho método comprende proporcionar en la dieta de una plaga de insectos lepidópteros una cantidad eficaz como insecticida de células o tejido de una planta de maíz que comprende el evento de maíz MON 95379. Nuevamente, las plagas de insectos lepidópteros contempladas incluyen cogollero del
20 maíz (*Spodoptera frugiperda*), gusano elotero (*Helicoverpa zea*), barrenador del maíz del suroeste (*Diatraea grandiosella*), barrenador de la caña de azúcar (*Diatraea saccharalis*) y barrenador menor del tallo de maíz (*Elasmopalpus lignosellus*).

[16] Otra modalidad de la invención es un método para producir una planta de maíz resistente a insectos que comprende: a) cruzamiento sexual de dos plantas de maíz
25 diferentes con al menos una de las dos plantas de maíz diferentes que comprende el ADN del evento de maíz transgénico MON 95379 DNA; b) tomar muestras de semillas o tejidos de la progenie de la etapa (a); c) detectar en dicha muestra de la etapa (b) la progenie que comprende el ADN del evento de maíz MON 95379; y d) seleccionar dicha progenie que comprende el ADN del evento de maíz MON 95379.

[17] Una modalidad adicional de la invención es una semilla de maíz, material de planta de maíz inerte o un microorganismo que comprende una cantidad detectable de la 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, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10 o complementos completos de estas.

[18] Aun otra modalidad de la invención es un producto básico que comprende una secuencia de nucleótidos que se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8; SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10 o complementos completos de estas. Los productos básicos contemplados incluyen semilla de maíz entera o procesada, ración para animales que comprende maíz, aceite de maíz, maíz triturado, harina de maíz, copos de maíz, salvado de maíz, biomasa de maíz y productos de combustible producidos con maíz y partes de maíz.

[19] Otra modalidad de la invención es una planta de maíz, parte de planta de maíz o semilla de maíz de estas que comprende ADN que funciona como una plantilla cuando se evalúa en un método de amplificación de ADN que produce un amplicón de diagnóstico para determinar la presencia de ADN del evento MON 95379.

[20] Aun otra modalidad de la invención es un método para determinar la cigosidad de una planta de maíz o semilla de maíz que comprende el evento MON 95379 que comprende: a) poner una muestra que comprende el ADN de maíz en contacto con un par cebador capaz de producir un amplicón de una de las secuencias de codificación de toxinas que codifica Cry1B.868 o Cry1Da_7; b) poner dicha muestra que comprende el ADN de maíz en contacto con un par cebador que es capaz de producir un amplicón de un estándar interno que se sabe que es de copia única y homocigoto en la planta de maíz; c) poner la muestra de ADN en contacto con un conjunto de sonda que contiene al menos una primera sonda que se hibrida específicamente a una de las secuencias de codificación de toxinas que codifica Cry1B.868 o Cry1Da_7, y una segunda sonda que se hibrida específicamente al ADN genómico estándar interno que se sabe que es de copia única y homocigoto en la planta de maíz; d) realizar una reacción de amplificación de ADN que usa PCR en tiempo real y determinar los umbrales del ciclo (valores Ct) del amplicón que corresponde a la secuencia de codificación de toxinas y el estándar interno homocigoto de copia única; e) calcular la diferencia (ΔCt) entre el valor de Ct del amplicón estándar interno homocigoto de copia única y el valor de Ct del amplicón de secuencia de codificación de toxinas; y f) determinar la cigosidad, en donde un ΔCt de alrededor de 0 (cero) indica la homocigosidad del ADN-T insertado del evento MON 95379 y un ΔCt de alrededor de 1 (uno) indica la heterocigosidad del ADN-T insertado del evento MON 95379. En determinadas modalidades de este método, los pares cebadores se seleccionan del grupo que consiste en la SEQ ID NO:18 combinada con la SEQ ID NO:19, y la SEQ ID NO:21 combinada con la SEQ ID NO:22; y las sondas son la SEQ ID NO:20 y

la SEQ ID NO:23. En otra modalidad, los pares cebadores se seleccionan del grupo que consiste en la SEQ ID NO:18 combinada con la SEQ ID NO:19, y la SEQ ID NO:24 combinada con la SEQ ID NO:25; y las sondas son la SEQ ID NO:20 y la SEQ ID NO:26. En aun otra modalidad de la presente invención, ΔC_t de alrededor de 1 (uno) que indica la heterocigosidad del ADN-T insertado del evento MON 95379 se encuentra en el rango de 0,75 a 1,25.

[21] Una modalidad adicional de la invención es un método para determinar la cigosidad de una planta de maíz o semilla de maíz que comprende el evento MON 95379 que comprende: a) poner una muestra que comprende ADN de maíz en contacto con un conjunto de pares cebadores que comprende al menos dos pares cebadores diferentes capaces de producir un primer diagnóstico de amplicón para el evento MON 95379 y un segundo diagnóstico de amplicón para el ADN genómico de maíz nativo que no comprende el evento MON 95379; i) realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico con la muestra y el conjunto de pares cebadores; ii) detectar en la reacción de amplificación de ácido nucleico el primer diagnóstico de amplicón para el evento MON 95379, o el segundo diagnóstico de amplicón para el ADN genómico de maíz nativo que no comprende el evento MON 95379, en donde la presencia de solo el primer amplicón es diagnóstico de una planta de maíz o semilla de maíz homocigota para el evento MON 95379 , y la presencia tanto del primer amplicón como del segundo amplicón es diagnóstico de una planta de maíz o semilla de maíz heterocigota para el evento MON 95379; o b) poner una muestra que comprende ADN de maíz en contacto con un conjunto de sonda que contiene al menos una primera sonda que se hibrida específicamente al ADN del evento MON 95379 y al menos una segunda sonda que se hibrida específicamente al ADN genómico de maíz que fue alterado por la inserción del ADN heterólogo del evento MON 95379 y no se hibrida al ADN del evento MON 95379; i) someter el conjunto de sonda a hibridación con la muestra en condiciones de hibridación rigurosas, en donde detectar la hibridación de solo la primera sonda en las condiciones de hibridación es diagnóstico para una planta de maíz o semilla de maíz homocigota para el evento MON 95379, y en donde detectar la hibridación tanto de la primera sonda como de la segunda sonda en las condiciones de hibridación es diagnóstico para una planta de maíz o una semilla de maíz heterocigota para el evento MON 95379. En una modalidad de este método, el conjunto de pares cebadores comprende la SEQ ID NO:15 combinada con la SEQ ID NO:16, y la SEQ ID NO:15 combinada con la SEQ ID NO:27. En otra modalidad de este método, el conjunto de sondas comprende la SEQ ID NO:17 y la SEQ

ID NO:28.

[22] Los aspectos anteriores y otros aspectos de la invención resultarán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada.

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[23] La Figura 1 representa la secuencia del evento de maíz MON 95379. Las líneas y los cuadros horizontales corresponden a las posiciones de las SEQ ID NO:1 ([1]), SEQ ID NO:2 ([2]), SEQ ID NO:3 ([3]), SEQ ID NO:4 ([4]), SEQ ID NO:5 ([5]), SEQ ID NO:6 ([6]), SEQ ID NO:7 ([7]), SEQ ID NO:8 ([8]), SEQ ID NO:9 ([9]), SEQ ID NO:11 ([11]) y SEQ ID NO:12 ([12]) con relación a la SEQ ID NO:10 ([10]). Las flechas horizontales etiquetadas SQ51219 (SEQ ID NO:15) ([15]), SQ21524 (SEQ ID NO:16) ([16]), SQ50998 (SEQ ID NO:21) ([21]), SQ50997 (SEQ ID NO:22) ([22]), SQ50485 (SEQ ID NO:24) ([24]) y SQ50484 (SEQ ID NO:25) ([25]) representan la posición aproximada de los subconjuntos de cebadores que se pueden usar para detectar el evento de maíz MON 95379. Las flechas horizontales etiquetadas PB10269 (SEQ ID NO:17) ([17]), PB50340 (SEQ ID NO:23) ([23]), PB50138 (SEQ ID NO:26) ([26]) representan la posición aproximada de una sonda de ADN que se puede usar para detectar el evento de maíz MON 95379. «E» representa un elemento potenciador, «P» representa un elemento promotor, «L» representa un elemento líder (5' UTR), «I» representa un elemento intrón, «T» representa una 3' UTR, «Cry1B.868» representa el elemento de secuencia de codificación Cry1B.868, «Cry1Da_7» representa el elemento de secuencia de codificación Cry1Da_1, «LoxP» representa el sitio en que ocurrió la escisión del marcador recombinasa Cre, dejando atrás uno de los dos sitios LOXP luego de la escisión del marcador y «LB» representa el límite de ADN-T izquierdo.

[24] La Figura 2 es una representación esquemática de los casetes de ADN-T antes de la integración para formar el evento MON 95379, luego de la integración y luego de la escisión de Cre. El cuadro horizontal superior representa el casete de ADN-T en el vector de plásmido usado para transformar el evento MON 95379, presentado como SEQ ID NO:13 ([13]) («ADN-T antes de la integración»). Las flechas horizontales abajo de [13] representan los elementos genéticos individuales comprendidos en los dos casetes transgénicos. «LB» representa un elemento del límite izquierdo de ADN-T, «E» representa un elemento potenciador, «P» representa un elemento promotor, «L» representa un elemento líder (5' UTR), «I» representa un elemento intrón, «T» representa una 3' UTR, «Cry1B.868» representa el elemento de secuencia de codificación Cry1B.868,

«Cry1Da_7» representa el elemento de secuencia de codificación Cry1Da_1, «CP4» representa el marcador seleccionable CP4, «TS» representa una secuencia dirigida a la diana, «LoxP» representa el sitio en el que ocurre la escisión del marcador recombinasa Cre y «RB» representa un elemento del límite derecho de ADN-T. El cuadro horizontal del medio, «ADN-T insertado luego de la integración», representa el casete de ADN-T integrado en el genoma de maíz luego de la transformación en donde se perdió el límite de T-DNA derecho (RB) durante la integración. El cuadro horizontal inferior, «ADN-T insertado luego de la escisión de Cre», representa el casete de ADN-T integrado luego de la escisión del casete de marcador seleccionable CP4, dejando atrás uno de los dos sitios LoxP y la región LB.

[25] La Figura 3 es una representación esquemática del proceso de reproducción para producir el evento de maíz MON 95379 libre de marcadores. Los eventos de generación R_0 (transformantes) son aquellos que derivan de la transformación inicial con el vector de transformación binaria usado para generar el evento de maíz MON 95379. Las generaciones «R» posteriores (R_1 y R_2) representan generaciones sucesivas producidas a través de la autopolinización de plantas derivadas del transformante inicial R_0 que resultó en el evento de maíz MON 95379. Los transformantes R_2 que son homocigotos para la inserción de ADN-T se someten a polinización cruzada con una línea de maíz transgénica de élite que comprende un casete del transgén para la expresión de recombinasa Cre, lo que resulta en una generación F1, en donde gran parte de la progenie ha perdido el marcador seleccionable CP4 debido a la escisión de recombinasa Cre. Se seleccionan las plantas hemicígoto positivas para ADN-T y negativas para CP4, y se autopolinizan, lo que resulta en una generación F₂. Se seleccionan las plantas homocigotas F₂ para el alelo de ADN-T insertado sin el marcador CP4 y carentes del casete del transgén recombinasa Cre y se autopolinizan para dar lugar a una generación F₃. Las plantas de generación F₃ se autopolinizan y dan lugar a una línea pura de semillas Gold Standard F₄.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

[26] La SEQ ID NO:1 es una secuencia de 50 nucleótidos que representa la región de unión 5' del ADN genómico de maíz y el casete de expresión transgénico integrado. La SEQ ID NO:1 se encuentra dentro de la SEQ ID NO:10 en las posiciones de nucleótidos 838-887.

[27] La SEQ ID NO:2 es una secuencia de 50 nucleótidos que representa la región de unión 3' del ADN genómico del maíz y el casete de expresión transgénico integrado. La

SEQ ID NO:2 se encuentra dentro de la SEQ ID NO:10 en las posiciones de nucleótidos 14 156-14 205.

[28] La SEQ ID NO:3 es una secuencia de 100 nucleótidos que representa la región de unión 5' del ADN genómico de maíz y el casete de expresión transgénico integrado. La
5 SEQ ID NO:3 se encuentra dentro de la SEQ ID NO:10 en las posiciones de nucleótidos 813-912.

[29] La SEQ ID NO:4 es una secuencia de 100 nucleótidos que representa la región de unión 3' del ADN genómico del maíz y el casete de expresión transgénico integrado. La
10 SEQ ID NO:4 se encuentra dentro de la SEQ ID NO:10 en las posiciones de nucleótidos 14 131-14 230.

[30] La SEQ ID NO:5 es una secuencia de 200 nucleótidos que representa la región de unión 5' del ADN genómico de maíz y el casete de expresión transgénico integrado. La
SEQ ID NO:5 se encuentra dentro de la SEQ ID NO:10 en las posiciones de nucleótidos 763-962.

[31] La SEQ ID NO:6 es una secuencia de 200 nucleótidos que representa la región de unión 3' del ADN genómico del maíz y el casete de expresión transgénico integrado. La
15 SEQ ID NO:6 se encuentra dentro de la SEQ ID NO:10 en las posiciones de nucleótidos 14 081-14 280.

[32] La SEQ ID NO:7 es una secuencia de 1160 nucleótidos que representa la región
20 de unión 5' del ADN genómico de maíz y el casete de expresión transgénico integrado. La
SEQ ID NO:7 se encuentra dentro de la SEQ ID NO:10 en las posiciones de nucleótidos 1-1160.

[33] La SEQ ID NO:8 es una secuencia de 1178 nucleótidos que representa la región de unión 3' del ADN genómico del maíz y el casete de expresión transgénico integrado. La
25 SEQ ID NO:8 se encuentra dentro de la SEQ ID NO:10 en las posiciones de nucleótidos 14 039-15 216.

[34] La SEQ ID NO:9 es una secuencia de 13 318 nucleótidos correspondiente al ADN-T insertado transgénico del evento de maíz MON 95379.

[35] La SEQ ID NO:10 es una secuencia de 15,216 nucleótidos correspondiente a la
30 secuencia de nucleótidos de cóntigo de la secuencia de nucleótidos de ADN flanqueante genómico 5', la secuencia de nucleótidos de ADN-T insertado en un evento MON 95379, y la secuencia de nucleótidos de ADN flanqueante genómica 3'; e incluye la SEQ ID NO:11 (nucleótidos 1-862), SEQ ID NO:9 (nucleótidos 863-14,180), y SEQ ID NO:12 (nucleótidos 14,181-15,216).

[36] La SEQ ID NO:11 es una secuencia de 862 nucleótidos que representa el ADN genómico de maíz flanqueante 5' hasta el ADN-T insertado. La SEQ ID NO:11 se encuentra dentro de la SEQ ID NO:10 en las posiciones de nucleótidos 1-862.

5 [37] La SEQ ID NO:12 es una secuencia de 1036 nucleótidos que representa el ADN genómico de maíz flanqueante 3' luego del ADN-T insertado. La SEQ ID NO:12 se encuentra dentro de la SEQ ID NO:10 en las posiciones de nucleótidos 14 181-15 216.

[38] La SEQ ID NO:13 es una secuencia de 18 376 nucleótidos que representa el casete del transgén comprendido dentro del vector de transformación de plásmido binario usado para transformar el maíz para producir el evento de maíz MON 95379.

10 [39] La SEQ ID NO:14 es una secuencia de 35 nucleótidos que representa los sitios LoxP usados para la escisión mediada por Cre y la recombinación. Un sitio LoxP restante luego de la escisión del marcador se puede encontrar en la SEQ ID NO:10 en las posiciones de nucleótidos 1080-1114.

15 [40] La SEQ ID NO:15 es una secuencia de 20 nucleótidos correspondiente a un cebador de amplificación térmica al que se hace referencia como SQ21940, que se usa para identificar el ADN del evento de maíz MON 95379 en una muestra, y es idéntica a la secuencia de nucleótidos correspondiente a las posiciones 833-852 de la SEQ ID NO:10.

[41] La SEQ ID NO:16 es una secuencia de 30 nucleótidos correspondiente a un cebador de amplificación térmica al que se hace referencia como SQ21524, que se usa
20 para identificar el ADN del evento de maíz MON 95379 en una muestra, y es idéntica al complemento inverso de la secuencia de nucleótidos correspondiente a las posiciones 905-934 de la SEQ ID NO:10.

[42] La SEQ ID NO:17 es una secuencia de 16 nucleótidos correspondiente a una sonda a la que se hace referencia como PB10269, que se usa para identificar el ADN del
25 evento de maíz MON 95379 en una muestra, y es idéntica al complemento inverso de la secuencia de nucleótidos correspondiente a las posiciones 886-901 de la SEQ ID NO:10.

[43] La SEQ ID NO:18 es una secuencia de 24 nucleótidos que corresponde a un cebador de amplificación térmica al que se hace referencia como SQ20222 usado como un control interno para el ensayo de evento y cigosidad para MON 95379 y se hibrida a
30 una región del genoma de maíz.

[44] La SEQ ID NO:19 es una secuencia de 28 nucleótidos que corresponde a un cebador de amplificación térmica al que se hace referencia como SQ20221 usado como un control interno para el ensayo de evento y cigosidad para MON 95379 y se hibrida a una región del genoma de maíz.

- [45] La SEQ ID NO:20 es una secuencia de 29 nucleótidos que corresponde a una sonda a la que se hace referencia como PB50237 usado como un control interno para el ensayo de evento y cigosidad para MON 95379 y se hibrida a una región del genoma de maíz.
- 5 [46] La SEQ ID NO:21 es una secuencia de 20 nucleótidos correspondiente a un cebador de amplificación térmica denominado SQ50998, que se usa en el ensayo de cigosidad para el evento MON 95379 y se hibrida a la secuencia de codificación de Cry1B.868 dentro de la SEQ ID NO:10; y es idéntica a la secuencia de nucleótidos correspondiente a las posiciones 2809-2828 de la SEQ ID NO:10.
- 10 [47] La SEQ ID NO:22 es una secuencia de 20 nucleótidos correspondiente a un cebador de amplificación térmica al que se hace referencia como SQ50997, que se usa en el ensayo de cigosidad para el evento MON 95379 y se hibrida a la secuencia de codificación de Cry1B.868 dentro de la SEQ ID NO:10; y es idéntica al complemento inverso de la secuencia de nucleótidos correspondiente a las posiciones 2852-2871 de la
- 15 SEQ ID NO:10.
- [48] La SEQ ID NO:23 es una secuencia de 18 nucleótidos correspondiente a una sonda a la que se hace referencia como PB50340, que se usa en el ensayo de cigosidad para el evento MON 95379 y se hibrida a la secuencia de codificación de Cry1B.868 dentro de la SEQ ID NO:10; y es idéntica al complemento inverso de la secuencia de
- 20 nucleótidos correspondiente a las posiciones 2833-2850 de la SEQ ID NO:10.
- [49] La SEQ ID NO:24 es una secuencia de 19 nucleótidos correspondiente a un cebador de amplificación térmica al que se hace referencia como SQ50485, que se usa en el ensayo de cigosidad para el evento MON 95379 y se hibrida a la secuencia de codificación de Cry1Da_7 dentro de la SEQ ID NO:10; y es idéntica a la secuencia de
- 25 nucleótidos correspondiente a las posiciones 12 820-12 838 de la SEQ ID NO:10.
- [50] La SEQ ID NO:25 es una secuencia de 18 nucleótidos correspondiente a un cebador de amplificación térmica al que se hace referencia como SQ50484, que se usa en el ensayo de cigosidad para el evento MON 95379 y se hibrida a la secuencia de codificación de Cry1Da_7 dentro de la SEQ ID NO:10; y es idéntica al complemento
- 30 inverso de la secuencia de nucleótidos correspondiente a las posiciones 12 855-12 872 de la SEQ ID NO:10.
- [51] La SEQ ID NO:26 es una secuencia de 14 nucleótidos correspondiente a una sonda a la que se hace referencia como PB50138, que se usa en el ensayo de cigosidad para el evento MON 95379 y se hibrida a la secuencia de codificación de Cry1Da_7

dentro de la SEQ ID NO:10; y es idéntica al complemento inverso de la secuencia de nucleótidos correspondiente a las posiciones 12 840-12 853 de la SEQ ID NO:10.

[52] La SEQ ID NO:27 es una secuencia de 21 nucleótidos que corresponde a un cebador de amplificación térmica al que se hace referencia como PNEGDNA usado en el ensayo de cigosidad para el evento MON 95379 y se hibrida a una región de ADN genómico de maíz que se eliminó cuando el ADN-T usado para producir el evento MON 95379 fue insertado en el genoma de maíz. Un amplicón derivado de la combinación de cebadores SQ51219 y PNEGDNA es diagnóstico para determinar el alelo de tipo salvaje que carece del ADN-T insertado en el evento MON 95379.

[53] La SEQ ID NO:28 es una secuencia de 14 nucleótidos que corresponde a una sonda a la que se hace referencia como PRBNEGDNA usada en el ensayo de cigosidad para el evento MON 95379 y se hibrida a una región de ADN genómico de maíz que fue eliminada cuando se usó el ADN-T para producir el evento MON 95379 insertado en el genoma de maíz.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[54] La presente invención provee un evento de maíz transgénico, MON 95379, que logra el control insecticida sobre plagas de maíz de lepidópteros mediante la expresión de Cry1B.868 y Cry1Da_7. Específicamente, la expresión de las proteínas inhibidoras de insectos Cry1B.868 y Cry1Da_7 en el evento de maíz MON 95379 provee resistencia a las plagas de insectos lepidópteros cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*), gusano elotero (*Helicoverpa zea*), barrenador del maíz del suroeste (*Diatraea grandiosella*), barrenador de la caña de azúcar (*Diatraea saccharalis*) y barrenador menor del tallo de maíz (*Elasmopalpus lignosellus*). El evento MON 95379 responderá a una gran necesidad de controlar estos insectos en el mercado del maíz, ya que los insecticidas químicos no suelen proveer control adecuado de estos insectos, o requieren múltiples aplicaciones durante la temporada de cultivo, de manera que aumentan el ingreso de pesticidas químicos en el medio ambiente y agregan costo a la producción de maíz.

[55] Se debe entender que una referencia al evento MON 95379 equivale a una referencia al evento MON95379; son intercambiables y representan el mismo evento de maíz transgénico.

[56] Las técnicas de transformación vegetal se utilizan para insertar ADN externo (también conocido como ADN transgénico) de forma aleatoria en un cromosoma del genoma de una célula para producir una célula modificada genéticamente, a la que

también se hace referencia como una célula «transgénica» o «recombinante». Muchas células individuales se transforman mediante el uso de esta técnica, donde cada una da como resultado un «evento transgénico» o «evento» único debido a la inserción aleatoria del ADN externo en el genoma. Una planta transgénica se regenera entonces a partir de cada célula transgénica individual. Esto da como resultado en que cada célula de la planta transgénica contenga el evento transgénico insertado de forma única como una parte estable de su genoma. Esta planta transgénica puede utilizarse entonces para producir plantas de progenie, donde cada una contiene el evento transgénico único.

[57] El evento de maíz MON 95379 se produjo mediante un proceso de transformación mediado por *Agrobacterium* de embriones inmaduros de maíz con un sistema binario de ADN-T único. En este sistema, se utilizó una cepa de *Agrobacterium* que emplea un vector de plásmido binario con un ADN-T único. La construcción de ADN-T que consiste en dos casetes del transgén para la expresión de las secuencias de codificación de toxinas de insectos que codifican Cry1B.868 y Cry1Da_7, y un casete del transgén usado para la selección de células de maíz transformadas con selección de glifosato (CP4). La construcción de ADN-T es la SEQ ID NO:13, y se ilustra en la Figura 2 («ADN-T antes de la integración»). Durante la integración, se perdió el límite de ADN-T derecho tal como se muestra en la Figura 2 («ADN-T insertado luego de la integración»). El casete de selección de glifosato fue flanqueado a ambos lados con sitios de reconocimiento LoxP, los que se reconocen con recombinasa Cre, derivados de fago P1 de enterobacterias (Larry Gilbertson (2003) *Cre-lox recombination: Cre-active tools for plant biotechnology. TRENDS in Biotechnology*, 21:12, 550-555).

[58] Tal como se describió específicamente en la presente, el evento de maíz MON 95379 se produjo mediante un proceso de investigación y desarrollo complejo, en el que:

(1) cientos de construcciones de vector de plásmido, las que variaban con respecto a las secuencias de codificación para las proteínas insecticidas, las secuencias de codificación para los elementos de regulación de transcripción, y la cantidad y la orientación de los casetes dentro de las construcciones, se desarrollaron y se transformaron en células de maíz para crear miles de eventos que se evaluaron y se analizaron, lo que resultó en la selección de la construcción usada para generar el evento MON 95379; (2) cientos de células de maíz se transformaron con la construcción usada para generar el evento MON 95379, de forma que crearon una población de plantas transgénicas en las que cada planta contenía un evento transgénico único que se regeneró y se evaluó; (3) se seleccionó el evento final MON 95379 luego de un proceso riguroso de selección de

evento de múltiples años que implicaba la evaluación y el análisis de características moleculares, eficacia, expresión de proteínas y propiedades agronómicas en una diversidad de contextos genéticos; y (4) se retiró el casete de selección de glifosato en el evento de maíz MON 95379 a través de la escisión de Cre *in vivo* para crear un evento MON 95379 final «libre de marcadores». De este modo, se produjo y se seleccionó el evento de maíz MON 95379 como un evento superior de manera única útil para fines agronómicos de amplia escala.

[59] Se caracterizó el ADN plasmídico insertado en el genoma del evento de maíz MON 95379 mediante análisis molecular detallado. Este análisis incluyó: el número del inserto (número de los sitios de integración dentro del genoma de maíz), la ubicación del inserto genómico (el sitio específico en el genoma de maíz donde se produjo la inserción), la cantidad de copias (la cantidad de copias del ADN-T dentro de un locus) y la integridad del ADN transgénico insertado. El análisis molecular detallado demostró que el ADN-T integrado que contenía los casetes de expresión Cry1B.868 y Cry1Da_7 permaneció intacto luego de la integración y la escisión de Cre del casete de selección de glifosato (CP4). Tal como se usa en la presente, un «casete de expresión» o «casete» es una molécula de ADN recombinante que comprende una combinación de elementos distintos que se serán expresados por una célula transformada. La Tabla 1 provee una lista de los elementos contenidos en la SEQ ID NO:10, la secuencia de ADN que corresponde al evento de maíz MON 95379

Tabla 1. Descripción del evento de maíz MON 95379

Elemento	Posición en la SEQ ID NO:9	Descripción
ADN flanqueante 5'	1-862	Secuencia de ADN que flanquea el extremo 5' del inserto transgénico.
Región del límite izquierdo	863-1044	Región de ADN de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> que contiene la secuencia del límite izquierdo
LoxP	1080-1114	Una secuencia de reconocimiento para una recombinasa específica del sitio de fago P1 de <i>Enterobacteria</i> .
T-Os.LTP:1	1225-1524	La región no traducida 3' para un gen tipo proteína de transferencia de lípidos (LTP)

		de <i>Oryza sativa</i> (arroz).
Cry1B.868	1534-5133	Secuencia de codificación de una toxina de insecto quimérica conformada por los dominios 1 y 2 de Cry1Be2, el dominio 3 de Cry1Ca y el dominio protoxina de Cry1Ab3.
I-Zm.UbqM1-1:1:16	5160-6212	Un intrón derivado de un gen de ubiquitina 1 de <i>Zea mays Mexicana</i> .
L-Zm.UbqM1-1:1:4	6213-6290	Una UTR 5' derivada de un gen de ubiquitina 1 de <i>Zea mays Mexicana</i> .
P-Zm.UbqM1-1:1:5	6291-7167	Un promotor derivado de un gen de ubiquitina 1 de <i>Zea mays Mexicana</i> .
E-FMV.35S-1:1:2	7195-7731	El potenciador del gen 35S del virus del mosaico de escrofularia (FMV).
P-SETit.Tip-1:1:1	7743-8659	Un promotor de un gen de proteína integral de membrana de tonoplasto de <i>Setaria italica</i> (mijo de cola de zorra).
L-SETit.Tip-1:1:1	8660-8723	Una UTR 5' de un gen de proteína integral de membrana de tonoplasto de <i>Setaria italica</i> (mijo de cola de zorra).
I-Os.Act15-1:1:1	8732-10024	El primer intrón del gen de la actina 15 (Act 15) de <i>Oryza sativa</i> (arroz).
Cry1Da_7	10043-13543	La secuencia de codificación de una toxina de insecto Cry1Da con modificaciones de aminoácidos para mejorar la eficacia.
T-Os.GOS2-1:1:1	13560-14027	La región no traducida 3' del gen GOS2 que codifica un factor de inicio de traducción de <i>Oryza sativa</i> (arroz).
Secuencia flanqueante 3'	14181-15216	Secuencia de ADN que flanquea el extremo 3' del inserto transgénico.

[60] El evento de maíz MON 95379 se caracteriza como una inserción en un locus único en el genoma de maíz, lo que resulta en dos nuevos locus o secuencias de unión

(por ejemplo, secuencias establecidas en las SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:8) que abarcan una parte del ADN insertado y el ADN genómico de maíz que no son conocidos por aparecer de forma natural en el genoma de maíz u otros eventos de maíz transgénico, son únicos para el evento MON 95379. Estas secuencias de unión son útiles para detectar la presencia del evento MON 95379 en las células de maíz, tejidos de maíz, semillas de maíz y plantas de maíz o productos derivados de plantas de maíz, tal como productos básicos de maíz. En la presente se describen pares de cebadores y sondas moleculares de ADN que se han desarrollado para su uso en la identificación de la presencia de estos diversos segmentos de unión en las muestras biológicas que contenían o que se sospecha que contenían células de maíz, semillas de maíz, partes de plantas de maíz o tejido de plantas de maíz que contiene el evento MON 95379.

[61] Una muestra pretende hacer referencia a una composición que es ADN de maíz sustancialmente puro o una composición que contiene ADN de maíz. En ambos casos, la muestra es una muestra biológica, es decir, contiene materiales biológicos que incluyen, de modo no taxativo, ADN obtenido o derivado, directa o indirectamente, del genoma del evento de maíz MON 95379. «Directamente» hace referencia a la capacidad del experto en la técnica de obtener ADN directamente del genoma de maíz mediante la fractura de células de maíz (o mediante la obtención de muestras de maíz que contienen células de maíz fracturadas) y la exposición del ADN genómico a los efectos de la detección. «Indirectamente» hace referencia a la capacidad del experto en la técnica de obtener el ADN diana o de referencia específica, es decir, un segmento de unión novedoso y único descrito en la presente como un diagnóstico para determinar la presencia del evento MON 95379 en una muestra específica, por medios distintos a la obtención directa a través de la fractura de células de maíz o la obtención de una muestra de maíz que contiene células de maíz fracturadas. Dichos medios indirectos incluyen, de modo no taxativo, la amplificación de un segmento de ADN que contiene la secuencia de ADN que una sonda específica selecciona como diana, diseñada para unirse con especificidad a la secuencia diana, o la amplificación de un segmento de ADN que se puede medir y caracterizar, es decir, medir mediante la separación de otros segmentos de ADN a través de alguna matriz eficiente como un gel de agarosa o acrilamida o similar, o caracterizar mediante análisis de secuencia directo de los amplicones o clonación del amplicón en un vector y secuenciación directa del amplicón insertado presente dentro de dicho vector.

[62] El análisis molecular detallado demostró que el evento MON 95379 contiene una

sola inserción de ADN-T con una copia de cada uno de los casetes de expresión Cry1B.868 y Cry1Da_7. No se han identificado elementos adicionales de la construcción de transformación más que las partes de las regiones del límite izquierdo de *Agrobacterium tumefaciens* utilizadas para la transferencia del ADN transgénico del plásmido de transformación de la planta al genoma de maíz en el evento MON 95379. Por último, se llevaron a cabo la amplificación térmica que produce amplicones específicos que son un diagnóstico para determinar la presencia del evento MON 95379 en una muestra y análisis de las secuencias de ADN para determinar las uniones del genoma inserto a planta 5' y 3' designadas de forma arbitraria, confirmar la organización de los elementos dentro del inserto, y determinar la secuencia de ADN completa del ADN transgénico insertado (SEQ ID NO:9). La SEQ ID NO:11 es una secuencia que representa la secuencia de ADN genómico de maíz LH244 5' de 862 (ochocientos sesenta y dos) pares base (pb) que flanquea la secuencia de ADN-T insertada que se presenta como la SEQ ID NO:9. La SEQ ID NO:12 es una secuencia que representa la secuencia de ADN genómico de maíz LH244 3' de 1036 (mil treinta y seis) pb que flanquea la secuencia de ADN-T insertada que se presenta como la SEQ ID NO:9. La SEQ ID NO:7 es una secuencia que representa la secuencia de ADN genómico de maíz LH244 5' de 862 (ochocientos sesenta y dos) pares base (pb) que flanquea la secuencia de ADN-T insertada que se combina con 298 (doscientos noventa y ocho) pb de la secuencia de ADN-T insertada que se presenta como la SEQ ID NO:9. La SEQ ID NO:8 es una secuencia que representa 142 (ciento cuarenta y dos) pb de la secuencia de ADN-T insertada con la secuencia de ADN genómico de maíz LH244 3' de 1036 (mil treinta y seis) pb que flanquea la secuencia de ADN-T insertada que se presenta como la SEQ ID NO:9. La SEQ ID NO:10 corresponde al evento de maíz MON 95379 y contiene una secuencia contigua (contig) que comprende la secuencia flanqueante LH244 5', el inserto de transgén del evento MON 95379 y la secuencia flanqueante LH244 3' y, por lo tanto, contiene las secuencias de unión al genoma de inserto a planta.

[63] Salvo que se indique de otra manera en la presente, los términos se entenderán de acuerdo con el uso convencional que le dan los expertos en la técnica pertinente. Las definiciones de los términos comunes en la biología molecular también se pueden encontrar en Rieger et ál., *Glossary of Genetics: Classical and Molecular*, 5.^a edición, Springer-Verlag: Nueva York, 1991; y Lewin, *Genes V*, Oxford University Press: Nueva York, 1994, junto con otras fuentes que son del conocimiento de los expertos en la técnica. Tal como se usa en la presente, el término «maíz» significa muchas especies que

pertenecen al género *Zea*, preferentemente, *Zea mays*, e incluye todas las variedades de plantas que se pueden reproducir con las plantas de maíz que contienen el evento MON 95379, las que incluyen especies silvestres de maíz, así como las plantas que pertenecen al género *Zea* que permiten el fitomejoramiento entre especies.

5 [64] La presente invención proporciona plantas transgénicas que han sido transformadas con una construcción de ADN que contiene casetes de expresión que expresan cantidades tóxicas de las proteínas insecticidas Cry1B.868 y Cry1Da_7. Por cantidad tóxica se entiende una cantidad eficaz, una cantidad insecticida, una cantidad insecticida eficaz, una cantidad supresora del insecto diana, una cantidad pesticida eficaz,
10 una cantidad en la dieta de los insectos en el orden de los lepidópteros que es insecticida y otros términos similares que se deberán entender de acuerdo con el uso convencional que le dan los expertos en la técnica pertinente. Las plantas de maíz transformadas de acuerdo con los métodos y con la construcción de ADN descrita en la presente son resistentes a las plagas de insectos lepidópteros.

15 [65] Una «planta» transgénica se produce mediante la transformación de una célula vegetal con ADN heterólogo, es decir, una construcción de ácido polinucleico que incluye diversas características de interés eficaces; la regeneración de una planta que resulta de la inserción del transgén en el genoma de la célula vegetal y la selección de una planta específica caracterizada por la inserción en una ubicación del genoma particular y la
20 cantidad de características eficaces de la planta transgénica regenerada. El término «evento» hace referencia al ADN del transformante original que comprende el ADN insertado y que flanquea las secuencias genómicas inmediatamente adyacentes al ADN insertado. Dicho ADN es exclusivo y se esperaría que se transfiera a una progenie que recibe el ADN insertado, lo que incluye el transgén de interés como resultado de un
25 cruzamiento sexual de una línea progenitora que incluye el ADN insertado (por ejemplo, el transformante original y la progenie resultantes de la autofertilización) y una línea progenitora que no contiene el ADN insertado. La presente invención también proporciona la planta transformante original y la progenie del transformante que incluye el ADN heterólogo. Dicha progenie se puede producir por un cruzamiento sexual entre plantas
30 que comprenden el evento y otra planta en la cual la progenie incluye el ADN heterólogo. Incluso después del retrocruzamiento repetido con un padre recurrente, el evento está presente en la progenie del cruce en la misma ubicación cromosómica.

[66] Tal como se usa en la presente, el término «recombinante» hace referencia a un ADN, proteína u organismo no natural, que no se encontraría en la naturaleza

normalmente y fue creado mediante intervención humana. Una «molécula de ADN recombinante» es una molécula de ADN que comprende una combinación de moléculas de ADN que no aparecerían juntas de forma natural y es el resultado de la intervención humana. Por ejemplo, una molécula de ADN que está conformada por una combinación

5 de al menos dos moléculas de ADN heterólogas entre sí, tal como una molécula de ADN que comprende un transgén y el ADN genómico de la planta adyacente al transgén, es una molécula de ADN recombinante.

[67] Las expresiones «ADN» y «molécula de ADN» hacen referencia en la presente a una molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN). Una molécula de ADN puede ser de

10 origen genómico o sintético, y es por convención del extremo 5' (anterior) al extremo 3' (posterior). Tal como se usa en la presente, la expresión «secuencia de ADN» hace referencia a la secuencia de nucleótidos de la molécula de ADN. Por convención, las secuencias de ADN de la invención y sus fragmentos se describen con referencia a solo una cadena de las dos cadenas de secuencias de ADN complementarias. Se pretende

15 que las secuencias de complementariedad de las secuencias proporcionadas en la presente (las secuencias de la cadena complementaria), también denominadas en la técnica como secuencias de complementariedad inversas, se encuentren dentro del alcance de la invención y se pretende expresamente que se encuentren dentro del alcance de la materia reivindicada.

[68] Tal como se usa en la presente, el término «fragmento» hace referencia a una

20 parte más pequeña de la totalidad. Por ejemplo, los fragmentos de la SEQ ID NO:10 incluirían secuencias que tienen al menos alrededor de 12 nucleótidos consecutivos, al menos alrededor de 13 nucleótidos consecutivos, al menos alrededor de 14 nucleótidos consecutivos, al menos alrededor de 15 nucleótidos consecutivos, al menos alrededor de

25 16 nucleótidos consecutivos, al menos alrededor de 17 nucleótidos consecutivos, al menos alrededor de 18 nucleótidos consecutivos, al menos alrededor de 19 nucleótidos consecutivos, al menos alrededor de 20 nucleótidos consecutivos, al menos alrededor de 25 nucleótidos consecutivos, al menos alrededor de 30 nucleótidos consecutivos, al menos alrededor de 35 nucleótidos consecutivos, al menos alrededor de 40 nucleótidos

30 consecutivos, al menos alrededor de 45 nucleótidos consecutivos, al menos alrededor de 50 nucleótidos consecutivos, al menos alrededor de 60 nucleótidos consecutivos, al menos alrededor de 70 nucleótidos consecutivos, al menos alrededor de 80 nucleótidos consecutivos, al menos alrededor de 90 nucleótidos consecutivos, o al menos alrededor de 100 nucleótidos consecutivos de la secuencia completa de la SEQ ID NO:10.

[69] Se pretende que la referencia en la presente solicitud a una «molécula aislada de ADN», o una frase o término equivalente, signifique que la molécula de ADN está presente sola o en combinación con otras composiciones, pero no está en su entorno natural. Por ejemplo, los elementos de ácido nucleico, tales como una secuencia de codificación, una secuencia de intrones, una secuencia líder no traducida, una secuencia promotora, una secuencia de terminación de transcripción y similares, las que se encuentran naturalmente dentro del ADN del genoma de un organismo no se consideran «aisladas», siempre y cuando el elemento esté dentro del genoma del organismo y en la ubicación dentro del genoma en el que se encuentra naturalmente. Sin embargo, cada uno de estos elementos y subpartes de estos elementos podrían estar «aislados» dentro del alcance de la descripción, siempre que el elemento no esté dentro del genoma del organismo ni en la ubicación dentro del genoma en la cual se encuentra naturalmente. De manera similar, una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína insecticida o cualquier variante insecticida de origen natural de la proteína podría ser una secuencia de nucleótidos aislada siempre que la secuencia de nucleótidos no esté dentro del ADN de la bacteria en la cual la secuencia que codifica la proteína se encuentra naturalmente. Una secuencia sintética de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína insecticida de origen natural se podría considerar aislada a los fines de la presente descripción. A los fines de la presente descripción, cualquier secuencia transgénica de nucleótidos, es decir, la secuencia de nucleótidos del ADN insertado en el genoma de las células de una planta o bacteria, o presente en un vector extracromosómico, se podría considerar una secuencia aislada de nucleótidos ya sea que esté presente dentro del plásmido o estructura similar usada para transformar la célula, dentro del genoma de la planta o bacteria, o presente en cantidades detectables en tejidos, progenie, muestras biológicas o productos básicos derivados de la planta o bacteria. En cualquier circunstancia, la molécula de ADN aislada es una molécula química, independientemente de si se hace referencia a esta como un ácido nucleico, una secuencia de ácido nucleico, una secuencia de polinucleótidos y similares. Es una molécula novedosa e inventiva que exhibe aplicabilidad industrial tanto cuando está presente en una célula vegetal o en un genoma de la planta como cuando está presente fuera de una célula vegetal y, por lo tanto, exhibe y pretende exhibir dicha utilidad independientemente de dónde se esté ubicada la molécula.

[70] Se hace referencia a la secuencia de ADN de la región que abarca la conexión mediante un enlace de unión de fosfodiéster de un extremo del inserto transgénico con el

ADN genómico de maíz flanqueante como una «unión». Una unión es el punto de conexión de la inserción transgénica y el ADN flanqueante como una molécula contigua. Una unión está en el extremo 5' de la inserción transgénica y la otra se encuentra en el extremo 3' de la inserción transgénica, denominadas en la presente unión 5' y 3',
 5 respectivamente. Una «secuencia de unión» hace referencia a una secuencia de ADN de cualquier longitud que abarca la unión 5' o 3' de un evento. Las secuencias de unión del evento de maíz MON 95379 son evidentes para un experto en la técnica mediante el uso de la SEQ ID NO:10. Los ejemplos de secuencias de unión del evento MON 95379 se proporcionan como las SEQ ID NO:1-8. La Figura 1 ilustra la disposición física de las
 10 secuencias de unión, dispuestas de 5' a 3', con respecto a la SEQ ID NO:10. Las secuencias de unión del evento MON 95379 pueden estar presentes como parte del genoma de una planta, semilla o célula que contiene el evento MON 95379. La identificación de cualesquiera una o más de las secuencias de unión en una muestra de una planta, parte de la planta, semilla o célula indica que el ADN se obtuvo de maíz que
 15 contenía el evento de maíz MON 95379 y es diagnóstico para determinar la presencia del evento MON 95379.

[71] Las secuencias de unión para el evento MON 95379 se pueden representar con una secuencia del grupo que consiste en la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8 y SEQ ID NO:10.
 20 Por ejemplo, las secuencias de unión se pueden representar arbitrariamente con las secuencias de nucleótidos proporcionadas como SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2. Alternativamente, las secuencias de unión se pueden representar arbitrariamente con las secuencias de nucleótidos proporcionadas como SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:4. Alternativamente, las secuencias de unión se pueden representar arbitrariamente con las
 25 secuencias de nucleótidos proporcionadas como SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6. Alternativamente, las secuencias de unión se pueden representar arbitrariamente con las secuencias de nucleótidos proporcionadas como SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:8. Estos nucleótidos se conectan mediante enlace fosfodiéster y están presentes en el evento de maíz MON 95379 como parte del genoma de una célula de una planta recombinante.

30 [72] La identificación de una o más de la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8 y SEQ ID NO:10 en una muestra derivada de una planta de maíz, semilla de algodón o parte de una planta de maíz es diagnóstico de que el ADN se obtuvo a partir del evento de maíz MON 95379. Por lo tanto, la invención proporciona una molécula de ADN que contiene al menos una

de las secuencias de nucleótidos proporcionadas como la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10. Cualquier segmento de ADN derivado del evento de maíz transgénico MON 95379 que es suficiente para incluir al menos una de las secuencias proporcionadas como la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10 está comprendido por el alcance de la invención. Adicionalmente, cualquier polinucleótido que comprende una secuencia complementaria a cualquiera de las secuencias descritas en este párrafo se encuentra comprendido por el alcance de la invención.

5 [73] La invención proporciona ejemplos de moléculas de ADN que se pueden utilizar ya sea como cebadores o como sondas para detectar la presencia de ADN derivado de una planta de maíz que comprende el ADN del evento MON 95379 en una muestra. Dichos cebadores o sondas son específicos para una secuencia de ácido nucleico diana y como tales son útiles para la identificación de la secuencia de ácido nucleico del evento de maíz
15 MON 95379 mediante los métodos de la invención descritos en la presente.

[74] Una «sonda» es una molécula de ácido nucleico que es complementaria a una cadena del ácido nucleico diana y es útil en métodos de hibridación. Una sonda puede estar unida a una molécula señalizadora o indicadora detectable convencional, por ejemplo, un isótopo radiactivo, un ligando, un agente quimioluminiscente o una enzima.
20 Dicha sonda es complementaria a una cadena de un ácido nucleico diana y, en el caso de la presente invención, a una cadena de ADN del evento MON 95379, ya sea de una planta que contiene el evento MON 95379 o de una muestra que incluye ADN del evento MON 95379. Las sondas de acuerdo con la presente invención no incluyen solamente ácidos desoxirribonucleico o ribonucleico, sino que también incluyen poliamidas y otros
25 materiales de sonda que se unen específicamente a una secuencia de ADN diana y que se pueden utilizar para detectar la presencia de esa secuencia de ADN diana. Se proveen ejemplos de secuencias de ADN útiles como una sonda para detectar el evento de maíz MON 95379 como: SEQ ID NO:17 (PB10269), SEQ ID NO:23 (PB50340); SEQ ID NO:26 (PB50138).

30 [75] Un «cebador» suele ser una molécula de ADN que está diseñada para su uso en métodos específicos de apareamiento o hibridación que comprenden la amplificación térmica. Un par de cebadores se puede utilizar con ADN de plantilla (tal como una muestra de ADN genómico de maíz) en una amplificación térmica (tal como reacción en cadena de la polimerasa (PCR)) para producir un amplicón, donde el amplicón producido

a partir de dicha reacción tendría una secuencia de ADN correspondiente a la secuencia del ADN de plantilla ubicada entre los dos sitios donde los cebadores se hibridaron a la plantilla.

[76] Se suele diseñar un cebador para hibridarse a una cadena de ADN diana complementaria con el fin de formar un híbrido entre el cebador y la cadena de ADN diana y la presencia del cebador es un punto de reconocimiento por parte de una polimerasa para iniciar la extensión del cebador (es decir, polimerización de nucleótidos adicionales en una molécula de nucleótido de alargamiento) con la cadena de ADN diana como plantilla. Los pares de cebadores hacen referencia al uso de dos cebadores que unen cadenas opuestas de un segmento de nucleótido de cadena doble a fin de amplificar linealmente el segmento de polinucleótido entre las posiciones seleccionadas como diana para la unión por parte de los miembros individuales del par de cebadores, típicamente en una reacción de amplificación térmica u otros métodos de amplificación de ácido nucleico convencionales. Los ejemplos de moléculas de ADN útiles como cebadores se proveen como SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25 y SEQ ID NO:27.

[77] El par de cebadores, SEQ ID NO:15 y SEQ ID NO:16, son útiles como una primera molécula de ADN y una segunda molécula de ADN que es distinta a la primera molécula de ADN y ambas son de longitud suficiente de nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:10 para funcionar como cebadores de ADN que, cuando se utilizan juntos en una reacción de amplificación térmica con el ADN de plantilla derivado del evento de maíz MON 95379, producen un amplicón de diagnóstico para el ADN del evento de maíz MON 95379 en una muestra. El par de cebadores, SEQ ID NO:21 y SEQ ID NO:22, son útiles como una primera molécula de ADN y una segunda molécula de ADN que es distinta a la primera molécula de ADN y ambas son de longitud suficiente de nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:10 para funcionar como cebadores de ADN que, cuando se utilizan juntos en una reacción de amplificación térmica con el ADN de plantilla derivado del evento de maíz MON 95379, producen un amplicón de diagnóstico para determinar la cigosidad del ADN del evento de maíz MON 95379 en una muestra. El par de cebadores, SEQ ID NO:24 y SEQ ID NO:25, son útiles como una primera molécula de ADN y una segunda molécula de ADN que es distinta a la primera molécula de ADN y ambas son de longitud suficiente de nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:10 para funcionar como cebadores de ADN que, cuando se utilizan juntos en una reacción de amplificación térmica con el ADN de plantilla derivado del evento de maíz MON 95379, producen un amplicón de diagnóstico para

determinar la cigosidad del ADN del evento de maíz MON 95379 en una muestra. El par de cebadores, SEQ ID NO:18 y SEQ ID NO:19, son útiles como una primera molécula de ADN y una segunda molécula de ADN que es distinta a la primera molécula de ADN y ambas son de longitud suficiente de nucleótidos contiguos de un locus dentro del genoma de maíz para funcionar como cebadores de ADN que, cuando se utilizan juntos en una reacción de amplificación térmica con el ADN de plantilla derivado del evento de maíz MON 95379, producen un amplicón que funciona como un control interno tanto para el diagnóstico del evento de maíz MON 95379 como para la cigosidad del ADN del evento de maíz MON 95379 en una muestra.

[78] Las sondas de ADN y los cebadores de ADN generalmente tienen 11 (once) polinucleótidos o más de longitud, generalmente 18 (dieciocho) polinucleótidos o más, 24 (veinticuatro) polinucleótidos o más o 30 (treinta) polinucleótidos o más. Se seleccionan dichas sondas y cebadores de una longitud suficiente para hibridar específicamente con una secuencia diana en condiciones de hibridación de rigurosidad alta. Preferentemente, las sondas y los cebadores de acuerdo con la presente invención tienen similitud de secuencia completa con la secuencia diana, aunque se pueden diseñar, a través de métodos convencionales, sondas que difieren de la secuencia diana que mantiene la capacidad de hibridarse con secuencias diana.

[79] Las sondas y los cebadores de ácido nucleico de la presente invención hibridan en condiciones rigurosas con una molécula de ADN diana. Se puede utilizar cualquier método convencional de hibridación o amplificación de ácido nucleico para identificar la presencia de ADN de una planta transgénica en una muestra. Las moléculas de ácidos polinucleicos también denominadas segmentos o fragmentos de ácidos nucleicos de estas son capaces de hibridar específicamente con otras moléculas de ácidos nucleicos en determinadas circunstancias.

[80] Según se emplea aquí, se dice que dos moléculas de ácido polinucleico pueden hibridarse específicamente entre sí si las dos moléculas pueden formar una estructura de ácido nucleico antiparalela, de doble cadena. Se dice que una molécula de ácido nucleico es el «complemento» de otra molécula de ácido nucleico si exhibe una complementariedad completa. Tal como se usa en la presente, se dice que las moléculas exhiben «complementariedad completa» cuando cada nucleótido de una de las moléculas es complementario de un nucleótido de la otra. Se dice que dos moléculas son «mínimamente complementarias» si se pueden hibridar entre sí con suficiente estabilidad para permitir que permanezcan apareadas entre sí en al menos condiciones de rigor bajo

convencionales. De forma similar, se dice que las moléculas son «complementarias» si se pueden hibridar entre sí con suficiente estabilidad para permitir que permanezcan apareadas entre sí en condiciones de rigor alto convencionales. Las condiciones de rigurosidad convencionales se describen en Sambrook *et ál.*, 1989, y en Haymes *et ál.*,
5 en: *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, DC (1985). Por lo tanto, puede permitirse el alejamiento de la complementariedad completa, siempre que dicho alejamiento no impida completamente la capacidad de las moléculas para formar una estructura de doble cadena. Para que una molécula de ácido nucleico sirva como cebador o sonda, solamente es necesario que su secuencia sea lo suficientemente
10 complementaria para poder formar una estructura estable de doble cadena en la concentración de sal y solvente particulares que se empleen.

[81] Según se emplea aquí, una secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia de ácidos nucleicos que se hibridará específicamente con el complemento de la secuencia de ácidos nucleicos con la cual se está comparando en condiciones de
15 rigurosidad alta. Las condiciones de rigurosidad adecuadas que promueven la hibridación del ADN, por ejemplo, 6,0 x cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45 °C, seguido de un lavado de 2,0 x SSC a 50 °C, son conocidas para los entendidos en la técnica o se pueden encontrar en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Por ejemplo, la concentración de sal en la etapa de lavado
20 puede ser seleccionada de una baja rigurosidad de alrededor de 2,0 x SSC a 50 °C a una rigurosidad elevada de alrededor de 0,2 x SSC a 50 °C. De manera adicional, la temperatura de la etapa de lavado puede aumentar de las condiciones de baja rigurosidad a temperatura ambiente, alrededor de 22 °C, a condiciones de rigurosidad elevada a alrededor de 65 °C. Es posible variar tanto la temperatura como la sal, o ya sea la
25 temperatura o la concentración de sal pueden mantenerse constantes al tiempo que se cambia la otra variable. En una modalidad preferida, un ácido polinucleico de la presente invención se hibridará específicamente a una o más de las moléculas de ácido nucleico establecidas en la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:10, o
30 complementos de estas o fragmentos de estas en condiciones moderadamente rigurosas, por ejemplo, a alrededor de 2,0 x SSC y alrededor de 65 °C. En una modalidad particularmente preferida, un ácido nucleico de la presente invención se hibridará específicamente a una o más de las moléculas de ácido nucleico establecidas en la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ

ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:10, o complementos o fragmentos de estas en condiciones de rigurosidad elevada. En un aspecto de la presente invención, una molécula de ácido nucleico marcadora preferida de la presente invención tiene la secuencia de ácidos nucleicos establecida en la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:10, o complementos de estas o fragmentos de estas. Se puede detectar la hibridación de la sonda con la molécula de ADN diana mediante cualquier cantidad de métodos conocidos para los expertos en la técnica, estos pueden incluir, entre otros, etiquetas fluorescentes, etiquetas radioactivas, etiquetas basadas en anticuerpos y etiquetas quimioluminiscentes.

[82] Con relación a la amplificación de una secuencia de ácidos nucleicos diana (por ejemplo, mediante PCR) con un par de cebadores de amplificación específicos, las «condiciones de rigurosidad» son condiciones que permiten que el par de cebadores se hibride únicamente a la secuencia de ácidos nucleicos diana con la cual se uniría un cebador que tuviera la secuencia de tipo salvaje correspondiente (o su complemento) y, preferentemente, para producir un producto de amplificación exclusivo, el amplicón, en una reacción de amplificación térmica de ADN.

[83] La expresión «específico para (una secuencia diana)» indica que una sonda o un cebador se hibrida en condiciones de hibridación rigurosas solo con la secuencia diana en una muestra que comprende la secuencia diana.

[84] Tal como se usa en la presente, «ADN amplificado» o «amplicón» hace referencia al producto del método de amplificación del ácido polinucleico dirigido a una molécula de ácidos polinucleicos diana que forma parte de una plantilla de ácidos polinucleicos. Por ejemplo, para determinar si una planta de maíz derivada de un cruzamiento sexual contiene ADN genómico de planta transgénica de una planta de maíz que comprende el evento MON 95379 de la presente invención, el ADN que se extrae de una muestra de tejido de planta de maíz se puede someter a un método de amplificación de ácidos polinucleicos con un par de cebadores que incluye un primer cebador derivado de una secuencia de ADN genómico en la región flanqueante del ADN heterólogo insertado del evento MON 95379 y se alarga mediante la polimerasa 5' a 3' en la dirección del ADN insertado. El segundo cebador, que se deriva de la molécula de ADN heterólogo insertado, se elonga por la polimerasa 5' a 3' en la dirección del ADN genómico flanqueante desde el cual se deriva el primer cebador. El amplicón puede oscilar en longitud desde la longitud combinada del par de cebadores más un par de bases de

nucleótidos o más aproximadamente cincuenta pares de bases de nucleótidos, o más aproximadamente doscientos cincuenta pares de bases de nucleótidos, o más aproximadamente cuatrocientos cincuenta pares de bases de nucleótidos o más. Alternativamente, se puede derivar un par de cebadores de la secuencia genómica a
5 ambos lados del ADN heterólogo insertado de modo de producir un amplicón que incluya la secuencia de polinucleótidos del inserto completa (por ejemplo, un cebador directo aislado de la parte genómica en el extremo 5' de la SEQ ID NO:10 y un cebador inverso aislado de la parte genómica en el extremo 3' de la SEQ ID NO:10 que amplifica una molécula de ADN que comprende la secuencia de ADN insertado (SEQ ID NO:9) que se
10 identifica en la presente en el genoma del evento MON 95379). Un miembro de un par de cebadores derivado de la secuencia genómica de la planta adyacente al ADN transgénico insertado se ubica a una distancia de la secuencia de ADN insertada, esta distancia puede oscilar entre un par de bases de nucleótidos y aproximadamente veinte mil pares de bases de nucleótidos. El uso del término «amplicón» excluye específicamente los
15 dímeros de cebadores que se pueden formar en la reacción de amplificación térmica del ADN.

[85] A fines prácticos, se debería diseñar cebadores que producen amplicones dentro de un intervalo de tamaño limitado, por ejemplo, entre 100 y 1000 bases. En general, los amplicones de tamaño más pequeño (longitud de polinucleótidos más corta) se producen
20 de forma más confiable en las reacciones de amplificación térmica, permiten tiempos de ciclo más cortos y se pueden separar y visualizar fácilmente sobre los geles de agarosa o adaptar para el uso en ensayos de criterios de valoración tipo TAQMAN®. Se pueden producir y detectar amplicones más pequeños a través de los métodos conocidos en la técnica de la detección de amplicones de ADN. Además, los amplicones producidos con
25 los pares de cebadores se pueden clonar en vectores, propagar, aislar y secuenciar o se pueden secuenciar directamente con los métodos establecidos en la técnica. Cualquier par de cebadores derivado de la combinación de la SEQ ID NO:11 y la SEQ ID NO:9 o la combinación de la SEQ ID NO:12 y la SEQ ID NO:9 que son útiles en un método de amplificación de ADN para producir un amplicón de diagnóstico para el evento MON
30 95379 o su progenie es un aspecto de la invención. Cualquier molécula de cebador de polinucleótidos de ADN aislada única que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:11 o su complemento, que es útil en un método de amplificación de ADN para producir un amplicón de diagnóstico para el evento MON 95379 o su progenie es un aspecto de la invención. Cualquier molécula de cebador de polinucleótidos de ADN

aislada única que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:12 o su complemento, que es útil en un método de amplificación de ADN para producir un amplicón de diagnóstico para las plantas que comprenden el evento MON 95379 o su progenie es un aspecto de la invención. Cualquier molécula de cebador de polinucleótidos de ADN aislada única que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:9 o su complemento, que es útil en un método de amplificación de ADN para producir un amplicón de diagnóstico para el evento MON 95379 o su progenie es un aspecto de la invención.

[86] La amplificación de ácido polinucleico se puede lograr mediante cualquiera de los diversos métodos de amplificación de ácido polinucleico conocidos en la técnica, incluso la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los métodos de amplificación son conocidos en la técnica y se describen, entre otros, en las patentes estadounidenses n.º 4 683 195 y 4 683 202 y en *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, ed. Innis y col., Academic Press, San Diego, 1990. Se han desarrollado métodos de amplificación por PCR para amplificar hasta 22 kb (kilobases) de ADN genómico y hasta 42 kb de ADN bacteriófago (Cheng et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:5695-5699, 1994). Estos métodos, así como otros métodos conocidos en la técnica de la amplificación del ADN, se pueden utilizar en la práctica de la presente invención. Se puede verificar (y corregir, de ser necesario) la secuencia del inserto de ADN heterólogo o la secuencia de ADN genómico flanqueante del evento de maíz MON 95379 mediante la amplificación de dichas moléculas de ADN de las semillas de maíz que contienen ADN del evento MON 95379 o de plantas de maíz cultivadas a partir de las semillas de maíz que contienen ADN del evento MON 95379 depositado en la ATCC con el número de acceso PTA-125027, la utilización de cebadores derivados de las secuencias proporcionadas en el presente, seguido del secuenciamiento del ADN estándar del amplicón de PCR o sus fragmentos de ADN clonados.

[87] Se puede detectar el amplicón de diagnóstico producido por estos métodos a través de diversas técnicas. Uno de estos métodos es Genetic Bit Analysis (Nikiforov, et ál. *Nucleic Acid Res.* 22:4167-4175, 1994) en donde se diseña un oligonucleótido de ADN que se superpone con la secuencia de ADN genómico flanqueante adyacente y la secuencia de ADN insertada. Se inmoviliza el oligonucleótido en los pocillos de una placa de microvaloración. Después de la PCR de la región de interés (mediante el uso de un cebador en la secuencia insertada y uno en la secuencia genómica flanqueante adyacente), se puede hibridar un producto de PCR de cadena única al oligonucleótido

inmovilizado y actuar como una plantilla para una reacción de extensión de base única con una polimerasa de ADN y trifosfatos de didesoxinucleótidos (ddNTP) marcados específicos para la siguiente base esperada. La lectura puede ser fluorescente o basada en ELISA. Una señal indica la presencia de la secuencia genómica/transgén debido a la
5 amplificación, hibridación y extensión de base única exitosas.

[88] Otro método es la técnica de pirosecuenciación según la describió Winge (Innov. Pharma. Tech. 00:18-24, 2000). En este método se diseña un oligonucleótido que superpone la unión de ADN genómico adyacente y ADN de inserción. Se hibrida el oligonucleótido al producto de PCR de cadena única de la región de interés (un cebador
10 en la secuencia insertada y uno en la secuencia genómica flanqueante) y se incuba en presencia de una polimerasa de ADN, ATP, sulfúrilasa, luciferasa, apirasa, adenosina 5' fosfosulfato y luciferina. Se añaden los DNTP individualmente y la incorporación da como resultado una señal luminosa que se mide. Una señal luminosa indica la presencia de la secuencia genómica/transgén debido a la amplificación, hibridación y extensión de base
15 única o de varias bases exitosas.

[89] La polarización de fluorescencia según la describe Chen y et ál., (*Genome Res.* 9:492-498, 1999) es un método que se puede utilizar para detectar el amplicón de la presente invención. Utilizando este método, se diseña un oligonucleótido que superpone la unión del ADN insertado y flanqueante genómico. Se hibrida el oligonucleótido con el
20 producto de PCR de cadena única de la región de interés (un cebador en el ADN insertado y uno en la secuencia de ADN genómico flanqueante) y se incuba en presencia de una polimerasa de ADN y un ddNTP marcado con fluorescencia. La extensión de una sola base da como resultado la incorporación de ddNTP. Se puede medir la incorporación como un cambio en la polarización con un fluorómetro. Un cambio en la polarización
25 indica la presencia de la secuencia genómica/transgén debido a la amplificación exitosa, hibridación y extensión de base única.

[90] La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real es la capacidad de monitorear el avance de la PCR a medida que tiene lugar (es decir, en tiempo real). Los datos recopilados durante el proceso de PCR, en lugar de ser al final de la PCR. En la
30 PCR en tiempo real, las reacciones se caracterizan por el momento durante el ciclado en que primero se detecta la amplificación de una diana en lugar de la cantidad de diana acumulada luego de un número fijo de ciclos. En un ensayo de PCR en tiempo real, se detecta una reacción positiva mediante acumulación de una señal fluorescente. Cuanto mayor sea el número de copias de partida de la diana de ácido nucleico, más rápido se

observará un aumento significativo en fluorescencia. El umbral del ciclo (valor de Ct) se define como el número de ciclos necesario para que la señal fluorescente cruce el umbral (es decir, exceda el nivel de referencia). Los niveles Ct son inversamente proporcionales a la cantidad de ácido nucleico diana en la muestra (es decir, cuanto menor sea el valor de Ct, mayor es la cantidad de ácido nucleico diana en la muestra).

[91] Taqman® (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) se describe como un método para detectar y cuantificar la presencia de una secuencia de ADN que usa la PCR en tiempo real y está totalmente comprendida en las instrucciones proporcionadas por el fabricante. En resumen, se diseña una sonda de oligonucleótidos FRET que superpone la unión del ADN del inserto y flanqueante genómico. La sonda FRET y los cebadores de PCR (un cebador en la secuencia del ADN del inserto y uno en la secuencia genómica flanqueante) se someten a ciclos en presencia de una polimerasa termoestable y dNTP. La hibridación de la sonda FRET da como resultado la escisión y liberación del resto fluorescente lejos del resto de inactivación en la sonda FRET. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia genómica/transgén debido a amplificación e hibridación exitosas.

[92] Se han descrito balizas moleculares para su uso en la detección de secuencias, tal como lo describe Tyangi et ál. (Nature Biotech.14:303-308, 1996). En resumen, se diseña una sonda de oligonucleótidos FRET que superpone la unión del ADN del inserto y genómico flanqueante. La estructura única de la sonda FRET da como resultado que contenga una estructura secundaria que mantiene los restos fluorescentes y de inactivación cerca. La sonda FRET y los cebadores de PCR (un cebador en la secuencia del ADN del inserto y uno en la secuencia genómica flanqueante) se someten a ciclos en presencia de una polimerasa termoestable y dNTP. Después de la amplificación por PCR exitosa, la hibridación de la sonda FRET con la secuencia diana da como resultado la remoción de la estructura secundaria de la sonda y de la separación espacial de las fracciones fluorescente y extintora. Una señal fluorescente resulta de esto. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia del inserto flanqueante/transgénica debido a una amplificación e hibridación exitosas.

[93] Los kits de detección de ADN que se basan en los métodos de amplificación del ADN contienen moléculas de cebadores de ADN que se hibridan específicamente con un ADN diana y amplifican un amplicón de diagnóstico en condiciones de reacción adecuadas. El kit puede proporcionar un método de detección basado en gel agarosa o cualquier cantidad de métodos para detectar el amplicón de diagnóstico que se conocen

en la técnica. Se pueden desarrollar kits de detección de ADN mediante las composiciones descritas en la presente y son útiles para la identificación del ADN del evento de maíz MON 95379 en una muestra y se pueden aplicar a los métodos para el fitomejoramiento de las plantas de maíz que contienen el ADN del evento MON 95379. Un
5 kit que contiene cebadores de ADN que son homólogos o complementarios a cualquier parte de la región genómica de maíz, tal como se establece en la SEQ ID NO:10 y a cualquier parte del ADN transgénico insertado, tal como se establece en la SEQ ID NO:10 es un objeto de la invención. Se pueden utilizar las moléculas de ADN en métodos de amplificación del ADN (PCR) o como sondas en los métodos de hibridación de ácido
10 polinucleico, es decir, análisis southern y análisis northern. Los kits de la invención también pueden comprender opcionalmente reactivos o instrucciones para realizar las reacciones de detección o diagnóstico descritas en la presente.

[94] Las sondas y los cebadores de acuerdo con la presente invención pueden tener similitud de secuencia completa con la secuencia diana, aunque se pueden diseñar, a
15 través de métodos convencionales, cebadores y sondas que difieran de la secuencia diana que conserven la capacidad de hibridarse preferentemente con secuencias diana. Para que una molécula de ácido nucleico sirva como cebador o sonda, solamente es necesario que su secuencia sea lo suficientemente complementaria para poder formar una estructura estable de doble cadena en la concentración de sal y solvente particulares
20 que se empleen. Se puede utilizar cualquier método convencional de hibridación o amplificación de ácido nucleico para identificar la presencia de ADN transgénico del evento de maíz MON 95379 en una muestra. Las sondas y los cebadores, por lo general, tienen una longitud de al menos alrededor de 11 nucleótidos, de al menos alrededor de 18 nucleótidos, de al menos alrededor de 24 nucleótidos o de al menos alrededor de 30
25 nucleótidos o más. Dichas sondas y cebadores se hibridan específicamente a una secuencia de ADN diana en condiciones rigurosas de hibridación. Las condiciones de rigurosidad convencionales se describen en Sambrook et ál., 1989, y en Haymes et ál., en: *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, DC (1985).

[95] Se puede utilizar cualquier cantidad de métodos conocidos para los expertos en la
30 técnica para aislar y manipular una molécula de ADN, o fragmento de esta, divulgados en la invención, incluso métodos de amplificación térmica. Las moléculas de ADN, o fragmentos de estas, también se pueden obtener a través de otras técnicas, por ejemplo, mediante la síntesis directa del fragmento por medios químicos, como se practica comúnmente mediante el uso de un sintetizador oligonucleótido automático.

[96] Por lo tanto, las moléculas de ADN y las secuencias de nucleótidos correspondientes proporcionadas en la presente son útiles, entre otras cosas, para identificar el evento de maíz MON 95379, detectar la presencia de ADN derivado del evento de maíz transgénico MON 95379 en una muestra, y monitorear las muestras para determinar la presencia y/o ausencia del evento de maíz MON 95379 o partes de la planta derivadas de las plantas de maíz que comprenden el evento MON 95379.

[97] La invención provee plantas de maíz, células vegetales de maíz, semillas de maíz, partes de la planta de maíz (tales como polen, óvulo, pelos, espiga, antera, mazorca de maíz, tejido de raíz, tejido de tallo, tejido de hoja), plantas de progenie de maíz y productos básicos de maíz. Estas plantas de maíz, células vegetales de maíz, semillas de maíz, partes de plantas de maíz, plantas de la progenie de maíz y productos básicos de maíz contienen una cantidad detectable de un polinucleótido de la invención, por ejemplo, tal como un polinucleótido que tiene al menos una de las secuencias proporcionada como la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10. Las plantas de maíz, las células vegetales, las semillas, las partes de la planta y las plantas de la progenie de la invención también pueden contener uno o más transgenes adicionales. Dicho transgén adicional puede ser cualquier secuencia de nucleótidos que codifica una proteína o molécula de ARN que confiere un rasgo deseable que incluye, de modo no taxativo, mayor resistencia a insectos, mayor eficacia del uso de agua, mayor rendimiento, mayor resistencia a la sequía, calidad de semillas mejorada y/o mayor tolerancia al herbicida.

[98] La invención provee plantas de maíz, células vegetales de maíz, semillas de maíz, partes de plantas de maíz (tales como polen, óvulo, pelos, espiga, antera, mazorca de maíz, tejido de raíz, tejido de tallo, tejido de hoja), plantas de progenie de maíz derivadas de una planta de maíz transgénica que contiene ADN del evento MON 95379. Se ha depositado una muestra representativa de una semilla de maíz que contiene el ADN del evento MON 95379 de acuerdo con el tratado de Budapest en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC®). El depósito de la ATCC ha cedido la Designación de depósito de patente PTA-125027 para la semilla que contiene el ADN del evento MON 95379.

[99] La invención proporciona un microorganismo que comprende una molécula de ADN que tiene al menos una secuencia que se selecciona de la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10 presente en su genoma. Un ejemplo de tal microorganismo es una célula vegetal transgénica. Los microorganismos, tales como las

células vegetales de la invención, son útiles en diversas aplicaciones industriales que incluyen de modo no taxativo: (i) el uso como herramientas para investigación científica o industrial, (ii) el uso en cultivos para producir productos proteicos, ácidos nucleicos, lipídicos o carbohidratos endógenos o recombinantes o moléculas pequeñas que pueden ser utilizadas en posterior investigación científica o como productos industriales y (iii) el uso con técnicas modernas de cultivo de tejidos vegetales para producir plantas transgénicas o cultivos de tejidos vegetales que pueden ser utilizados luego en producción o investigación agrícola. La producción y uso de microorganismos, tales como células de plantas transgénicas, utiliza técnicas microbiológicas modernas y la intervención humana para producir un microorganismo artificial y único. En dicho proceso, se inserta el ADN recombinante en el genoma de una célula vegetal para crear una célula vegetal transgénica independiente de las células vegetales de origen natural y única. Esta célula vegetal transgénica luego se puede cultivar, tal como las células de bacterias y levaduras, mediante el uso de técnicas modernas de microbiología y puede existir en un estado unicelular no diferenciado. La nueva composición genética de la célula de la planta transgénica y el fenotipo es un efecto técnico creado por la integración del ADN heterólogo en el genoma de la célula. Otro aspecto de la invención es un método para utilizar un microorganismo de la invención. Los métodos para utilizar los microorganismos de la invención, tales como células vegetales transgénicas, incluyen (i) métodos de producción de células transgénicas mediante la integración de ADN recombinante en el genoma de la célula y el posterior uso de dicha célula para derivar de ella células adicionales con el mismo ADN heterólogo, (ii) métodos de cultivo de células que contienen ADN recombinante que emplean técnicas modernas de microbiología, (iii) métodos de producción y purificación de productos proteicos, ácidos nucleicos, lipídicos o carbohidratos endógenos o recombinantes a partir de células cultivadas y (iv) métodos para utilizar técnicas modernas de cultivo de tejido vegetal con células vegetales transgénicas para producir cultivos de tejido vegetal transgénico o plantas transgénicas.

[100] Las plantas de la invención pueden atravesar el ADN del evento MON 95379, lo que incluye el transgén insertado en el evento de maíz MON 95379, hasta la progenie. Según se emplea en la presente, «progenie» incluye cualquier planta, célula vegetal, semilla y/o parte de una planta regenerable que contiene el ADN del evento MON 95379 derivado de una planta ancestro y/o que comprende una molécula de ADN que tiene al menos una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 y

SEQ ID NO:10. Las plantas, la progenie y las semillas pueden ser homocigóticas o heterocigóticas para el transgén del evento MON 95379. La progenie se puede cultivar a partir de las semillas producidas por una planta que contiene el evento de maíz MON 95379 y/o semillas producidas por una planta fertilizada con polen de una planta que
5 contiene el evento de maíz MON 95379.

[101] Las plantas de la progenie se pueden autopolinizar (también denominado «autofertilización») para generar una verdadera línea de fitomejoramiento de las plantas, es decir, las plantas homocigotas para el transgén. La autofertilización de la progenie adecuada puede producir plantas homocigotas para ambos genes exógenos agregados.

10 [102] Alternativamente, las plantas de la progenie se pueden cruzar, por ejemplo, reproducir con otra planta no relacionada, para producir una semilla o planta híbrida o varietal. La otra planta no relacionada puede ser transgénica o no transgénica. Por lo tanto, una planta o semilla híbrida o varietal de la invención se puede derivar mediante el cruzamiento sexual de un primer progenitor que carece del ADN específico y único del
15 evento de maíz MON 95379 con un segundo progenitor que comprende el evento de maíz MON 95379, lo que da como resultado un híbrido que comprende el ADN específico y único del evento de maíz MON 95379. Cada progenitor puede ser un híbrido o un endogámico/varietal, siempre que los resultados del cruzamiento o fitomejoramiento en una planta o semilla de la invención, es decir, una semilla que tiene al menos un alelo que
20 contiene el ADN del evento de maíz MON 95379 y/o una molécula de ADN que tiene al menos una secuencia seleccionada de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10. Por ende, dos plantas transgénicas pueden cruzarse para producir crías híbridas que contienen dos genes exógenos agregados independientemente segregantes.
25 Por ejemplo, el evento MON 95379 que contiene Cry1B.868 y Cry1Da_7 que confieren al maíz resistencia a los insectos se puede cruzar con otras plantas de maíz transgénicas para producir una planta que tenga las características de ambos progenitores transgénicos. Un ejemplo de esto sería un cruzamiento del evento MON 95379 que contiene Cry1B.868 y Cry1Da_7 que confieren al maíz resistencia a lepidópteros con una
30 planta que tiene uno o más rasgos adicionales, tales como tolerancia a herbicidas, resistencia a insectos o tolerancia a sequía, lo que resulta en una planta o semilla de progenie que presenta resistencia a plagas de insectos lepidópteros y tiene al menos uno o más rasgos adicionales. Se contemplan también el retrocruzamiento a una planta progenitora y el cruzamiento con una planta no transgénica, así como la propagación

vegetativa. Las descripciones de otros métodos de fitomejoramiento que se utilizan comúnmente para obtener rasgos y cultivos diferentes se pueden encontrar en una de varias referencias, por ejemplo, Fehr, en *Breeding Methods for Cultivar Development*, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison WI (1987).

5 [103] Las plantas, progenie, semillas, células y partes de plantas de la invención pueden contener también uno o más rasgos o eventos transgénicos de maíz adicionales, particularmente los introducidos mediante el cruzamiento de una planta de maíz que
10 contiene el evento de maíz MON 95379 con otra planta de maíz que contenga uno o más rasgos o eventos transgénicos adicionales. Dichos rasgos o eventos transgénicos incluyen, de modo no taxativo, mayor resistencia a insectos, tolerancia a herbicidas, mayor eficacia del uso de agua, mayor rendimiento, mayor resistencia a las sequías, mayor calidad de semilla, mayor calidad nutricional, producción de semillas híbridas o resistencia a la enfermedad o fúngica. Los expertos en la técnica conocen los eventos transgénicos de maíz. Por ejemplo, el Servicio de Inspección de Salud Animal y Vegetal
15 (APHIS) del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) proporciona una lista de tales rasgos y esta se puede encontrar en su sitio web: www.aphis.usda.gov. Se pueden combinar, por lo tanto, dos o más eventos transgénicos en una semilla o planta de progenie mediante el cruzamiento de dos plantas progenitoras, donde cada una comprende uno o más eventos transgénicos, recoger la semilla de progenie y seleccionar
20 semillas o plantas de progenie que contengan los dos o más eventos transgénicos. Estas etapas se pueden repetir hasta lograr la combinación deseada de eventos transgénicos en una progenie. Se contemplan también el retrocruzamiento a una planta progenitora y el cruzamiento con una planta no transgénica, así como la propagación vegetativa.

[104] La invención proporciona una parte de planta que deriva de plantas de maíz que
25 comprenden el evento MON 95379. Tal como se usa en la presente, una «parte de una planta» hace referencia a cualquier parte de una planta que comprende un material derivado de una planta de maíz que comprende el evento MON 95379. Las partes de una planta incluyen, de modo no taxativo, polen, óvulo, pelos, espiga, antera, mazorca de maíz, tejido de raíz, tejido de tallo y tejido de hojas. Las partes de una planta pueden ser
30 viables, no viables, regenerables y/o no regenerables.

[105] La invención proporciona un producto básico que deriva de plantas de maíz que comprenden el evento MON 95379 y que contienen una cantidad detectable de un ácido nucleico específico para el evento MON 95379. Tal como se usa en la presente, un «producto básico» hace referencia a cualquier composición o producto que comprende un

material derivado de una planta de maíz, semilla de maíz entera o procesada, una o más células vegetales y/o partes de plantas que contienen el ADN del evento de maíz MON 95379. Los productos básicos no viables incluyen, de modo no taxativo, semillas no viables, semillas enteras o procesadas, partes de la semilla y partes de la planta; ración

5 para animales que comprende maíz, aceite de maíz, maíz triturado, harina de maíz, copos de maíz, salvado de maíz, pasta hecha con maíz, biomasa de maíz y productos de combustible producidos con maíz y partes de maíz. Los productos básicos viables incluyen, de modo no taxativo, semillas, plantas y células vegetales. Por lo tanto, las plantas de maíz que comprenden el evento MON 95379 se pueden usar para producir

10 cualquier producto básico que normalmente se adquiere a partir del maíz. Cualquiera de estos productos básicos que derivan de las plantas de maíz que comprenden el evento MON 95379 pueden contener al menos una cantidad detectable del ADN específico y único correspondiente al evento de maíz MON 95379 y puede contener, específicamente, una cantidad detectable de un polinucleótido que comprende una molécula de ADN que

15 tiene al menos una secuencia seleccionada de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10. Puede emplearse cualquier método de detección de moléculas de nucleótidos estándar, lo que incluye los métodos de detección divulgados en la presente. Un producto básico está comprendido por el alcance de la invención si existe cualquier

20 cantidad detectable de una molécula de ADN con al menos una secuencia que se selecciona de la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10 en el producto básico.

[106] Las plantas de maíz, células vegetales de maíz, semillas de maíz, partes de la

25 planta de maíz (tales como polen, óvulo, pelos, espiga, antera, mazorca de maíz, tejido de raíz, tejido de tallo, tejido de hoja), plantas de progenie de maíz y productos básicos de la invención, por lo tanto, son útiles, entre otras cosas, para el cultivo de plantas con el fin de producir semillas y/o partes de la planta que comprenden el evento de maíz MON 95379 con fines agrícolas, la producción de progenie que comprende el evento de maíz MON

30 95379 con fines de fitomejoramiento de plantas y de investigación, su uso con técnicas microbiológicas para aplicaciones industriales y de investigación y su venta a consumidores.

[107] Se proporcionan métodos para producir una planta de maíz resistente a insectos que comprende las secuencias de ADN específicas y únicas del evento MON 95379 de la

invención. Las plantas transgénicas utilizadas en estos métodos pueden ser homocigotas o heterocigotas para el transgén. Las plantas de la progenie producidas mediante estos métodos pueden ser plantas híbridas o varietales; se pueden cultivar a partir de las semillas producidas por una planta que contiene el evento de maíz MON 95379 y/o de

5 semillas producidas por una planta fertilizada con polen de una planta que contiene el evento de maíz MON 95379; y pueden ser homocigotas o heterocigotas para el transgén. Posteriormente, las plantas de la progenie se pueden autopolinizar para generar una verdadera línea de fitomejoramiento de las plantas, es decir, las plantas homocigotas para el transgén, o se pueden cruzar alternativamente, por ejemplo, reproducir con otra planta

10 no relacionada, para producir una semilla o planta híbrida o varietal.

[108] Se proporcionan métodos para detectar la presencia de ADN derivado de una célula de maíz, tejido de maíz, semilla de maíz o planta de maíz que comprenden el evento de maíz MON 95379 en una muestra. Un método consiste en (i) extraer una muestra de ADN de al menos una célula de maíz, tejido de maíz, semilla de maíz o planta

15 de maíz, (ii) poner en contacto la muestra de ADN con al menos un cebador que puede producir una secuencia de ADN específica para el ADN del evento MON 95379 en condiciones adecuadas para la secuenciación del ADN, (iii) realizar una reacción de secuenciación del ADN y luego (iv) confirmar que la secuencia de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos específica para el evento MON 95379 de la construcción

20 comprendida en esta, por ejemplo una seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, and SEQ ID NO:10. Otro método consiste en (i) extraer una muestra de ADN de al menos una célula de maíz, tejido de maíz, semilla de maíz o planta de maíz, (ii) poner en contacto la muestra de ADN con un par de cebadores

25 que puede producir un amplicón del ADN del evento MON 95379 en condiciones adecuadas para la amplificación del ADN, (iii) realizar una reacción de amplificación del ADN y luego (iv) detectar la molécula del amplicón y/o confirmar que la secuencia de nucleótidos del amplicón comprende una secuencia de nucleótidos específica para el evento MON 95379, tal como una seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID

30 NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, y SEQ ID NO:10. El amplicón debería ser uno que sea específico para el evento MON 95379, tal como un amplicón que comprende la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:10. La detección de una secuencia de

nucleótidos específica para el evento MON 95379 en el amplicón es determinante y/o de diagnóstico para la presencia de ADN específico del evento de maíz MON 95379 en la muestra. Un ejemplo de un par de cebadores que puede producir un amplicón del ADN del evento MON 95379 en condiciones adecuadas para la amplificación del ADN se proporciona como SEQ ID NO:15 y SEQ ID NO:16. Otros pares de cebadores pueden ser diseñados fácilmente por un experto en la técnica y producirían un amplicón que comprende la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, o SEQ ID NO:8, en donde este par de cebadores comprende al menos un cebador dentro de la región genómica que flanquea el inserto y un segundo cebador dentro del inserto. Otro método para detectar la presencia de ADN derivado de una célula de maíz, tejido de maíz, semilla de maíz o planta de maíz que comprende el evento de maíz MON 95379 en una muestra consiste en (i) extraer una muestra de ADN de al menos una célula de maíz, tejido de maíz, semilla de maíz o planta de maíz, (ii) poner en contacto la muestra de ADN con una sonda de ADN específica para el ADN del evento MON 95379, (iii) permitir que la sonda y la muestra de ADN se hibriden en condiciones rigurosas de hibridación y luego (iv) detectar la hibridación entre la sonda y la muestra de ADN diana. Un ejemplo de la secuencia de una sonda de ADN que es específica para el evento MON 95379 se proporciona como la SEQ ID NO:17. Un experto en la técnica puede diseñar fácilmente otras sondas y estas comprenderían al menos un fragmento de ADN genómico que flanquea el inserto y al menos un fragmento de ADN inserto, tal como la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8 y SEQ ID NO:10. La detección de la hibridación de la sonda a la muestra de ADN es de diagnóstico para determinar la presencia del ADN específico del evento de maíz MON 95379 en la muestra. La ausencia de hibridación es alternativamente de diagnóstico de la ausencia del ADN específico del evento de maíz MON 95379 en la muestra.

[109] Se proporcionan kits de detección de ADN que son útiles para la identificación del ADN del evento de maíz MON 95379 en una muestra y también se pueden aplicar a métodos de fitomejoramiento de plantas de maíz que contienen el ADN del evento adecuado. Dichos kits contienen los cebadores y/o sondas de ADN que comprenden los fragmentos de la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10. Un ejemplo de dicho kit comprende al menos una molécula de ADN de longitud suficiente de nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:10 para funcionar como una sonda de ADN útil para

detectar la presencia y/o ausencia del ADN derivado de plantas de maíz transgénicas que comprenden el evento MON 95379 en una muestra. El ADN derivado de plantas de maíz transgénicas que comprenden el evento MON 95379 comprenderían una molécula de ADN que tiene al menos una secuencia que se selecciona de la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10. Se proporciona una molécula de ADN suficiente para su uso como una sonda de ADN que es útil para determinar, detectar o diagnosticar la presencia y/o ausencia de ADN del evento de maíz MON 95379 en una muestra como la SEQ ID NO: 17. Un experto en la técnica puede diseñar fácilmente otras sondas y estas comprenderán al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24, al menos 25, al menos 26, al menos 27, al menos 28, al menos 29, al menos 30, al menos 31, al menos 32, al menos 33, al menos 34, al menos 35, al menos 36, al menos 37, al menos 38, al menos 39 o al menos 40 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:10 y serán lo suficientemente únicas para el ADN del evento de maíz MON 95379 para identificar el ADN derivado del evento.

[110] Otro tipo de kit comprende un par de cebadores útil para producir un amplicón útil para detectar la presencia y/o ausencia de ADN derivado del evento de maíz MON 95379 transgénico en una muestra. Dicho kit emplearía un método que comprende poner una muestra de ADN diana en contacto con un par de cebadores como se describe en la presente, luego, llevar a cabo una reacción de amplificación de ácidos nucleicos suficiente para producir un amplicón que comprende una molécula de ADN que tiene al menos una secuencia seleccionada de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10, y después, detectar la presencia y/o ausencia del amplicón. Este método también puede incluir la secuenciación del amplicón o un fragmento de este, el cual sería determinante, es decir, de diagnóstico, de la presencia del ADN específico del evento de maíz MON 95379 en la muestra de ADN diana. Un experto en la técnica podría diseñar fácilmente otros pares de cebadores que comprenderían al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24, al menos 25, al menos 26, al menos 27, al menos 28, al menos 29 o al menos 30 nucleótidos contiguos provistos, de modo no taxativo, en la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10, y serían suficientemente únicos para el ADN del evento de

maíz MON 95379 para identificar ADN derivado del evento.

[111] Los kits y métodos de detección de la invención son útiles, entre otras cosas, para identificar el evento de maíz MON 95379, seleccionar variedades o híbridos de plantas que comprenden el evento de maíz MON 95379, detectar la presencia de ADN derivado de las plantas de maíz transgénico que comprenden el evento MON 95379 en una muestra y monitorear las muestras para reconocer la presencia y/o ausencia de plantas de maíz que comprenden el evento MON 95379 o partes de la planta derivadas de plantas de maíz que comprenden el evento MON 95379.

[112] La secuencia del inserto de ADN heterólogo, las secuencias de unión o secuencia de flanqueo del evento de maíz MON 95379 se pueden verificar (y corregir, si fuera necesario) mediante la amplificación de dichas secuencias del evento con cebadores derivados de las secuencias proporcionadas en la presente, seguida de la secuenciación de ADN estándar del amplicón o del ADN clonado.

[113] Se proveen métodos para detectar la cigosidad del alelo de transgén de ADN derivado de una célula de maíz, tejido de maíz, semilla de maíz o planta de maíz que comprende el evento de maíz MON 95379 en una muestra. Un método consiste en (i) extraer una muestra de ADN de al menos una célula de maíz, tejido de maíz, semilla de maíz o planta de maíz; (ii) poner la muestra de ADN en contacto con un par de cebadores que puede producir un primer amplicón de diagnóstico del evento MON 95379; (iii) poner la muestra de ADN en contacto con un par de cebadores que puede producir un segundo amplicón de diagnóstico para ADN genómico de maíz nativo que no comprende el evento MON 95379; (iv) llevar a cabo una reacción de amplificación de ADN y luego, (v) detectar los amplicones, en donde la presencia de solo el primer amplicón es de diagnóstico de ADN de un evento MON 95379 homocigoto en la muestra y la presencia de tanto el primer amplicón como el segundo amplicón es de diagnóstico de una planta de maíz heterocigota para el alelo del evento MON 95379. Un ejemplo de conjunto de pares de cebadores se presenta como SEQ ID NO:15 y SEQ ID NO:16 que producen un amplicón de diagnóstico del evento MON 95379, y SEQ ID NO:15 y SEQ ID NO:27 que producen un amplicón de diagnóstico de ADN genómico de maíz de tipo salvaje no insertado que no comprende el evento MON 95379. También es posible incorporar un conjunto de sondas en dicho método de amplificación para usar en un formato de PCR en tiempo real con los conjuntos de pares de cebadores anteriormente descritos. Un ejemplo de conjunto de sondas se presenta como SEQ ID NO:17 (de diagnóstico del amplicón para el evento MON 95379) y SEQ ID NO:28 (de diagnóstico del amplicón para el ADN genómico de

maíz de tipo salvaje que no comprende el evento MON 95379).

[114] Otro método para determinar la cigosidad consiste en (i) extraer una muestra de ADN de al menos una célula de maíz, tejido de maíz, semilla de maíz o planta de maíz, (ii) poner la muestra de ADN en contacto con un conjunto de sondas que contiene al menos una primera sonda que se hibrida específicamente con el ADN del evento MON 95379 y al menos una segunda sonda que se hibrida específicamente con ADN genómico de ADN con interrupción por inserción del ADN heterólogo del evento MON 95379 y no se hibrida con el ADN del evento MON95379, (iii) hibridar el conjunto de sondas con la muestra en condiciones de hibridación rigurosas, en donde la detección de hibridación de únicamente la primera sonda en las condiciones de hibridación es de diagnóstico de un alelo homocigoto del ADN del evento MON 95379 en la muestra y en donde la detección de hibridación de tanto la primera sonda como la segunda sonda en las condiciones de hibridación es de diagnóstico de un alelo heterocigoto del evento MON 95379 en una muestra de ADN.

[115] Incluso otro método para determinar cigosidad consiste en (i) extraer una muestra de ADN de al menos una célula de maíz, tejido de maíz, semilla de maíz o planta de maíz, (ii) poner la muestra de ADN en contacto con un par de cebadores que puede producir un amplicón de una de las secuencias de codificación de toxinas que codifican Cry1B.868 o Cry1Da_7, (iii) poner la muestra de ADN en contacto con un par de cebadores que puede producir un amplicón de un estándar interno conocido por ser una copia simple y homocigoto en la planta de maíz, (iv) poner la muestra de ADN en contacto con un conjunto de sondas que contiene al menos una primera sonda que se hibrida específicamente con una de las secuencias de codificación de toxinas que codifican Cry1B.868 o Cry1Da_7, y al menos una segunda sonda que se hibrida específicamente con el ADN genómico estándar interno conocido por ser una copia simple y homocigoto en la planta de maíz, (v) llevar a cabo una reacción de amplificación de ADN con PCR en tiempo real y determinar los umbrales del ciclo (valores de Ct) del amplicón correspondiente a la secuencia de codificación de toxina y el estándar interno homocigoto de copia simple, (vi) calcular la diferencia (ΔCt) entre el valor de Ct del amplicón estándar interno homocigoto de copia simple y el valor de Ct del amplicón de secuencia de codificación de toxina, y (vii) determinar la cigosidad, en donde un ΔCt de alrededor de 0 (cero) indica homocigosidad del ADN-T insertado y un ΔCt de alrededor de 1 (uno) indica heterocigosidad del ADN-T insertado. Los eventos heterocigotos y homocigotos se diferencian por una unidad de valor de ΔCt de aproximadamente 1 (uno). Dada la

variabilidad normal observada en PCR en tiempo real debido a múltiples factores como eficiencia de amplificación y temperaturas de templado ideal, el rango de «alrededor de 1 (uno)» se define como un ΔC_t de 0,75 a 1,25. Los pares de cebadores y sondas para el método anterior para determinar cigosidad puede amplificar y detectar amplicones de la

5 secuencia de codificación de Cry1B-868 y estándar interno, o amplificar y detectar amplicones de la secuencia de codificación de Cry1Da_7 y estándar interno. Ejemplos de pares de cebadores para la detección de los amplicones correspondientes a la secuencia de codificación de Cry1B.868 y estándar interno se presentan como SEQ ID NO:18 combinada con SEQ ID NO:19 (estándar interno) y SEQ ID NO:21 combinada con SEQ ID

10 NO:22 (Cry1B.868). Los ejemplos de sondas adicionales se presentan como SEQ ID NO:20 (estándar interno) y SEQ ID NO:23 (Cry1B.868). Ejemplos de pares de cebadores para la detección de los amplicones correspondientes a la secuencia de codificación de Cry1Da_7 y estándar interno se presentan como SEQ ID NO:18 combinada con SEQ ID NO:19 (estándar interno) y SEQ ID NO:24 combinada con SEQ ID NO:25 (Cry1Da_7). Los

15 ejemplos de sondas adicionales se presentan como SEQ ID NO:20 (estándar interno) y SEQ ID NO:26 (Cry1Da_7).

INFORMACIÓN SOBRE DEPÓSITO

[116] Se realizó un depósito de una muestra representativa de la semilla de maíz que

20 contiene el evento MON 95379 el 20 de abril de 2018 de acuerdo con el Tratado de Budapest en American Type Culture Collection (ATCC), cuya dirección es 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia, EUA, código postal 20110, y el n.º de acceso en ATCC asignado es PTA-125027. Será posible acceder a los depósitos mientras que la solicitud presentada ante el Comisionado de patentes y marcas se encuentre pendiente, y

25 será él quien determine quiénes tendrán derecho a tal acceso cuando se lo soliciten. Una vez que se otorgue la patente, se eliminarán en forma irrevocable todas las restricciones relativas a la disponibilidad al público. El depósito se mantendrá en el lugar de almacenamiento durante un período de 30 (treinta) años, o 5 (cinco) años después de la última solicitud o durante el plazo de vigencia de la patente, lo que sea más extenso, y se

30 reemplazará siempre que sea necesario durante dicho período.

EJEMPLOS

[117] Los ejemplos que se encuentran a continuación se incluyen para describir de forma más completa la invención. Se resumen la construcción y la evaluación de 125

(ciento veinticinco) construcciones, la producción de alrededor de 10 785 (diez mil setecientos ochenta y cinco) eventos (tanto de índole comercial como de prueba de concepto) y el análisis de cientos de miles de plantas individuales durante 6 (seis) años mediante las evaluaciones moleculares, agronómicas y de campo rigurosas necesarias para la creación y la selección del evento de maíz MON 95379.

[118] Los ejemplos demuestran determinadas modalidades preferidas de la invención. Los expertos en la técnica deberían tener en cuenta que las técnicas descritas en los ejemplos que se encuentran a continuación representan enfoques que los inventores observaron que funcionan en la práctica de la invención y, por lo tanto, puede considerarse que constituyen ejemplos de modos preferidos para su realización. Sin embargo, los expertos en la técnica deberían, en vista de la presente descripción, reconocer que pueden realizarse muchos cambios a las modalidades específicas descritas y aun así obtener un resultado parecido o similar sin apartarse del espíritu y alcance de la invención.

EJEMPLO 1

Evaluación de casete de expresión, diseño de construcción, evaluación de planta y selección de construcción

[119] Múltiples factores diferentes influyen en la expresión de transgenes en plantas. Se debe encontrar la combinación correcta de proteínas insecticidas y elementos de expresión diferentes que guían la expresión en plantas, sin producir desviaciones de los fenotipos. Además, más allá de los elementos de expresión en sí mismos y su combinación y orientación en un casete, se sabe que la posición de la inserción cromosómica influye en la expresión de los transgenes en las plantas, quizás debido a la estructura de cromatina (por ejemplo, heterocromatina) o la proximidad de elementos de regulación de transcripción (por ejemplo, potenciadores) cerca del sitio de integración (Kurt Weising et ál., (1988) *Foreign genes in plants: transfer, structure, expression and applications. Annu. Genet.* 22:421-77). Por ejemplo, se ha observado en las plantas y en otros organismos que puede haber una amplia variación en los niveles de expresión de un gen introducido de la misma construcción entre eventos con posiciones de inserción cromosómica diferentes. Posiciones de inserción cromosómica diferentes también pueden producir diferencias en patrones espaciales o temporales de expresión que pueden no corresponder a los patrones esperados para elementos de regulación de transcripción presentes en la construcción génica introducida.

[120] Por estas razones, a menudo es necesario crear y registrar una gran cantidad de construcciones y eventos de transformación para identificar una construcción y luego, un evento, el cual demuestra expresión óptima de los genes de interés introducidos, sin producir también desviaciones fenotípicas o agronómicas.

5 [121] Por estos motivos, el desarrollo de una planta de maíz transgénica que comprende proteínas insecticidas activas contra lepidópteros sin efectos negativos en el aspecto agronómico, el rendimiento o la viabilidad de apilamiento requirió investigación, desarrollo y análisis extensos. Específicamente, durante un período de 6 (seis) años, se desarrollaron, se evaluaron y se analizaron aproximadamente 10 785 (diez mil setecientos

10 ochenta y cinco) eventos transgénicos de prueba de concepto y comerciales derivados de 125 (ciento veinticinco) construcciones de vector plásmido diferentes.

[122] Este ejemplo describe el diseño y la evaluación en plantas de maíz de 125 (ciento veinticinco) construcciones diferentes para identificar la construcción preferida para la creación de eventos. Cada construcción varió con respecto a las secuencias de

15 codificación para las proteínas insecticidas y los elementos de regulación de transcripción. Se llevó a cabo una evaluación para seleccionar la mejor construcción para uso en expresión de las proteínas insecticidas en plantas. Cada construcción tuvo una configuración única, con variación de composición de casete de expresión (tanto proteínas insecticidas como elementos de expresión), orientación y si el cloroplasto seleccionó

20 como diana proteínas o no.

[123] En una etapa de prueba de concepto y desarrollo inicial, se usaron 117 (ciento diecisiete) construcciones que comprenden combinaciones diferentes de 26 (veintiséis) promotores distintos, 26 (veintiséis) intrones distintos y 10 (diez) secuencias de codificación de toxina de insecto distintas para generar aproximadamente 6000 (seis mil)

25 eventos transformados. Luego de la caracterización molecular inicial para la presencia de transgenes, se seleccionaron 5052 (cinco mil cincuenta y dos) eventos de maíz transformados de copia simple y copia doble para caracterización y evaluación de eficacia adicionales. Estos eventos se evaluaron para determinar desviaciones fenotípicas o agronómicas, el nivel de expresión de las proteínas de toxina de insecto y la eficacia

30 contra especies de plagas de insectos lepidópteros seleccionados. Se usaron los datos de expresión de proteínas y eficacia resultante, junto con cualquier información con respecto a desviaciones fenotípicas y agronómicas, para eliminar proteínas ineficaces, elementos de expresión y combinaciones, y se usaron para diseñar una cantidad menor de construcciones de construcciones de plásmidos de transformación comerciales binarias

en la siguiente fase de desarrollo.

[124] En la fase siguiente de desarrollo, se crearon 8 (ocho) construcciones nuevas. Estas construcciones comprendieron combinaciones de 2 (dos) a 4 (cuatro) casetes de expresión de transgén de toxina de insecto en orientaciones diferentes (convergentes o divergentes). Dichas 8 (ocho) construcciones se usaron para generar un total de 5733 (cinco mil setecientos treinta y tres) eventos transformados (a los que también se hace referencia como «transformantes»). Luego de la formación de brotes en cultivo, se seleccionó un subconjunto de eventos transformados con base en características visuales y análisis molecular temprano. Se seleccionó un total de 823 (ochocientos veintitrés) eventos transformados y se trasplantaron a macetas y se cultivaron para su estudio adicional.

[125] Se analizó la eficacia de la generación R_0 resultante de eventos transformados contra especies de lepidópteros seleccionadas, la expresión de proteínas de toxinas, la salud de la planta, la producción de semillas y las desviaciones fenotípicas y agronómicas. También se caracterizaron molecularmente los eventos de la generación R_0 para garantizar que los casetes se mantengan intactos y la inserción adecuada en el genoma de maíz. Se omitió de las evaluaciones a muchos de los eventos debido a que no pasaron el análisis agronómico y la evaluación de caracterización molecular. Asimismo, no se estudió adicionalmente 1 (una) de las 8 (ocho) construcciones en dicha etapa R_0 debido a que produjo eventos con desviaciones fenotípicas. Además de dichos problemas agronómicos, ensayos de modo de acción (MOA) posteriores desarrollados demostraron que una proteína de toxina de insecto contenida en esta construcción demostró un MOA superpuesto con el de una proteína comercialmente disponible.

[126] Se llevaron a cabo ensayos de modo de acción en una de las proteínas de insectos comunes para 4 (cuatro) de las 8 (ocho) construcciones. Estos ensayos demostraron que esta proteína de insecto tiene un MODA superpuesto con el de una proteína comercialmente disponible. Las proteínas que exhibieron un MOA análogo o superpuesto con el de una proteína insecticida comercial actualmente utilizada no son deseables debido al desarrollo de resistencia, lo cual podría tornar una proteína con un MOA similar ineficaz contra poblaciones de insectos. De esa forma, se omitieron estas 4 (cuatro) construcciones, y los eventos que surgen de estas. Tal como se mencionó anteriormente, 1 (una) de las 4 (cuatro) construcciones también produjo eventos con desviaciones de fenotipos en la etapa R_0 .

[127] En la etapa siguiente de desarrollo, se evaluaron adicionalmente 150 (ciento

cincuenta) eventos derivados de las 4 (cuatro) construcciones restantes en la generación F₁ (híbrido heterocigoto)/R₁ (endogámico homocigoto) y R₂ para determinar eficacia, producción de semilla y segregación, desviaciones fenotípicas y agronómicas, y caracterización molecular adicionales. Se omitieron 2 (dos) construcciones de las 4 (cuatro) construcciones restantes de ensayo adicional en esta etapa por no cumplir uno o más de los criterios para su avance, lo que dejó eventos derivados de 2 (dos) construcciones para evaluación adicional.

[128] Se evaluaron 77 (setenta y siete) eventos, 41 (cuarenta y uno) derivados de la construcción usada para generar el evento MON 95379 («Construcción MON95») y 36 (treinta y seis) eventos derivados de otra construcción («Construcción 1»), como productos endogámicos R₂ e híbridos F₁ para determinar la eficacia, producción de semillas y segregación, desviaciones fenotípicas y agronómicas y caracterización molecular adicionales. Con base en los resultados de estas evaluaciones, se redujo la prioridad de los eventos asociados con la Construcción 1 y se almacenaron.

[129] Por lo tanto, múltiples rondas de evaluación y comparación de varias construcciones revelaron que el casete de transgén provisto como SEQ ID NO:13, Construcción MON95, era la mejor opción en cuanto a eficacia contra las especies de plagas de lepidópteros cogollero del maíz (FAW, *Spodoptera frugiperda*), gusano elotero (CEW, *Helicoverpa zea*), barrenador del maíz del suroeste (SWCB, *Diatraea grandiosella*), barrenador de la caña de azúcar (SCB, *Diatraea saccharalis*) y barrenador menor del tallo de maíz (LSCB, *Elasmopalpus lignosellus*), con la mejor caracterización molecular y el mejor rendimiento agronómico.

[130] La Tabla 2 ilustra la cantidad de eventos transformados derivados («colocados en bandejas»), la cantidad de eventos transformados seleccionados para cultivo como eventos R₀ («Trasplantados») y los puntos en los que se omitió cada construcción respectiva en el proceso de evaluación, investigación y desarrollo que llevó a la selección de la Construcción MON95.

Tabla 2. Selección de construcción de eventos

Construcción	Colocado en bandeja	Trasplantado	Omitido
Construcción MON 95	1202	210	
Construcción 1	799	173	Almacenado

			con base en datos de R_2 y F_1
Construcción 2	679	113	$R_2/F_1/R_1$
Construcción 3	1344	20	MOA/ R_0
Construcción 4	232	41	$R_2/F_1/R_1$
Construcción 5	544	88	MOA
Construcción 6	584	95	MOA
Construcción 7	349	83	MOA

EJEMPLO 2

Ensayos de campo, evaluación molecular y selección de eventos

- [131] Este ejemplo describe la caracterización molecular, análisis y evaluación en ensayos de campo de eventos creados con la Construcción MON95 en múltiples ubicaciones durante varios años, lo cual lleva a la selección del evento final, MON 95379.
- [132] La Tabla 3 ilustra el proceso usado para seleccionar el evento final, MON 95379. En la determinación de transformación comercial de R_0 , se derivaron 210 (doscientos diez) eventos transformados R_0 de la Construcción MON95 y se seleccionaron para su crecimiento. De los 210 (doscientos diez) eventos transformados R_0 seleccionados, se omitieron 147 (ciento cuarenta y siete) debido a preocupaciones con respecto a eficacia, expresión de proteínas, producción de semillas y salud de las plantas, o caracterización molecular. Esto dejó 63 (sesenta y tres) eventos para ensayo y evaluación en la etapa siguiente de desarrollo, la etapa de determinación de F_1 y de vivero R_1 . En esta etapa, se omitieron 11 (once) eventos debido a preocupaciones con respecto a eficacia en la evaluación en invernadero. Se omitieron otros 3 (tres) eventos debido a producción insuficiente de semillas del criadero y/o análisis de segregación de las semillas resultantes. Finalmente, se removieron otros 5 (cinco) eventos debido a problemas descubiertos en la caracterización molecular y 3 (tres) eventos debido a problemas descubiertos en análisis molecular Southern, lo cual deja 41 (cuarenta y un) eventos para ensayo en la generación siguiente. En la etapa R_2/F_1 de ensayo, se omitieron 2 (dos) de los 41 (cuarenta y un) eventos restantes debido a problemas descubiertos en caracterización molecular Southern adicional, lo que deja 39 (treinta y nueve) eventos.
- [133] Los 39 (treinta y nueve) eventos restantes pasaron a dos etapas de evaluación paralelas simultáneas diferentes: 1) ensayos de campo adicionales y 2) escisión de Cre

del casete de selección y la producción de semilla Gold Standard. Se omitieron eventos en cada una de estas etapas de evaluación paralelas simultáneas.

[134] Durante la escisión de Cre, se omitieron 11 (once) eventos debido a problemas descubiertos en la caracterización molecular luego de la escisión de Cre del casete de selección de glifosato. Además, se omitieron otros 6 (seis) eventos debido a problemas descubiertos en la caracterización molecular durante la producción de semillas Gold Standard.

[135] Durante la evaluación de campo simultánea, con base en los datos recabados en los ensayos de campo de Estados Unidos de 2016, se omitieron otros 4 (cuatro) eventos debido a preocupaciones de eficacia y otros 12 (doce), debido a preocupaciones agronómicas. Entonces, con base en los datos recabados en los ensayos de campo de Brasil, se omitió otro evento debido a preocupaciones de eficacia. Luego, el análisis bioinformático llevado a cabo durante los ensayos de campo de Estados Unidos de 2017 produjo la omisión de otros 3 (tres) eventos de evaluaciones adicionales, lo que dejó dos eventos: Evento 1 y MON 95379. Después de análisis adicionales de las características agronómicas de los eventos de múltiples ensayos de campo en los Estados Unidos, Brasil, Argentina y Puerto Rico, se seleccionó el evento MON 95379 como el evento para comercialización porque clasificó por encima del Evento 1 cuando se compararon todas las características de la caracterización molecular, expresión de proteínas, eficacia y características agronómicas de cada evento.

Tabla 3. Selección de evento MON 95379

			Eventos restantes
Etapas	Ensayo	Eventos removidos	210
Com. Análisis de R₀ TFN	Eficacia	21	63
	Expresión	6	
	Producción de semillas/salud de la planta	51	
	Caracterización molecular	69	
R₁/F₁	Eficacia de invernadero	11	41
	Caracterización molecular	5	

	Producción/segregación de vivero	3	
	Southern molecular	3	
R₂/F₁	Southern molecular	2	39
Escisión de Cre	Caracterización molecular luego de escisión de CP4	11	28
Semilla Gold Standard	Caracterización molecular	6	22
Campo Estados Unidos 2016	Eficacia	4	6
	Características agronómicas	12	
Campo Brasil	Eficacia	1	5
Campo Estados Unidos 2017	Análisis molecular bioinformático	3	2
Selección comercial	Análisis adicional de caracterización molecular, expresión de proteínas, eficacia y características agronómicas de múltiples ensayos de campo.	1	MON 95379

EJEMPLO 3

Escisión de Cre del casete de selección de glifosato en evento de maíz MON 95379

[136] Este ejemplo describe la remoción del casete de selección de glifosato del evento de maíz MON 95379 mediante escisión de Cre *in vivo*. Se usó el casete de selección de glifosato para seleccionar eventos transformados. Al remover el casete de selección, se creó un evento «libre de marcadores» en donde únicamente permanecieron los casetes de expresión de proteínas insecticidas en el evento final.

[137] La Figura 3 ilustra el proceso de reproducción que se usa para generar el evento de maíz MON 95379 libre de marcadores. Se transformaron embriones inmaduros de la variedad de maíz LH244 con un proceso de transformación mediado por agrobacterias con la Construcción MON95 (presentada como SEQ ID NO:13 e ilustrada en la Figura 2). La Construcción MON95 comprende 3 (tres) casetes de expresión: 2 (dos) casetes de expresión para la expresión de las proteínas insecticidas Cry1B.868 y Cry1Da_7, y un

único casete usado para la selección de células vegetales transformadas con selección de glifosato. El casete de selección estaba flanqueado a ambos lados con sitios de reconocimiento de recombinasa Cre LoxP.

[138] Luego de la transformación, se autopolinizaron los transformantes R_0 para 2 (dos) generaciones y durante ese tiempo se removieron varios eventos con base en varios ensayos, tales como de eficacia, expresión de proteínas, producción de semillas y salud de las plantas, y caracterización molecular. Para la generación R_2 , quedaron 39 (treinta y nueve) eventos de los 210 (doscientos diez) eventos iniciales. Los 39 (treinta y nueve) eventos de generación R_2 homocigotos se reprodujeron con una línea de élite de plantas de maíz transformadas que expresan enzima recombinasa Cre derivada del fago P1 de enterobacterias.

[139] Esta etapa en la cual se reprodujeron eventos de generación R_2 con plantas que expresan recombinasa Cre se identificó como «Cruzamiento Cre». Específicamente en esta etapa, se sometió a polinización cruzada a plantas de la generación R_2 (femeninas) despanojadas homocigotas para la SEQ ID NO:13 con plantas de maíz transgénicas (masculinas) homocigotas para un casete de transgén usado para expresión de enzima recombinasa Cre. El polen de donante macho con expresión de recombinasa Cre germina luego de caer en el tejido de barba de la planta femenina que comprende la SEQ ID NO:13. Una vez que el tubo polínico entra en el saco del embrión, el tubo polínico se rompe y libera los dos espermatozoides del donante masculino con expresión de recombinasa Cre. El núcleo de un espermatozoide se fusiona con el núcleo de un óvulo y forma el cigoto. El otro núcleo de espermatozoide se fusiona con uno de los dos núcleos polares que, a su vez, se fusiona con el otro núcleo polar, de forma de establecer el núcleo de endospermo primario.

[140] Por lo tanto, al usar la planta con expresión de recombinasa Cre como el donante de polen masculino, tanto el embrión como el endospermo del cruzamiento resultante expresará recombinasa Cre cuando las células se dividen y se desarrollan y se convierten en un grano de maíz (es decir, semilla). La recombinasa Cre se une a repeticiones invertidas en el sitio de LoxP y cataliza un cruzamiento en una región espaciadora de ocho pares de bases de los dos sitios de LoxP que flanquean el casete de expresión, lo que produce la escisión del casete de marcador con un sitio de LoxP que permanece en el ADN-t integrado debido a recombinación (vea la Figura 2, ADN-T insertado luego de escisión de Cre).

[141] La progenie F_1 producida por el cruzamiento de Cre se seleccionó por la ausencia

del casete de selección CP4 y se permitió que se autopolinizara. Mediante este proceso, los dos alelos, el alelo de recombinasa Cre y el alelo para el ADN-T usado para generar el evento MON 95379, se segregan en la población F₂ resultante, lo que produce progenie homocigota o heterocigota para uno o ambos alelos.

5 [142] Se seleccionó la progenie F₂ que exhibió ausencia de alelo de recombinasa Cre y homocigosidad para SEQ ID NO:9, el ADN-T insertado transgénico luego de escisión de Cre. Esta progenie F₂ seleccionada se autopolinizó, lo que produjo una generación F₃ homocigota para la SEQ ID NO:9.

10 [143] Una autopolinización adicional produjo semilla de progenie F₃ (semilla F₄) que se sometió a ensayo para determinar su pureza y se designó como «semilla Gold Standard». F₄ fue la primera generación de semillas Gold Standard.

[144] La escisión del casete de marcador de selección de glifosato no afectó la expresión de Cry1B.868 y Cry1Da_7. La remoción del casete de selección de glifosato del evento de maíz MON 95379 mediante escisión de Cre proveyó un evento de maíz transgénico resistente a plagas de lepidópteros sin agregar tolerancia al glifosato en el evento final. Este evento «libre de marcador» garantiza la flexibilidad al construir pilas de reproducción de maíz con otros eventos transgénicos de maíz para proveer múltiples productos que incorporan el evento MON 95379 y proveen múltiples opciones para proveer rasgos adicionales en las pilas de reproducción finales.

20

EJEMPLO 4

Evento de maíz MON 95379 exhibe resistencia a las plagas de insectos lepidópteros cogollero del maíz, gusano elotero, barrenador del maíz, barrenador de la caña

25 [145] Este ejemplo describe la actividad del evento MON 95379 contra plagas de insectos lepidópteros. Cuando las proteínas de toxinas de insectos Cry1B.868 y Cry1Da_7 se expresan juntas en el evento de maíz MON 95379, proveen resistencia al cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*), gusano elotero (*Helicoverpa zea*), barrenador del maíz del suroeste (*Diatraea grandiosella*) y barrenador de la caña de azúcar (*Diatraea saccharalis*).

30 [146] Luego de la transformación y la inserción de la Construcción MON95, se seleccionaron 41 (cuarenta y uno) eventos R₀ para bioensayo con discos de hoja. Los bioensayos que usan discos de hojas vegetales se llevaron a cabo de forma análoga a aquellos descritos en la patente estadounidense n.º 8 344 207. Se usó una planta de maíz LH244 no transformada para obtener tejido para usar como un control negativo. Se incubaron placas que comprenden pocillos con un insecto por disco de hoja en cada

pocillo durante 3 (tres) días. Luego de 3 (tres) días, se examinaron las placas. Si se consumió al menos 50 % (cincuenta por ciento) del disco de hoja en los controles negativos, se tomaron medidas de los discos de hoja del evento transgénico. Si se hubiera consumido menos de 50 % (cincuenta por ciento) de los discos de hojas en los
 5 controles negativos, se permitió que los insectos continuaran alimentándose hasta que se lograra el objetivo de 50 % (cincuenta por ciento). Se tomaron medidas de daño de las hojas («clasificación de daño de hoja» o «LDR») y mortalidad para cada pocillo. Se determinó un promedio de cada medida. Las clasificaciones de daño de hoja variaron de 1 (uno) a 11 (once) y reflejaron un porcentaje del disco de hoja consumido. La Tabla 4
 10 muestra la escala de clasificación de daño de hoja usada para los ensayos de disco de hoja R₀. En dicha escala de clasificación, los controles negativos tendrán siempre una LDR de al menos 10.

Tabla 4. Escala de clasificaciones de daño de hoja (LDR) para ensayos de disco de hoja de R₀

Clasificación de daño de hoja (LDR)	Cantidad de daño por alimentación
1	≤5 %
2	≤10 %
3	≤15 %
4	≤20 %
5	≤25 %
6	≤30 %
7	≤35 %
8	≤40 %
9	≤45 %
10	≤50 %
11	>50 %

15

[147] La Tabla 5 muestra las clasificaciones de daño de hoja promedio para los 41 (cuarenta y un) eventos transformados con la Construcción MON95, lo que incluye el evento MON 95379. Tal como se puede ver en la Tabla 5, la expresión de las dos proteínas insecticidas, Cry1B.868 y Cry1Da_7, proveyó resistencia a cogollero del maíz

(FAW), gusano elotero (CEW) y barrenador del maíz (SWCB). Las LDR para los controles negativos fueron entre 10 y 11. Los FAW y SWCB consumieron solo aproximadamente 5 % (cinco por ciento) del disco de hoja del evento MON 95379 en comparación con los controles negativos, los cuales consumieron al menos 50 % (cincuenta por ciento) del disco de hoja. Con respecto al CEW, solo se consumió aproximadamente 6,25 % de los discos de hojas en comparación con los controles negativos, los cuales consumieron al menos 50 % (cincuenta por ciento) del disco de hoja. Además, 100 % (cien por ciento) de los FAW y CEW murieron después de consumir el evento MON 95379 que contiene discos de hojas.

Tabla 5. Calificaciones de clasificación de daño de hoja (LDR) promedio y mortalidad promedio para plantas R₀ con expresión de Cry1B.868 y Cry1Da_7

Evento	LDR promedio FAW	LDR promedio CEW	LDR promedio SWCB
MON 95379	1,00	1,25	1,00
Evento 2	1,00	2,00	1,00
Evento 3	1,00	1,00	1,00
Evento 4	1,00	1,25	1,00
Evento 5	1,00	1,50	1,00
Evento 6	1,00	3,25	1,00
Evento 7	1,00	2,25	1,00
Evento 8	1,00	1,50	1,00
Evento 9	1,00	1,75	1,00
Evento 10	1,00	2,25	1,25
Evento 11	1,00	1,75	1,00
Evento 12	1,00	1,25	1,00
Evento 13	1,00	1,25	1,00
Evento 14	1,00	3,75	1,00
Evento 15	1,00	1,00	1,00
Evento 16	1,00	1,25	1,25

Evento	LDR promedio FAW	LDR promedio CEW	LDR promedio SWCB
Evento 17	1,00	3,00	1,00
Evento 18	1,00	1,25	1,00
Evento 19	1,00	1,75	1,25
Evento 20	1,00	1,00	1,25
Evento 21	1,00	5,00	1,00
Evento 22	1,00	1,33	1,00
Evento 23	1,00	1,00	1,00
Evento 24	1,00	1,50	1,00
Evento 25	1,00	1,25	1,00
Evento 26	1,00	2,33	1,25
Evento 27	1,00	1,25	1,00
Evento 28	1,00	1,50	1,00
Evento 29	1,00	1,00	1,00
Evento 30	1,00	2,00	1,00
Evento 31	1,00	2,50	1,50
Evento 32	1,00	1,00	1,00
Evento 33	1,00	1,67	1,00
Evento 34	1,00	3,00	1,00
Evento 35	1,00	1,25	1,00
Evento 36	1,00	1,50	1,00
Evento 37	1,00	2,50	1,00
Evento 38	1,00	3,50	1,25
Evento 39	1,00	1,00	1,25
Evento 40	1,00	1,00	1,00
Evento 41	1,00	1,25	1,00

[148] Los 41 (cuarenta y un) eventos se cruzaron con plantas de variedad 93IDI3 no transgénicas. Se seleccionaron plantas de progenie heterocigotas F_1 que comprendían la Construcción MON95. Se infestó artificialmente a alrededor de 5 (cinco) plantas F_1 en un

5 invernadero para cada especie de plaga de insectos. Con respecto a FAW, se usaron aproximadamente 40 (cuarenta) neonatos para infestar cada planta F₁ en el verticilo de etapa V6 a V8. Con respecto a SWCB, se usaron aproximadamente 30 (treinta) neonatos para infestar cada planta F₁ en el verticilo de etapa V6 a V10. Se tomaron medidas de

5 daño de hoja para FAW y SWCB aproximadamente 14 (catorce) días después de la infestación. Las Tablas 6 y 7 muestran las escalas de clasificación de daño usadas para evaluar el daño de hoja.

10 **Tabla 6. Escala de clasificación de daño de hoja para plantas de maíz infestadas con FAW**

Clasificación de daño de hoja (LDR)	Descripción
0	Sin daño visible
1	Solo agujeros diminutos presentes en hojas de verticilo
2	Agujeros diminutos y lesiones circulares pequeñas presentes en hojas de verticilo
3	Lesiones circulares pequeñas y 1-3 lesiones alargadas pequeñas presentes en hojas enrolladas y de verticilo
4	4-6 lesiones alargadas de pequeñas a medianas presentes en 1-3 hojas de verticilo y enrolladas
5	4-6 lesiones alargadas grandes presentes en 1-3 hojas de verticilo y enrolladas y/o 1-3 lesiones uniformes a irregulares pequeñas o medianas comidas en hojas de verticilo y/o enrolladas
6	4-6 lesiones alargadas grandes presentes en 4-6 hojas de verticilo y enrolladas y/o 4-6 orificios grandes uniformes a irregulares comidas en hojas de verticilo y enrolladas
7	Más de 7 lesiones alargadas de todos los tamaños presentes en varias hojas de verticilo y enrolladas y

Clasificación de daño de hoja (LDR)	Descripción
	4-6 orificios grandes uniformes a irregulares comidos en las hojas de verticilo y enrolladas
8	Más de 7 lesiones alargadas de todos los tamaños en la mayoría de las hojas de verticilo y enrolladas y más de 7 orificios grandes uniformes a irregulares comidos en las hojas de verticilo y enrolladas
9	Hojas de verticilo y enrolladas casi totalmente destruidas, así como planta con señales de crecimiento impedido

Tabla 7. Escala de clasificación de daño de hoja para plantas de maíz infestadas con SWCB

Clasificación de daño de hoja (LDR)	Descripción
0	Sin lesiones
1	Pequeña cantidad de agujeros pequeños o minúsculos en las hojas
2	Pequeña cantidad de lesiones en forma de orificios por perdigones presentes
3	Lesiones en forma de orificios por perdigones comunes en varias hojas
4	Varias hojas con lesiones alargadas y en forma de orificios por perdigones
5	Varias hojas con lesiones alargadas
6	Varias hojas con lesiones alargadas de 2,5 cm de largo
7	Lesiones largas comunes en ~50 % de las hojas
8	Lesiones largas comunes en ~70 % de las hojas

Clasificación de daño de hoja (LDR)	Descripción
9	La mayoría de las hojas o todas ellas con lesiones largas

[149] También se evaluó la longitud de la perforación de tallo provocada por SWCB en las plantas F₁ infestadas con SWCB. Se rompieron los tallos de maíz de las plantas de maíz a aproximadamente el nivel de a vista para determinar la longitud de la perforación de los tallos y se usó la parte superior para inspeccionar el daño de perforación. Los tallos se dividieron con una cuchilla con dos mangos y la longitud del túnel perforado por SWCB se midió en centímetros (cm). En estos experimentos, la longitud del túnel se limitó a 10 cm (diez centímetros).

[150] De manera adicional, también se infestaron 5 (cinco) plantas F₁ para cada evento con CEW para medir la cantidad de daño causado por CEW en la mazorca de maíz. Se usaron aproximadamente 40 (cuarenta) larvas de CEW para infestar cada planta y se colocaron en las barbas verdes de plantas de etapa R₁. Una vez que transcurren 21 (veintiún) días desde la infestación, se examinaron las mazorcas en desarrollo y se registró el daño como cm² de daño de mazorca.

[151] La Tabla 8 muestra las clasificaciones de daño de hoja promedio para los eventos F₁ infestados con FAW y SWCB, las longitudes de las perforaciones de tallos provocadas por SWCB y el daño de mazorca provocado por CEW, en donde «NT» indica que no se evaluó.

Tabla 8. Clasificaciones de daño de hoja promedio de plantas de maíz transgénicas F₁ infestadas con FAW y SWCB, longitudes de perforaciones de tallo provocadas por SWCB y daño de mazorca provocado por CEW

Evento	LDR por FAW	LDR por SWCB	Longitud de túnel por SWCB (cm)	Daño de mazorca por CEW (cm² de daño)
MON 95379	0,30	1,00	0,00	3,25

Evento	LDR por FAW	LDR por SWCB	Longitud de túnel por SWCB (cm)	Daño de mazorca por CEW (cm² de daño)
Evento 2	0,50	1,00	0,00	3,25
Evento 3	0,30	1,00	0,00	0,00
Evento 4	0,30	1,30	0,00	2,30
Evento 5	1,00	1,00	0,00	1,00
Evento 6	0,30	1,00	0,00	0,00
Evento 7	0,80	0,50	0,00	3,00
Evento 8	0,50	1,00	0,00	0,00
Evento 9	1,30	0,80	0,00	0,25
Evento 10	NT	NT	NT	NT
Evento 11	NT	NT	NT	NT
Evento 12	0,30	1,00	0,00	3,50
Evento 13	NT	NT	NT	NT
Evento 14	NT	NT	NT	NT
Evento 15	NT	NT	NT	NT
Evento 16	NT	NT	NT	NT
Evento 17	0,50	NT	NT	NT
Evento 18	0,00	1,30	0,00	2,50
Evento 19	0,80	1,30	0,00	0,00
Evento 20	NT	NT	NT	NT
Evento 21	NT	NT	NT	NT
Evento 22	NT	NT	NT	NT
Evento 23	NT	NT	NT	NT
Evento 24	0,50	0,50	2,50	2,75
Evento 25	0,00	1,50	2,25	0,00
Evento 26	0,30	1,30	0,00	3,00
Evento 27	0,50	1,50	2,50	1,25

Evento	LDR por FAW	LDR por SWCB	Longitud de túnel por SWCB (cm)	Daño de mazorca por CEW (cm² de daño)
Evento 28	0,30	1,00	1,00	1,75
Evento 29	0,30	1,00	1,00	0,25
Evento 30	NT	NT	NT	NT
Evento 31	0,30	1,00	0,00	2,50
Evento 32	0,50	1,00	0,00	0,25
Evento 33	0,50	1,00	0,00	2,25
Evento 34	0,30	1,00	0,00	1,50
Evento 35	0,30	1,30	1,25	0,00
Evento 36	NT	NT	NT	NT
Evento 37	0,50	1,00	0,00	1,50
Evento 38	1,30	1,00	0,00	0,50
Evento 39	0,00	1,00	1,75	2,00
Evento 40	0,30	0,50	1,25	1,75
Evento 41	0,00	0,80	0,00	2,25
Control negativo	7,80	9,00	10,00	13,25

[152] Tal como se puede ver en la Tabla 8, el daño de hoja en el evento de maíz MON 95379 fue mínimo tanto para FAW como para SWCB cuando se comparó con los controles negativos. Esencialmente, una vez que los insectos comenzaron a alimentarse con la hoja F₁ de evento MON 95379, la expresión de las proteínas insecticidas Cry1B.868 y Cry1Da_7 en las hojas de maíz que contienen el evento MON 95379 provocó que el insecto dejara de consumir la hoja. No se observó formación de túneles por SWCB en el evento MON 95379, al tiempo que los controles negativos exhibieron amplia formación de túneles. Con respecto al daño de mazorca por CEW, el daño de la mazorca fue mucho menor en comparación con el control negativo y se comparó con el daño de mazorca observado en varios eventos de maíz transgénico comercialmente disponibles. La infestación de la magnitud usada en los ensayos de F₁ fue mucho mayor que la que

usualmente se ve en la naturaleza. Los ensayos de F_1 demostraron que el evento de maíz MON 95379 provee un control mayor de FAW, SWCB y CEW.

[153] Durante el verano de 2016, se evaluó la resistencia de la progenie F_1 de los 39 (treinta y nueve) eventos restantes luego de R_2/F_1 como se describe en el ejemplo 2/Tabla 3 a FAW, CEW y SWCB en experimentos de campo con infestación artificial. Se usaron múltiples ubicaciones para los ensayos de resistencia.

[154] Se realizaron ensayos de resistencia a FAW en 3 (tres) ubicaciones: Jerseyville, IL; Thomasboro, IL; y Union City, TN. En cada ubicación, se sometió cada evento a ensayo en 3 (tres) gráficas de campo con 1 (una) fila por gráfica y 30 (treinta) semillas por fila. Se usaron 40 (cuarenta) neonatos de FAW para infestar cada planta dos veces, en la etapa temprana y de verticilo intermedio (etapa vegetativa V4 y V7). Se evaluaron las clasificaciones de daño de consumo de hojas con la escala provista en la Tabla 6.

[155] Se realizaron ensayos de resistencia a SWCB en 3 (tres) ubicaciones: 1 (una) en Jonesboro, AR y 2 (dos) en Union City, TN. En cada ubicación, se sometió cada evento a ensayo en 3 (tres) gráficas de campo con 1 (una) fila por gráfica y 30 (treinta) semillas por fila. Se usaron 30 (treinta) neonatos de SWCB para infestar cada planta en la etapa de verticilo intermedio (V7-V8). En el momento de liberación de 50 % (cincuenta por ciento) del polen, se volvió a infestar las plantas con 30 (treinta) neonatos de SWCB por planta. Se evaluó el daño de formación de túneles en tallos tal como se describió anteriormente.

[156] Se realizaron ensayos de resistencia a CEW en 5 (cinco) ubicaciones: Jerseyville, IL, Jonesboro, AR, Monmouth, IL, Thomasboro, IL, y Union City, TN. En cada ubicación, se sometió cada evento a ensayo en 3 (tres) gráficas de campo con 1 (una) fila por gráfica y 30 (treinta) semillas por fila. Las plantas se infestaron cuando las barbas eran frescas y verdes, y se ha comenzado con formación de algunas barbas (etapa R1 a R3). Se usaron cintas de óvulos de CEW para la infestación. Cada cinta contenía aproximadamente 40 (cuarenta) óvulos. Se colocó 1 (una) cinta entre la mazorca y el tallo de cada planta, con los óvulos frente a la mazorca y cerca de los tallos. Se llevó a cabo una evaluación del daño de mazorcas 21 (veintiún) a 28 (veintiocho) días después de las infestaciones. Para dicho punto, el insecto evolucionó de la etapa larval a la etapa de pupa. Se midió el daño a las mazorcas tal como se describió anteriormente.

[157] En el caso de FAW y SWCB, se usaron datos de las 3 (tres) ubicaciones. En el caso de CEW, debido a varias condiciones de campo, solo se podrían usar datos de Jonesboro, Ar. La Tabla 9 muestra las clasificaciones de daño de hoja por FAW promedio, las longitudes de los túneles de SWCB y las medidas de daño de mazorca de CEW para

cada uno de los eventos evaluados y el control negativo.

Tabla 9. Clasificaciones de daño de hoja por FAW promedio, longitud de túnel formado por SWCB y daño de mazorca por CEW para ensayos de eficacia de campo de 2016

Evento	LDR por FAW	Longitud de túnel por SWCB (cm)	Daño mazorca por CEW (cm2)
MON 95379	1,56	0,37	2,86
Evento 2	1,28	1,84	4,41
Evento 3	1,33	0,14	3,28
Evento 4	2,01	0,11	3,00
Evento 5	1,83	0,89	4,09
Evento 6	1,46	1,09	2,89
Evento 7	1,67	0,39	3,40
Evento 8	1,44	0,72	3,19
Evento 9	1,59	0,00	3,98
Evento 10	2,85	0,35	2,96
Evento 11	1,50	2,59	2,84
Evento 12	1,39	0,42	3,04
Evento 13	1,74	0,00	3,34
Evento 14	2,52	1,22	3,01
Evento 15	1,53	0,22	3,09
Evento 16	1,50	1,61	3,24
Evento 17	2,31	1,72	2,80
Evento 18	1,70	0,13	4,02
Evento 19	1,28	1,00	3,96
Evento 20	1,28	0,52	2,79
Evento 21	1,39	0,39	3,55
Evento 22	1,72	0,94	4,34

Evento	LDR por FAW	Longitud de túnel por SWCB (cm)	Daño mazorca por CEW (cm2)
Evento 23	1,86	0,22	3,04
Evento 24	1,93	0,00	3,60
Evento 25	1,57	0,06	2,28
Evento 26	1,65	0,00	2,28
Evento 27	1,65	0,28	2,73
Evento 28	1,63	2,72	3,60
Evento 29	2,62	0,78	3,42
Evento 30	4,78	12,59	5,25
Evento 31	1,78	1,81	3,79
Evento 32	1,63	0,00	3,08
Evento 33	1,37	0,00	3,40
Evento 34	1,80	0,19	3,20
Evento 35	2,20	0,84	3,99
Evento 36	1,96	0,22	3,78
Evento 37	1,35	0,06	3,07
Evento 38	1,22	0,27	3,94
Evento 39	1,46	0,14	2,87
Control negativo	7,15	7,21	32,25

[158] Tal como se demuestra en la Tabla 9, el evento MON 95379 proveyó control excelente de FAW, SWCB y CEW en comparación con el control negativo. El nivel de infestación en dichos ensayos fue mucho mayor que lo que normalmente se observaría en el campo en condiciones naturales, lo que demuestra el mejor rendimiento del evento MON 95379 en condiciones de presión elevada de insectos.

[159] Durante ensayos de campo y escisión de Cre simultáneos del casete de selección y la producción de semilla Gold Standard, se llevó a cabo caracterización adicional de los

eventos. Como resultado de la caracterización molecular extensiva, eficacia, expresión y ensayos agronómicos, se omitieron eventos de la evaluación, lo que deja 2 (dos) eventos: Evento 1 y MON 95379. Se redujo la prioridad del Evento 1 con base en la reducción de la producción observada en estudios agronómicos, por lo que continúa el evento MON 95379.

[160] Durante la época de cultivo 2016 a 2017 en Argentina, se sometió el evento MON 95379 a ensayo de resistencia a FAW, CEW y SCB en regiones templadas y subtropicales en condiciones de infestación natural. Se determinaron las clasificaciones de daño de hoja por FAW para el evento MON 95379 cultivado en la región subtropical de Argentina con la escala provista en la Tabla 6. Se obtuvieron datos de formación de túneles de SCB para el evento MON 95379 de 2 (dos) ubicaciones en la región templada de Argentina. Se obtuvieron datos de daño de mazorca por CEW para el evento MON 95379 de 2 (dos) ubicaciones en la región templada de Argentina y 3 (tres) ubicaciones en las regiones subtropicales de Argentina. La Tabla 11 muestra las clasificaciones de daño de hoja por FAW promedio, la longitud de túnel formado por SCB y el daño de mazorca por CEW en condiciones de infestación natural para el evento MON 95379 y un control negativo durante las épocas de cultivo 2016-2017 en Argentina.

Tabla 10. Clasificaciones de daño de hoja por FAW promedio, longitud de túnel formado por SCB y daño de mazorca por CEW para ensayos de eficacia de campo de 2016-2017 en Argentina

Evento	FAW (LDR)	Longitud de túnel por SCB (cm)	Daño mazorca por CEW (cm2)
MON 95379	1,27	0,00	1,32
Control negativo	7,48	4,43	5,83

[161] Tal como se puede ver en la Tabla 10, el evento MON 95379 proveyó resistencia a FAW, SCB y CEW en comparación con el control negativo en condiciones de infestación natural en Argentina.

[162] También se evaluó la resistencia del evento MON 95379 a FAW resistente a un evento de maíz comercialmente disponible (MON89034, el cual expresa Cry1a.105 y

Cry2Ab2) durante 3 (tres) épocas de cultivo en Puerto Rico (enero de 2016, julio de 2016 y enero de 2017). La Tabla 11 muestra las clasificaciones de daño de hoja promedio con base en la escala presentada en la Tabla 6 para cada una de las 3 (tres) épocas de cultivo en comparación con el evento MON89034 y el control negativo.

5

Tabla 11. Clasificaciones de daño de hoja promedio para evento MON 95379 y evento MON89034 con infestación natural con FAW resistente al evento MON89034

Evento	Enero de 2016	Julio de 2016	Enero de 2017
MON 95379	2,30	2,22	1,40
MON89034	5,68	4,54	7,36
Control negativo	8,73	6,84	9,00

[163] Tal como se puede ver en la Tabla 11, el evento MON 95379 exhibió resistencia a FAW resistente al evento MON89034 a presión natural elevada con respecto al control negativo.

[164] Durante el verano de 2017, se evaluó la resistencia del evento MON 95379 contra FAW, SWCB y CEW en los Estados Unidos con métodos similares a los descritos para el verano de 2016. Se realizaron ensayos de resistencia a FAW en 3 (tres) ubicaciones: Jerseyville, IL; Thomasboro, IL; y Monmouth, IL. En cada ubicación, se sometió cada evento a ensayo en 3 (tres) gráficas de campo con 1 (una) fila por gráfica y 30 (treinta) semillas por fila. Se usaron 40 (cuarenta) neonatos de FAW para infestar cada planta dos veces. La primera infestación se produjo alrededor de la etapa V5. La segunda infestación de plantas en Monmouth, IL y Jerseyville, IL se produjo alrededor de la etapa V8. Debido a una baja tasa de maduración y a clima desfavorable, no fue posible una segunda infestación en Thomasboro, IL. Se evaluaron las clasificaciones de daño de consumo de hojas por FAW con la escala provista en la Tabla 6.

[165] Se realizaron ensayos de resistencia a SWCB en 3 (tres) ubicaciones: 1 (una) en Jonesboro, AR y 2 (dos) en Union City, IL. En cada ubicación, se sometió cada evento a ensayo en 3 (tres) gráficas de campo con 1 (una) fila por gráfica y 30 (treinta) semillas por fila. Se usaron 30 (treinta) neonatos de SWCB para infestar cada planta dos veces. En condiciones normales, la primera infestación se lleva a cabo en la etapa de vertilicio intermedio (V7-V8) en la mitad de la fila, pero se retrasó la infestación alrededor de una

semana. Independientemente, se estableció una presión de insectos fuerte. En el momento de liberación de 50 % (cincuenta por ciento) del polen, se infestó la mitad de la fila de plantas con 30 (treinta) neonatos de SWCB por planta. Se evaluó el daño de formación de túneles en tallos tal como se describió anteriormente.

- 5 [166] Se realizaron ensayos de resistencia a CEW en 6 (seis) ubicaciones: Jerseyville, IL, Jonesboro, AR, Paragould, AR, Monmouth, IL, y dos ubicaciones en Union City, TN. En cada ubicación, se sometió cada evento a ensayo en 3 (tres) gráficas de campo con 1 (una) fila por gráfica y 30 (treinta) semillas por fila. Debido a una escasez de insectos, las infestaciones en Monmouth, IL, y Jerseyville, IL, se infestaron 2 (dos) a 3 (tres) semanas
- 10 después de cuando las barbas se encuentran frescas y verdes. En Monmouth, se usaron aproximadamente 22 (veintidós) neonatos para infestar cada planta. En Jerseyville, IL, se usaron 23 (veintitrés) a 24 (veinticuatro) neonatos para infestar mazorcas de maíz parcialmente abiertas. En Jonesboro, AR, 1 (una) de las 3 (tres) filas recibió aproximadamente 30 (treinta) neonatos por planta y las otras 2 (dos) filas recibieron 16
- 15 (dieciséis) a 18 (dieciocho) neonatos por planta. En Paragould, AR, las 3 (tres) filas recibieron aproximadamente 30 (treinta) neonatos por planta. Se retrasó la infestación en las dos ubicaciones en Union City, TN, debido a la disponibilidad de insectos. Ambas ubicaciones recibieron 18 (dieciocho) neonatos por planta. Se llevó a cabo una evaluación del daño de mazorcas 21 (veintiún) a 28 (veintiocho) días después de las infestaciones. El
- 20 daño a las mazorcas se expresó tal como se describió anteriormente. Se llevaron a cabo infestaciones artificiales tanto en plantas de evento MON 95379 con marcador como libres de marcador. Además, también se llevaron a cabo ensayos con la presión de insectos natural en las ubicaciones para las plantas de evento MON 95379 que contienen marcador. Las Tablas 12 y 13 muestran las clasificaciones de daño de hoja por FAW, las
- 25 longitudes de túneles formados por SWCB y el daño de mazorca por CEW para plantas de evento MON 95379 que contienen marcador y libres de marcador.

30 **Tabla 12. Clasificaciones de daño de hoja por FAW promedio, longitud de túnel formado por SWCB y daño de mazorca por CEW para plantas de evento MON 95379 antes de la escisión de Cre del marcador de selección en condiciones de infestación artificial y natural**

Antes de la escisión de Cre del marcador CP4

Evento	Infestación artificial con FAW (LDR)	Infestación natural con FAW (LDR)	Infestación artificial con CEW (cm2)	Infestación natural con CEW (cm2)	Longitud de túnel por infestación artificial con SWCB (cm)
MON 95379	1,17	1,15	4,93	5,81	0,00
Control negativo	7,08	8,15	8,49	14,57	14,34

Tabla 13. Clasificaciones de daño de hoja por FAW promedio, longitud de túnel formado por SWCB y daño de mazorca por CEW para plantas de evento MON 95379 libre de marcador con infestación artificial

Luego de la escisión de Cre del marcador CP4			
Evento	Infestación artificial con FAW (LDR)	Infestación artificial con CEW (cm2)	Longitud de túnel por infestación artificial con SWCB (cm)
MON 95379	1,20	5,39	0,27
Control negativo	7,08	8,49	14,34

5

[167] Tal como se puede ver en las Tablas 12 y 13, el evento MON 95379 proveyó resistencia contra FAW, SWCB y CEW en condiciones de infestación artificial (con marcador y libre de marcador) y natural (libre de marcador)

[168] En 2018, se sometió un cruzamiento híbrido de evento MON 95379 con evento MON89034 a ensayo para determinar la resistencia a FAW en un ensayo de campo en Brasil en condiciones de infestación natural. El ensayo de campo se realizó en Santa Helena de Goiás, estado de Goiás. En esta ubicación se encuentran poblaciones de FAW resistentes a evento de maíz transgénico MON89034. Se plantaron plantas de maíz transgénicas correspondientes al cruzamiento de eventos MON 95379 x MON89034,

10

evento MON89034 y una planta de maíz convencional (control negativo). En la etapa V6, se determinaron las calificaciones de clasificación de daño de hoja para 60 (sesenta) plantas correspondientes al cruzamiento de eventos MON 95379 x MON89034, 30 (treinta) plantas correspondientes al evento MON89034 y 30 (treinta) controles negativos con la escala presentada en la Tabla 6. Además, se registró la cantidad de neonatos de FAW, larvas de más de 2 mm (dos milímetros) y de hasta 1,5 centímetros, y larvas de más de 1,5 centímetros para cada planta. La Tabla 14 muestra las clasificaciones de daño de hoja promedio para el cruzamiento de eventos MON 95379 x MON89034, evento MON89034 y el control negativo junto con las cantidades de neonatos y larvas que se observan en las plantas de maíz.

Tabla 14. Clasificación de daño de hoja por FAW promedio y cantidad de neonatos y larvas de ensayos de campo de 2018 de Brasil para el cruzamiento de eventos MON 95379 x MON89034, evento MON89034 y control negativo

Evento	FAW (LDR)	Neonatos	Larvas >2 mm y ≤1,5 cm	Larvas >1,5 cm
MON 95379 x MON89034	0,62	0	0	0
MON89034	1,47	6	16	0
Control negativo	5,20	0	22	9

[169] Tal como se puede ver en la Tabla 14, el cruzamiento de eventos MON 95379 x MON89034 proveyó resistencia a FAW en condiciones de infestación natural con respecto al control negativo. El cruzamiento de eventos MON 95379 x MON89034 también tuvo mejor rendimiento que el evento MON89034 en condiciones en las que la población de FAW incluye FAW resistentes al evento MON89034. Con respecto a neonatos y larvas, no se observaron en las plantas correspondientes al cruzamiento de eventos MON 95379 x MON89034. Se observaron neonatos y larvas de entre 2 (dos) milímetros y 1,5 (uno y medio) centímetro en plantas de evento MON89034. Se observó que las plantas de control negativo presentaron incluso más larvas que las plantas de evento MON89034 y larvas que crecieron más de 1,5 centímetros.

EJEMPLO 5

Ensayo de actividad de evento de maíz MON 95379 contra barrenador de tallo de

maíz menor

[170] Este ejemplo describe el ensayo de actividad del evento de maíz transgénico MON 95379 contra la plaga de insectos lepidópteros barrenador de tallo de maíz menor (LSCB, *Elasmopalpus lignosellus*).

- 5 [171] Se cultivó el evento MON 95379 en un invernadero junto con plantas de control negativo y se infestaron con neonatos de LSCB. Se cultivaron 10 (diez) plantas de evento MON 95379 y 9 (nueve) plantas de control negativo en macetas individuales. Se infestó cada planta con 10 (diez) neonatos de LSCB por planta 9 (nueve) días después de plantarlas. Tras 22 (veintidós) días desde la infestación, se examinaron las plantas y se
- 10 clasificó el daño con una escala de clasificación de daño de 0-4 presentada en la Tabla 15.

Tabla 15. Escala de clasificación de daño de planta por LSCB

Clasificación de daño por LSCB	Gravedad del daño	Descripción
0	Sin daño	Plantas sin daño
1	Daño leve	Plantas con rasguños en hojas y/o tallo
2	Daño promedio	Plantas con partes del tallo dañadas
3	Daño grave	Plantas con daño en partes del tallo y síntomas de corazón muerto
4	Planta muerta	Plantas muertas

- 15 [172] Se presentan las clasificaciones de daño por LSCB resultantes para cada planta en la Tabla 16.

Tabla 16. Daño de plantas por LSCB para cada planta infestada

Planta	MON 95379	Control negativo
1	0	4
2	0	2
3	0	3

4	0	3
5	0	4
6	0	3
7	0	3
8	0	4
9	0	4
10	0	

[173] Tal como se puede ver en la Tabla 16, LSCB produjo mucho daño en las plantas de control negativo, 4 (cuatro) de las cuales se clasificaron como «Muertas», 4 (cuatro) de las cuales se clasificaron como «Daño grave» y solo 1 (una) se clasificó como «Daño promedio». En contraste, las plantas infestadas con LSCB de evento MON 95379 no exhibieron daños.

[174] El evento de maíz transgénico MON 95379 provee resistencia a barrenador de tallo de maíz menor (LSCB, *Elasmopalpus lignosellus*).

EJEMPLO 6

Evento de maíz MON 95379 provee un rendimiento constante y características agronómicas similares a plantas de maíz LH244 no transformadas

[175] Este ejemplo demuestra que el evento de maíz transgénico MON 95379 provee rendimientos constantes y características agronómicas similares en el caño de plantas de maíz LH244 no transformadas.

[176] Se llevaron a cabo ensayos de campo con plantas correspondientes al evento MON 95379 antes de la escisión de Cre del casete de selección de glifosato para determinar varios aspectos de rendimiento y características agronómicas en comparación con plantas de control. Se calcularon medidas de rendimiento y se expresaron como bushels por acre (bu/acre). La altura de la planta y la altura de la mazorca se midieron en pulgadas (in). El 50 % (cincuenta por ciento) de liberación de polen y 50 % (cincuenta por ciento) de maduración se expresaron como días luego de la siembra (DAP). El peso de prueba, el cual es una medida de densidad aparente, o el peso de un volumen de unidad de grano se expresó como libras por bushel (lb/bu). El USDA estableció el peso de prueba como el peso de prueba estándar de un bushel de maíz como 56 lb/bu (cincuenta y seis libras por bushel) con base en un contenido de humedad de 15,5 %. El porcentaje de humedad del grano de maíz se expresó con base en peso en seco. El contenido de

humedad es la cantidad de agua en la semilla y se suele expresar como un porcentaje. Este se puede expresar tanto con base en peso húmedo (donde se expresa como un porcentaje del peso fresco de la semilla) o con base en peso en seco (donde se expresa como un porcentaje del peso en seco de la semilla). La determinación del porcentaje de humedad destruye la semilla. El porcentaje de humedad (con base húmeda) se puede calcular con la fórmula simple:

$$M_{wb} = (W_w / (W_w + W_d)) \times 100$$

donde W_w es igual al peso de agua y W_d es igual al peso de la materia seca.

[177] En la época de cultivo de 2016 en los Estados Unidos, se determinaron medidas de características agronómicas y rendimiento para productos endogámicos de evento MON 95379 e híbridos previos a la escisión de Cre del casete de producción de glifosato. Las Tablas 17 y 18 muestran el rendimiento y las características agronómicas medidas para los productos endogámicos e híbridos del evento MON 95379, respectivamente. Las plantas de control negativo para las comparaciones de productos endogámicos fueron de la variedad LH244 no transformada. Los híbridos que contienen evento MON 95379 se crearon mediante polinización cruzada del evento endogámico MON 95379 con la variedad de maíz 93IDI3 y el control no transformado fue un cruzamiento LH244 x 93IDI3.

Tabla 17. Rendimiento y características agronómicas para productos endogámicos de evento MON 95379 con respecto a controles no transgénicos

Evento	Rendimiento (bu/acre)		Altura de planta (in)		Altura de mazorca (in)		Liberación de polen 50 % (DAP)		50 % maduración (DAP)	
	Prom.	SE	Prom.	SE	Prom.	SE	Prom.	SE	Prom.	SE
MON 95379	111,08	5,17	85,40	2,72	41,29	1,45	65,11	2,00	65,77	2,05
LH244	114,18	5,02	82,05	2,32	38,73	1,33	62,60	1,79	63,54	1,82

Tabla 18. Rendimiento y características agronómicas para híbridos de evento MON 95379 con respecto a controles no transgénicos

Rendimiento (bu/acre)	Peso de prueba (lb/bu)	Porcentaje de humedad
--------------------------	---------------------------	--------------------------

Evento	Promedio	SE	Promedio	SE	Promedio	SE
MON 95379 x 93IDI3	203,48	7,04	58,78	0,61	16,04	0,42
LH244 x 93IDI3	196,45	6,81	58,31	0,61	15,89	0,43

[178] Tal como se puede ver en las Tablas 17 y 18, el rendimiento y otras medidas de características agronómicas para el evento MON 95379 en los ensayos de campo de 2016 en los Estados Unidos fueron relativamente los mismos tanto para híbridos como para productos endogámicos con respecto a los controles. La variabilidad entre productos endogámicos e híbridos y sus controles respectivos se encontró entre límites aceptables y demostró que la inserción del ADN-T en el genoma de maíz del evento MON 95379 no tuvo impacto negativo en el rendimiento y otras características agronómicas.

[179] También se estudiaron el rendimiento y las características agronómicas en Argentina durante la época de cultivo de 2016 a 2017 para productos endogámicos e híbridos del evento MON 95379 antes de la escisión de Cre del casete de marcador de glifosato. Las Tablas 19 y 20 muestran el rendimiento y las características agronómicas medidas para los productos endogámicos del evento MON 95379. Las plantas de control negativo para las comparaciones de productos endogámicos fueron de la variedad LH244 no transformada. Los híbridos que contienen evento MON 95379 se crearon mediante la polinización cruzada de eventos MON89034 x MON895379. El control transgénico fue evento MON88017 x evento MON89034. El control no transgénico fue un cruzamiento LH244 x 93IDI3. La Tabla 21 muestra el rendimiento y las características agronómicas medidas para los híbridos del evento MON 95379, en donde «NC» indica que no se calculó.

Tabla 19. Rendimiento y características agronómicas para productos endogámicos de evento MON 95379 con respecto a controles no transgénicos

Evento	Rendimiento (bu/acre)		Altura de planta (in)		Altura de mazorca (in)		Liberación de polen 50 % (DAP)		50 % maduración (DAP)	
	Prom.	SE	Prom.	SE	Prom.	SE	Prom.	SE	Prom.	SE
MON	113,39	4,57	73,89	1,05	38,38	0,95	64,32	0,60	64,68	0,62

95379										
LH244	105,49	NC	71,69	NC	36,66	NC	64,86	NC	65,17	NC

Tabla 20. Rendimiento y características agronómicas para productos endogámicos de evento MON 95379 con respecto a controles no transgénicos

Evento	Peso de prueba (lb/bu)		Porcentaje de humedad	
	Promedio	SE	Promedio	SE
MON 95379	59,28	0,10	16,54	0,26
LH244	59,32	NC	16,01	NC

5 **Tabla 21. Rendimiento y características agronómicas para híbridos de evento MON 95379 con respecto a controles transgénicos y no transgénicos**

Evento	Rendimiento (bu/acre)		Peso de prueba (lb/bu)		Porcentaje de humedad	
	Prom.	SE	Prom.	SE	Prom.	SE
MON89034 x MON 95379	165,80	5,94	60,06	0,20	15,12	0,18
MON88017 x MON89034	164,87	5,94	59,62	0,20	15,45	0,18
LH244 x 93IDI3	166,82	NC	59,70	NC	15,38	NC

10 [180] Tal como se puede ver en las Tablas 19 a 21, las medidas de rendimiento y otras características agronómicas fueron relativamente las mismas para productos endogámicos e híbridos del evento MON 95379 con respecto a los controles.

[181] En 2017, se volvieron a medir en ensayos de campo el rendimiento y las características agronómicas en ensayos de campo en los Estados Unidos para productos endogámicos e híbridos del evento MON 95379 antes de la escisión de Cre del casete de marcador de casete de glifosato. Los controles de productos endogámicos e híbridos fueron similares a los usados en los ensayos de campo de 2016 en los Estados Unidos. La Tabla 22 muestra el rendimiento y las características agronómicas de los productos endogámicos del evento MON 95379 con respecto a controles no transgénicos, y las Tablas 23 y 24 muestran el rendimiento y las características agronómicas medidos para

los híbridos del evento MON 95379 con respecto a controles no transgénicos en los ensayos de campo de 2017 en los Estados Unidos.

5 **Tabla 22. Rendimiento y características agronómicas para productos endogámicos de evento MON 95379 con respecto a controles no transgénicos**

Evento	Rendimiento (bu/acre)		Peso de prueba (lb/bu)		Porcentaje de humedad	
	Promedio	SE	Promedio	SE	Promedio	SE
MON 95379	116,49	5,45	57,86	0,59	21,16	0,76
LH244	124,46	5,39	58,60	0,58	20,57	0,76

Tabla 23. Rendimiento y características agronómicas para híbridos de evento MON 95379 con respecto a controles no transgénicos

Evento	Rendimiento (bu/acre)		Altura de planta (in)		Altura de mazorca (in)		Liberación de polen 50 % (DAP)		50 % maduración (DAP)	
	Prom.	SE	Prom.	SE	Prom.	SE	Prom.	SE	Prom.	SE
MON 95379 x 93IDI3	213,15	4,84	99,14	2,50	45,27	1,77	56,65	0,93	57,17	1,06
LH244 x 93IDI3	217,86	4,44	97,42	2,28	45,61	1,45	55,87	0,91	56,47	1,04

10 **Tabla 24. Rendimiento y características agronómicas para híbridos de evento MON 95379 con respecto a controles no transgénicos**

Evento	Peso de prueba (lb/bu)		Porcentaje de humedad	
	Promedio	SE	Promedio	SE
MON 95379 x 93IDI3	57,98	0,37	19,73	0,51
LH244 x 93IDI3	57,53	0,36	19,74	0,50

[182] Tal como se puede ver en las Tablas 22 a 24, el rendimiento y otras propiedades agronómicas del evento MON 95379 exhibidas en los ensayos de campo de 2017 en los Estados Unidos fueron similares a los controles no transformados tanto para líneas endogámicas como híbridas.

5 [183] Durante la época de cultivo de 2018 a 2019 en Argentina, se midieron las características agronómicas y el rendimiento en ensayos de campo para productos endogámicos e híbridos del evento MON 95379 luego de la escisión de Cre del casete de marcador de glifosato. Los controles de productos endogámicos fueron similares a los usados en los ensayos de campo de 2017 en los Estados Unidos. Los híbridos se
10 produjeron mediante cruzamientos con la variedad de élite 80IDM2. Las Tablas 25 y 26 muestran el rendimiento y las características agronómicas de los productos endogámicos del evento MON 95379 con respecto a controles no transgénicos, y la Tabla 27 muestra el rendimiento y las características agronómicas medidos para los híbridos del evento MON 95379 con respecto a controles no transgénicos en los ensayos de campo de 2018 y 2019
15 en Argentina.

Tabla 25. Rendimiento y características agronómicas para productos endogámicos de evento MON 95379 con respecto a controles no transgénicos

Evento	Rendimiento (bu/acre)		Altura de planta (in)		Altura de mazorca (in)		Liberación de polen 50 % (DAP)		50 % maduración (DAP)	
	Prom.	SE	Prom.	SE	Prom.	SE	Prom.	SE	Prom.	SE
MON 95379	92,81	7,30	85,14	2,45	40,57	2,06	62,74	0,61	63,77	0,65
LH244	103,46	7,68	83,93	1,72	38,57	1,24	62,93	0,61	63,88	0,71

20 **Tabla 26. Rendimiento y características agronómicas para productos endogámicos de evento MON 95379 con respecto a controles no transgénicos**

Evento	Peso de prueba (lb/bu)		Porcentaje de humedad	
	Promedio	SE	Promedio	SE
MON 95379	59,59	1,52	17,49	0,96
LH244	60,34	0,97	17,24	0,69

Tabla 27. Rendimiento y características agronómicas para híbridos de evento MON 95379 con respecto a controles no transgénicos

Evento	Rendimiento (bu/acre)		Peso de prueba (lb/bu)		Porcentaje de humedad	
	Promedio	SE	Promedio	SE	Promedio	SE
MON 95379 x 80IDM2	206,86	8,37	59,42	0,46	19,03	0,84
LH244 x 80IDM2	207,81	8,11	59,22	0,45	19,12	0,83

[184] Tal como se puede ver en las Tablas 25 a 27, el rendimiento y otras propiedades agronómicas del evento MON 95379 exhibidas en los ensayos de campo de 2017 a 2018 en Argentina fueron similares a los controles no transformados tanto para líneas endogámicas como híbridas.

[185] Por lo tanto, en resumen, el evento MON 95379 exhibió rendimiento y otras propiedades agronómicas similares en 4 (cuatro) épocas de cultivo independientes en los Estados Unidos y Argentina. El evento MON 95379 no afecta de forma negativa el rendimiento ni provoca un cambio en otras propiedades agronómicas medidas en comparación con controles no transgénicas y transgénicas.

EJEMPLO 7

Ensayos TAQMAN® de criterios de valoración específicos para el evento de maíz MON 95379

[186] El siguiente ejemplo describe métodos útiles para identificar la presencia del evento MON 95379 en una muestra de maíz. Se diseñaron un par de cebadores de PCR y una sonda con el fin de identificar la única unión formada entre el ADN genómico de maíz y el ADN insertado del evento MON 95379 en una PCR TAQMAN® de criterio de valoración específico del evento. Se describen ejemplos de condiciones utilizadas para identificar la presencia de evento MON 95379 en una muestra de maíz en una PCR TAQMAN® de criterio de valoración específico del evento en la Tabla 28 y la Tabla 29.

[187] La secuencia del cebador directo de oligonucleótido SQ21529 (SEQ ID NO:15) es idéntica a la secuencia de nucleótidos que corresponde a las posiciones 833-852 de la SEQ ID NO:10. La secuencia del cebador inverso de oligonucleótido SQ21524 (SEQ ID NO:16) es idéntica al complemento inverso de la secuencia de nucleótidos que

corresponde a las posiciones 905-934 de la SEQ ID NO:10. La secuencia del cebador de oligonucleótido PB10269 (SEQ ID NO:17) es idéntica al complemento inverso de la secuencia de nucleótidos que corresponde a las posiciones 886-901 de la SEQ ID NO:10. Es posible usar los cebadores SQ21529 (SEQ ID NO:15) y SQ21524 (SEQ ID NO:16) con la sonda PB10269 (SEQ ID NO:17), la cual se puede marcar de forma fluorescente (por ejemplo, un marcador fluorescente 6-FAMTM), en un ensayo de PCR TAQMAN® de criterio de valoración para identificar la presencia de ADN derivado del evento MON 95379 en una muestra.

[188] Además de SQ21529 (SEQ ID NO:15), SQ21524 (SEQ ID NO:16) y PB10269 (SEQ ID NO:17), será evidente para los expertos en la técnica que se pueden diseñar otros cebadores y/o sondas, ya sea para amplificación o hibridación con las secuencias dentro de la SEQ ID NO:10 que son únicas, y útiles, para detectar la presencia de ADN derivado del evento MON 95379 en una muestra.

[189] De acuerdo con prácticas convencionales de laboratorio de biología molecular, se desarrollaron ensayos de PCR para la detección del evento MON 95379 en una muestra. Se optimizaron los parámetros de un ensayo de PCR estándar o un ensayo de PCR TAQMAN® con cada conjunto de pares de cebadores y sondas (por ejemplo, sondas marcadas con una etiqueta fluorescente tal como 6-FAMTM) que se usan para detectar la presencia de ADN derivado del evento MON 95379 en una muestra. Un control para la reacción de PCR incluye cebadores de control internos y una sonda de control interna (por ejemplo, marcada con VIC®) específica para una región en el genoma de maíz que se usa como un control interno y son cebadores SQ20222 (SEQ ID NO:18), SQ20221 (SEQ ID NO:19) y sonda PB50237 marcada con VIC® (SEQ ID NO:20).

[190] Generalmente, los parámetros que se optimizaron para la detección del evento MON 95379 en una muestra incluyeron concentración de sonda y cebador, cantidad de ADN de plantilla y parámetros de ciclos de amplificación mediante PCR. Los controles para este análisis incluyen un control positivo de maíz que contiene el evento MON 95379, un control negativo de maíz no transgénico y un control negativo que no contiene ADN de plantilla.

Tabla 28. Componentes de reacción de PCR TAQMAN® de criterio de valoración específico del evento MON 95379

Etapas	Reactivo	Concentración de solución madre (µM)	Volumen (µl)	Concentración final (µM)	Comentarios
	Volumen de reacción		5		
1	2X mezcla maestra		2,28		1X concentración final
2	Cebador específico del evento SQ51219	100	0,05	0,9	
3	Cebador específico del evento SQ21524	100	0,05	0,9	
4	Sonda 6FAM™ específica del evento PB10269	100	0,01	0,2	La sonda es sensible a la luz
5	Cebador de control interno SQ20222	100	0,05	0,9	
6	Cebador de control interno SQ20221	100	0,05	0,9	
7	Sonda VIC® de control interno	100	0,01	0,2	La sonda es sensible a la luz

Etapas	Reactivo	Concentración de solución madre (µM)	Volumen (µl)	Concentración final (µM)	Comentarios
	PB50237				
8	ADN extraído (plantilla): • Muestras de hojas para analizar • Control negativo (ADN no transgénico) • Control de agua negativo (control sin plantilla) • ADN de MON 95379 de control cualitativo positivo		2,5		Se llevan a cabo reacciones separadas para cada plantilla.

Tabla 29. Condiciones de termociclador TAQMAN® de criterio de valoración

Etapas n.º	Cantidad de ciclos	Configuraciones
1	1	95 °C 20 segundos
2	40	95 °C 3 segundos
		60 °C 20 segundos
3	1	10 °C

EJEMPLO 8**Ensayos para determinar cigosidad para el evento MON 95379 con TAQMAN® y
detección de los transgenes de toxinas de insectos**

- 5 [191] El siguiente ejemplo describe métodos útiles para identificar la cigosidad del evento MON 95379 y detectar los transgenes de toxina de insecto en el evento MON 95379 en una muestra de maíz. Se diseñan pares de cebadores de PCR y una sonda con el fin de identificar propiedades específicas de alelos positivos y negativos para la inserción de ADN-T que generó el evento MON 95379.
- 10 [192] Un ensayo de cigosidad es útil para determinar si una planta que comprende un evento es homocigota para el ADN del evento (es decir, comprende el ADN exógeno en la misma ubicación en cada cromosoma del par de cromosomas), es heterocigota para el ADN del evento (es decir, comprende el ADN exógeno solamente en un cromosoma del par de cromosomas) o es de tipo salvaje (es decir, nula para el ADN del evento).
- 15 [193] Se usó un método de amplificación térmica TAQMAN® de criterio de valoración para desarrollar un ensayo de cigosidad para el evento MON 95379. El ensayo usa un par de cebadores y una sonda para detectar amplicones correspondientes a una de las dos secuencias de codificación de toxinas de insectos que codifican Cry1B.868 y Cry1Da_7 comprendidas en el ADN-T usado para generar el evento de maíz MON 95379. Además,
- 20 se usan un par de cebadores y una sonda para detectar un control interno de copia simple que se ubica dentro del genoma de maíz y conocido por encontrarse presente como un alelo homocigoto.
- [194] Se mezclaron 2 (dos) pares de cebadores y 2 (dos) sondas junto con la mezcla para este ensayo. Los cebadores de ADN usados en el ensayo de cigosidad que detectan
- 25 la presencia de la secuencia de codificación de toxina Cry1B.868 fueron los cebadores SQ50998 (SEQ ID NO:21) y SQ50997 (SEQ ID NO:22). La sonda de ADN marcada con VIC® usada en el ensayo de cigosidad que detecta la presencia de la secuencia de codificación de toxina Cry1B.868 fue PB54340 (SEQ ID NO:23). Los cebadores de ADN usados en el ensayo de cigosidad que detectan la presencia de la secuencia de
- 30 codificación de toxina Cry1Da_7 fueron los cebadores SQ50485 (SEQ ID NO:24) y SQ50484 (SEQ ID NO:25). La sonda de ADN marcada con VIC® usada en el ensayo de cigosidad que detecta la presencia de la secuencia de codificación de toxina Cry1Da_7 fue PB50138 (SEQ ID NO:26). Ambos ensayos de detección de cigosidad usan el mismo control interno. Los cebadores para el control interno fueron SQ20222 (SEQ ID NO:18) y

SQ20221 (SEQ ID NO:19), y la sonda marcada con 6FAM™ para control interno fue PB50237 (SEQ ID NO:20). Los cebadores de ADN y la sonda para Cry1B.868 o Cry1Da_7 se mezclaron con los cebadores y la sonda para el control interno tal como se muestra en las Tablas Tables 30 y 31.

5

Tabla 30. PCR TAQMAN® de cigosidad del evento de maíz MON 95379 para la detección de Cry1B.868.

Etapas	Reactivo	Concentración de solución madre (µl)	Volumen (µl)	Concentración final (µM)	Comentarios
	Volumen de reacción		5		
1	2X mezcla maestra		2,4		1X concentración final
2	Cebador específico de Cry1B.868 SQ50998	100	0,0225	0,45	
3	Cebador específico de Cry1B.868 SQ50997	100	0,0225	0,45	
4	Sonda 6FAM™ de Cry1B.868 PB50340	100	0,005	0,1	La sonda es sensible a la luz
5	Cebador de control interno SQ20222	100	0,0225	0,45	

Etapas	Reactivo	Concentración de solución madre (µl)	Volumen (µl)	Concentración final (µM)	Comentarios
6	Cebador de control interno SQ20221	100	0,0225	0,45	
7	Sonda VIC® de control interno PB50237	100	0,005	0,1	La sonda es sensible a la luz
8	ADN extraído (plantilla): • Muestras de hojas para analizar • Control negativo (ADN no transgénico) • Control de agua negativo (control sin plantilla) • Cry1B.868 de control de cantidad de copias positivas		2,5		Se llevan a cabo reacciones separadas para cada plantilla.

Tabla 31. PCR TAQMAN® de cigosidad del evento de maíz MON 95379 para la detección de Cry1Da_7.

Etapas	Reactivo	Concentración de solución madre (µl)	Volumen (µl)	Concentración final (µM)	Comentarios
	Volumen de reacción		5		
1	2X mezcla maestra		2,4		1X concentración final
2	Cebador específico de Cry1Da_7 SQ50485	100	0,0225	0,45	
3	Cebador específico de Cry1Da_7 SQ50484	100	0,0225	0,45	
4	Sonda específica 6FAM™ de Cry1Da_7 PB50138	100	0,005	0,1	La sonda es sensible a la luz
5	Cebador de control interno SQ20222	100	0,0225	0,45	
6	Cebador de control interno SQ20221	100	0,0225	0,45	
7	Sonda VIC® de control interno PB50138	100	0,005	0,1	La sonda es sensible a la luz

Etapas	Reactivo	Concentración de solución madre (µl)	Volumen (µl)	Concentración final (µM)	Comentarios
8	ADN extraído (plantilla): • Muestras de hojas para analizar • Control negativo (ADN no transgénico) • Control de agua negativo (control sin plantilla) • Cry1Da_7 de control de cantidad de copias positivas		2,5		Se llevan a cabo reacciones separadas para cada plantilla.

- [195] Se mezclan reacciones separadas con ADN derivado de una muestra de hoja cuya cigosidad se desconoce, un control negativo de ADN derivado de una planta de maíz no transformada, un control negativo que carece de ADN y un control positivo con ADN derivado de una planta transgénica homocigota para Cry1B.868 o Cry1Da_7, de acuerdo con cuál secuencia de codificación de toxina se use para detección. Entonces, las reacciones se someten a los ciclos térmicos presentados en la Tabla 32.

Tabla 32. Condiciones de termociclador TAQMAN® de cigosidad

Etapas n.º	Cantidad de ciclos	Configuraciones
1	1	95 °C 20 segundos

2	40	95 °C 3 segundos
		60 °C 20 segundos
3	1	10 °C

- [196] Luego de la amplificación, se determinaron los umbrales de los ciclos (valores Ct) para el amplicón correspondiente a la secuencia de codificación de toxina y el estándar interno homocigoto de copia simple. Se determinó la diferencia (ΔCt) entre el valor de Ct del amplicón estándar interno homocigoto de copia simple y el valor de Ct del amplicón de secuencia de codificación de toxina. En lo que respecta a cigosidad, un ΔCt de alrededor de 0 (cero) indicó homocigosidad del ADN-T del evento MON 95379 insertado y un ΔCt de alrededor de 1 (uno) indicó heterocigosidad del ADN-T del evento MON 95379 insertado. La ausencia de un amplicón correspondiente a la secuencia de codificación de toxina de insecto indicó que la muestra es nula para el ADN-T de evento MON 95379 insertado. Los valores de Ct en el método de amplificación térmica TAQMAN® tendrán cierta variabilidad debido a múltiples factores, tales como eficiencia de amplificación y temperaturas de templado ideales. Por consiguiente, el rango de «alrededor de 1 (uno)» se define como un ΔCt de 0,75 a 1,25.
- [197] Se llevaron a cabo ensayos de ambas secuencias de codificación de toxina para garantizar la precisión de la determinación de cigosidad de la progenie para cada progenie derivada de un cruzamiento con el evento MON 95379.

EJEMPLO 9

Ensayos para determinar la cigosidad para el evento de maíz MON 95379 con TAQMAN®

- [198] El siguiente ejemplo describe un método útil para identificar la cigosidad del evento MON 95379 en una muestra de maíz.
- [199] Se diseñan pares de cebadores de PCR y una sonda con el fin de identificar propiedades específicas de alelos positivos y negativos para la inserción de ADN-T que generó el evento MON 95379. Se proveen ejemplos de condiciones que se pueden usar en una PCR TAQMAN® de cigosidad específica del evento en las Tablas 33 y 34. Para este ensayo, se mezclaron tres cebadores y dos sondas junto con la muestra. Los cebadores de ADN usados en el ensayo de cigosidad fueron los cebadores SQ50219 (SEQ ID NO:15), SQ21524 (SEQ ID NO:16) y PWTDNA (SEQ ID NO:27). Las sondas usadas en el ensayo de cigosidad fueron la sonda marcada con 6FAM™ PB10269 (SEQ

ID NO:17) y la sonda marcada con VIC® PRWTDNA (SEQ ID NO:28). Los cebadores SQ50219 (SEQ ID NO:15) y SQ21524 (SEQ ID NO:16) y la sonda marcada con 6FAM™ PB10269 (SEQ ID NO:17) son de diagnóstico del ADN del evento MON 95379. SQ50219 (SEQ ID NO:15) y PWTDNA (SEQ ID NO:27) y la sonda marcada con VIC® PRWTDNA (SEQ ID NO:28) son de diagnóstico cuando no existe copia del evento MON 95379, es decir, son de diagnóstico para el alelo de tipo salvaje.

[200] Cuando los tres cebadores y las dos sondas se mezclan en una reacción de PCR con ADN extraído de una planta heterocigota para el evento MON 95379, existe una señal fluorescente tanto de la sonda marcada con 6FAM™ PB10269 (SEQ ID NO:17) como de la sonda marcada con VIC® PRWTDNA (SEQ ID NO:28) que es indicativa y de diagnóstico de una planta heterocigota para el evento MON 95379. Cuando los tres cebadores y las dos sondas se mezclan en una reacción de PCR con ADN extraído de una planta homocigota para el evento MON 95379, existe una señal fluorescente solo de la sonda marcada con 6FAM™ PB10269 (SEQ ID NO:17) y no de la sonda marcada con VIC® PRWTDNA (SEQ ID NO:28). Cuando los tres cebadores y las dos sondas se mezclan en una reacción de PCR con ADN extraído de una planta nula para el evento MON 95379 (es decir, de tipo salvaje), existe una señal fluorescente solo de la sonda marcada con VIC® PRWTDNA (SEQ ID NO:28). Los controles y muestras de ADN de plantilla para este análisis fueron un control positivo de maíz que contiene ADN de evento MON 95379 (tanto de una muestra homocigota conocida como una muestra heterocigota conocida), un control negativo de maíz no transgénico y un control negativo que contiene ADN no de plantilla.

Tabla 33. PCR TAQMAN® de cigosidad del evento MON 95379

Etapas	Reactivo	Concentración de solución madre (µl)	Volumen (µl)	Concentración final (µM)	Comentarios
	Volumen de reacción		5		
1	agua 18 megohmios		0,33		Ajustar a volumen final
2	2X mezcla maestra		2,5		1X concentración final

3	Cebador específico del evento SQ51219	100	0,05	0,9	
4	Cebador específico del evento SQ21524	100	0,05	0,9	
5	Sonda 6FAM™ específica del evento PB10269	100	0,01	0,2	La sonda es sensible a la luz
6	Cebador de alelo WT PNEGDNA	100	0,05	0,9	
7	Sonda VIC® de alelo WT PRBNEGDNA	100	0,01	0,2	La sonda es sensible a la luz
8	ADN extraído (plantilla): • Muestras de hojas para analizar • Control negativo (ADN no transgénico) • Control de agua negativo (control sin plantilla) • ADN de		2,5		Se llevan a cabo reacciones separadas para cada plantilla.

	MON 95379 de control cualitativo positivo				
--	--	--	--	--	--

Tabla 34. Condiciones del termociclador TAQMAN® de cigosidad

Etapas n.º	Cantidad de ciclos	Configuraciones
1	1	95 °C 20 segundos
2	40	95 °C 3 segundos
		60 °C 20 segundos
3	1	10 °C

EJEMPLO 10

5 Identificación del evento de maíz MON 95379 en cualquier evento de reproducción de MON 95379

[201] El siguiente ejemplo describe cómo se puede identificar el evento MON 95379 en la progenie de cualquier actividad de reproducción con el evento de maíz MON 95379.

[202] Se usan pares de cebadores de ADN para producir un amplicón de diagnóstico del evento de maíz MON 95379. Un amplicón de diagnóstico para el evento MON 95379 comprende al menos una secuencia de unión. Las secuencias de unión para el evento MON 95379 son SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:8 ([1], [2], [3], [4], [5], [6], [7] y [8], respectivamente, en la Figura 1). La SEQ ID NO:1 es una secuencia de 50 (cincuenta) nucleótidos que representa la región de unión 5' de ADN genómico de maíz y el casete de expresión transgénico integrado. La SEQ ID NO:1 se ubica en la SEQ ID NO:10 en la posición de nucleótidos 838-887. La SEQ ID NO:2 es una secuencia de 50 (cincuenta) nucleótidos que representa la región de unión 3' de ADN genómico de maíz y el casete de expresión transgénico integrado. La SEQ ID NO:2 se ubica en la SEQ ID NO:10 en la posición de nucleótidos 14156-14205. La SEQ ID NO:3 es una secuencia de 100 (cien) nucleótidos que representa la región de unión 5' de ADN genómico de maíz y el casete de expresión transgénico integrado. La SEQ ID NO:3 se ubica en la SEQ ID NO:10 en la

posición de nucleótidos 813-912. La SEQ ID NO:4 es una secuencia de 100 (cien) nucleótidos que representa la región de unión 3' de ADN genómico de maíz y el casete de expresión transgénico integrado. La SEQ ID NO:4 se ubica en la SEQ ID NO:10 en la posición de nucleótidos 14,131-14,230. La SEQ ID NO:5 es una secuencia de 200 (doscientos) nucleótidos que representa la región de unión 5' de ADN genómico de maíz y el casete de expresión transgénico integrado. La SEQ ID NO:5 se ubica en la SEQ ID NO:10 en la posición de nucleótidos 763-962. La SEQ ID NO:6 es una secuencia de 200 (doscientos) nucleótidos que representa la región de unión 3' de ADN genómico de maíz y el casete de expresión transgénico integrado. La SEQ ID NO:6 se ubica en la SEQ ID NO:10 en la posición de nucleótidos 14,081-14,280. La SEQ ID NO:7 es una secuencia de 1160 (mil ciento sesenta) nucleótidos que representa la región de unión 5' de ADN genómico de maíz y el casete de expresión transgénico integrado. La SEQ ID NO:7 se ubica en la SEQ ID NO:10 en las posiciones de nucleótidos 1-1160. La SEQ ID NO:8 es una secuencia de 1178 (mil ciento setenta y ocho) nucleótidos que representa la región de unión 3' del casete de expresión transgénico integrado y el ADN genómico de maíz. La SEQ ID NO:8 se ubica en la SEQ ID NO:10 en las posiciones de nucleótidos 14,039-15,216.

[203] Los pares de cebadores que producirán un amplicón de diagnóstico para el evento MON 95379 incluyen pares de cebadores con base en las secuencias que los flanquean (SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:12) y el ADN-T insertado (SEQ ID NO:9). Para adquirir un amplicón de diagnóstico en el cual se encuentra la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:7, se diseñaría una molécula de cebador directo con base en el ADN genómico de maíz flanqueante 5' (SEQ ID NO:11; de las bases 1 a 862 de SEQ ID NO:10) y una molécula de cebador inverso con base en el ADN-T insertado (SEQ ID NO:9; de la posición 863 a 14 180 de SEQ ID NO:10), en el cual las moléculas de cebador tienen una longitud suficiente de nucleótidos contiguos para hibridación específica con SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:9. Para adquirir un amplicón de diagnóstico en el cual se encuentre la SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 o SEQ ID NO:8, se diseñaría una molécula de cebador directo con base en el ADN-T insertado (SEQ ID NO:9; de posición 863 a 14 180 de SEQ ID NO:10) y una molécula de cebador inverso con base en el ADN genómico de maíz flanqueante 3' (SEQ ID NO:12, de posición 14 181 a 15 216 de SEQ ID NO:10), en el cual las moléculas de cebador tienen una longitud suficiente de nucleótidos contiguos para hibridación específica con SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:12.

[204] A fines prácticos, se deberían diseñar cebadores que producen amplicones de un

rango de tamaño limitado, preferentemente, de 200 a 1000 bases. En general, los amplicones de tamaño menor se producen de forma más confiable en las reacciones de PCR, permiten tiempos de ciclo más cortos y se pueden separar y visualizar fácilmente en geles de agarosa o adaptar para uso en ensayos de tipo TAQMAN® de criterios de valoración. Además, los amplicones producidos con dichos pares de cebadores se pueden clonar en vectores, propagar, aislar y secuenciar o se pueden secuenciar directamente con los métodos conocidos en la técnica. Cualquier par de cebadores derivado de las combinaciones de SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:12 y SEQ ID NO:9 útiles en un método de amplificación de ADN para producir un amplicón de diagnóstico del evento MON 95379 o su progenie es un aspecto de la presente invención. Cualquier molécula de cebador de polinucleótido de ADN aislado simple que comprende al menos 11 (once) nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:12 o sus complementos que es útil en un método de amplificación de ADN para producir un amplicón de diagnóstico del evento MON 95379 o su progenie es un aspecto de la presente invención.

[205] En las tablas 28 y 29 se ilustra un ejemplo de las condiciones de amplificación para este análisis. Cualquier modificación de estos métodos o el uso de cebadores de ADN homólogos o complementarios a la SEQ ID NO:11 o SEQ ID NO:12, o secuencias de ADN de los elementos genéticos contenidos en el inserto transgénico (SEQ ID NO:9) del evento MON 95379, que produce un amplicón de diagnóstico del evento MON 95379 queda comprendido en la técnica. Un amplicón de diagnóstico comprende una molécula de ADN homóloga o complementaria a al menos un ADN de unión transgénica/genómica o una parte sustancial de este.

[206] Un análisis de una muestra de tejido vegetal que contiene evento MON 95379 debería incluir un control de tejido positivo de una planta que contiene evento MON 95379, un control negativo de una planta de maíz que no contiene evento MON 95379 (por ejemplo, LH244) y un control negativo que no contiene ADN genómico de maíz. Un par de cebadores amplificará una molécula de ADN de maíz endógena y servirá como un control interno para las condiciones de amplificación de ADN. Los expertos en la técnica de métodos de amplificación de ADN pueden seleccionar secuencias de cebadores adicionales de la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 12 o la SEQ ID NO: 9. Las condiciones seleccionadas para la producción de un amplicón mediante los métodos ilustrados en la Tabla 28 y la Tabla 29 pueden variar, pero producen un amplicón de diagnóstico para el evento MON 95379. El alcance de la invención comprende el uso de secuencias de

cebador de ADN en las modificaciones de los métodos de la Tabla 28 y la Tabla 29 o con estas. Un amplicón producido por al menos una secuencia de cebador de ADN derivada de SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:9 de diagnóstico del evento MON 95379 es un aspecto de la invención.

- 5 [207] Los kits de detección de ADN que contienen al menos un cebador de ADN de longitud suficiente de nucleótidos contiguos derivado de SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:9 que, cuando se usa en un método de amplificación de ADN, produce un amplicón de diagnóstico del evento MON 95379 o su progenie son un aspecto de la invención. Una planta o semilla de maíz cuyo su genoma producirá un amplicón de
- 10 diagnóstico del evento MON 95379, cuando se evalúa en un método de amplificación de ADN, es un aspecto de la invención. Es posible llevar a cabo el ensayo para el amplicón del evento MON 95379 mediante un sistema de PCR 9700 Applied Biosystems GeneAmp™, Stratagene Robocycler®, termociclador de gradiente Eppendorf® Mastercycler® o cualquier otro sistema de amplificación que se puede usar para producir
- 15 un amplicón de diagnóstico del evento MON 95379 tal como se muestra en la Tabla 29.
- [208] Todas las publicaciones y los documentos de patentes publicados citados en la presente especificación, y que son material para la invención, se incorporan al presente por referencia en la misma medida en que se incorporarían si se indicara que cada publicación o solicitud de patente se incorpora específicamente al presente por referencia.
- 20 [209] Una vez se ilustraron y describieron los principios de la presente invención, debería ser evidente para los expertos en la técnica que la invención puede ser modificada en su disposición y detalles sin apartarse de dichos principios. Reivindicamos que todas las modificaciones se encuentran dentro del espíritu y alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ADN recombinante que 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, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 y un complemento completo de estas.
2. La molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1, en donde la molécula de ADN recombinante se deriva del evento de maíz MON 95379 y una muestra representativa de semillas que comprenden dicho evento se depositó con el número de acceso de ATCC PTA-125027.
3. Una molécula de ADN que comprende un segmento de polinucleótidos de longitud suficiente para funcionar como una sonda de ADN que se hibrida específicamente en condiciones de hibridación rigurosas con ADN del evento de maíz MON 95379 en una muestra, en donde la detección de hibridación de dicha molécula de ADN en dichas condiciones de hibridación rigurosas es de diagnóstico de la presencia de ADN del evento MON 95379 en dicha muestra.
4. La molécula de ADN de la reivindicación 3, en donde dicha muestra comprende una planta de maíz, célula vegetal de maíz, semilla de maíz, parte de la planta de maíz, planta de progenie de maíz, semilla de maíz procesada, alimento para animales que comprende maíz, aceite de maíz, molienda de maíz, harina de maíz, copos de maíz, afrecho de maíz, pasta de maíz, biomasa de maíz y productos combustibles producidos con maíz y partes de maíz.
5. Un par de moléculas de ADN que comprende una primera molécula de ADN y una segunda molécula de ADN diferente de la primera molécula de ADN, las que funcionan como cebadores de ADN cuando se usan juntas en una reacción de amplificación con una muestra que contiene ADN de plantilla de evento MON 95379 para producir un amplicón de diagnóstico de presencia de dicho ADN de evento de maíz MON 95379 en dicha muestra, en donde dicho amplicón comprende la secuencia de nucleótidos que se selecciona de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10.
6. Un método para detectar la presencia de un segmento de ADN de diagnóstico de ADN del evento de maíz MON 95379 en una muestra y dicho método comprende:
 - a) poner dicha muestra en contacto con la molécula de ADN de la reivindicación 3,
 - b) someter dicha muestra y dicha molécula de ADN a condiciones de

hibridación rigurosas, y

c) detectar la hibridación de dicha molécula de ADN con dicho ADN en dicha muestra,

en donde dicha detección es de diagnóstico para la presencia de dicho ADN del evento de maíz MON 95379 en dicha muestra.

7. Un método para detectar la presencia de un segmento de ADN de diagnóstico de ADN del evento de maíz MON 95379 en una muestra y dicho método comprende:

a) poner dicha muestra en contacto con el par de moléculas de ADN de la reivindicación 5,

b) llevar a cabo una reacción de amplificación suficiente para producir un amplicón de ADN, y

c) detectar la presencia de dicho amplicón de ADN en dicha reacción,

en donde dicho amplicón de ADN comprende la 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, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10.

8. Una planta de maíz, parte de planta de maíz, célula de maíz o parte de estas que comprende una molécula de polinucleótidos recombinante que comprende la 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, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10.

9. La planta de maíz, parte de planta de maíz, célula de maíz o parte de estas de la reivindicación 8, en donde la planta de maíz, parte de planta de maíz, célula de maíz o parte de estas es insecticida cuando se provee en la dieta de una plaga de insectos lepidópteros.

10. La planta de maíz, parte de planta de maíz, célula de maíz o parte de esta de la reivindicación 9, en donde la plaga de insectos lepidópteros se selecciona del grupo que consiste en cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*), gusano elotero (*Helicoverpa zea*), barrenador del maíz del suroeste (*Diatraea grandiosella*), barrenador de la caña de azúcar (*Diatraea saccharalis*) y barrenador menor del tallo de maíz (*Elasmopalpus lignosellus*).

11. La planta de maíz, parte de planta de maíz, célula de maíz o parte de estas de la reivindicación 8, en donde la planta de maíz se define adicionalmente como progenie de cualquier generación de una planta que comprende el evento de maíz MON 95379.

12. Un método para proteger una planta de maíz de la infestación de insectos, en donde dicho método comprende proveer en la dieta de una plaga de insectos lepidópteros

una cantidad eficaz como insecticida de células o tejido de la planta de maíz que comprende el evento de maíz MON 95379.

13. El método de la reivindicación 12, en donde dicha plaga de insectos lepidópteros se selecciona del grupo que consiste en cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*), gusano elotero (*Helicoverpa zea*), barrenador del maíz del suroeste (*Diatraea grandiosella*), barrenador de la caña de azúcar (*Diatraea saccharalis*) y barrenador menor del tallo de maíz (*Elasmopalpus lignosellus*).

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

- 10 a) el cruzamiento sexual de dos plantas de maíz diferentes, en donde al menos una de las dos plantas de maíz diferentes comprende ADN del evento de maíz transgénico MON 95379,
- b) la obtención de muestras de semillas o tejido de la progenie de dicho cruzamiento,
- 15 c) la detección de la presencia de un segmento de ADN de diagnóstico de ADN del evento de maíz MON 95379 en dicha muestra de la etapa b) para identificar la progenie que comprende ADN del evento de maíz MON 95379, y
- d) la selección de dicha progenie que comprende ADN del evento de maíz MON 95379.

20 15. Una semilla de maíz que comprende una cantidad detectable de la 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, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10, o sus complementos totales.

25 16. Un material de planta de maíz inerte que comprende una cantidad detectable de la molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1.

17. Un microorganismo que comprende una cantidad detectable de la molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1.

18. El microorganismo de la reivindicación 17, en donde el microorganismo es una célula vegetal.

30 19. Un producto básico que comprende la molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1.

20. El producto básico de la reivindicación 19, el que también se selecciona del grupo que consiste en semilla de maíz entera o procesada, alimento para animales que comprende maíz, aceite de maíz, molienda de maíz, harina de maíz, copos de maíz,

afrecho de maíz, biomasa de maíz y productos combustibles producidos con maíz y partes de maíz.

21. Una planta de maíz, parte de planta de maíz o semilla de maíz de estas que comprende ADN funcional como plantilla cuando se evalúa en un método de amplificación de ADN que produce un amplicón de diagnóstico de presencia de ADN del evento MON 95379.

22. Un método para determinar la cigosidad de una planta de maíz o semilla de maíz que comprende el evento MON 95379, el cual comprende:

- a) poner una muestra que comprende ADN de maíz en contacto con un par de cebadores que puede producir un amplicón de una de las secuencias de codificación de toxinas que codifica Cry1B.868 o Cry1Da_7,
- b) poner dicha muestra que comprende ADN de maíz en contacto con un par de cebadores que puede producir un amplicón de un estándar interno conocido por ser homocigoto y de copia simple en la planta de maíz,
- c) poner dicha muestra de ADN en contacto con un conjunto de sondas que contiene al menos una primera sonda que se hibrida específicamente con una de las secuencias de codificación de toxinas que codifican Cry1B.868 o Cry1Da_7, y una segunda sonda que se hibrida específicamente con el ADN genómico estándar interno conocido por ser de copia simple y homocigoto en la planta de maíz,
- d) llevar a cabo una reacción de amplificación de ADN con PCR en tiempo real y determinar los umbrales de los ciclos (valores de Ct) del amplicón correspondiente a la secuencia de codificación de toxina y el estándar interno homocigoto de copia simple,
- e) calcular la diferencia (ΔCt) entre el valor de Ct del amplicón estándar interno homocigoto de copia simple y el valor de Ct del amplicón de secuencia de codificación de toxina, y
- f) determinar la cigosidad, en donde un ΔCt de alrededor de 0 (cero) indica homocigosidad del ADN-T insertado del evento MON 95379 y un ΔCt de alrededor de 1 (uno) indica heterocigosidad del ADN-T insertado del evento MON 95379.

23. El método de la reivindicación 22, en donde los pares de cebadores se seleccionan del grupo que consiste en SEQ ID NO:18 combinada con SEQ ID NO:19, y SEQ ID NO:21 combinada con SEQ ID NO:22; y en donde las sondas son SEQ ID NO:20 y SEQ ID NO:23.

24. El método de la reivindicación 22, en donde los pares de cebadores se

seleccionan del grupo que consiste en SEQ ID NO:18 combinada con SEQ ID NO:19, y SEQ ID NO:24 combinada con SEQ ID NO:25; y en donde las sondas son SEQ ID NO:20 y SEQ ID NO:26.

25. El método de la reivindicación 22, en donde el ΔC_t de alrededor de 1 (uno) que indica heterocigosidad del ADN-T insertado del evento MON 95379 se encuentra en el rango de 0,75 a 1,25.

26. Un método para determinar la cigosidad de una planta de maíz o semilla de maíz que comprende el evento MON 95379, el cual comprende:

- a) poner una muestra que comprende ADN de maíz en contacto con un conjunto de pares de cebadores que comprende al menos dos pares de cebadores diferentes que pueden producir un primer amplicón de diagnóstico del evento MON 95379 y un segundo amplicón de diagnóstico de ADN genómico de maíz nativo que no comprende el evento MON 95379,
- b) llevar a cabo una reacción de amplificación de ácidos nucleicos con la muestra y el conjunto de pares de cebadores, y
- c) detectar en la reacción de amplificación de ácidos nucleicos el primer amplicón de diagnóstico del evento MON 95379 o el segundo amplicón de diagnóstico de ADN genómico de maíz nativo que no comprende evento MON 95379, en donde la presencia de solo el primer amplicón es de diagnóstico de una planta de maíz o semilla de maíz homocigota para el evento MON 95379, y la presencia tanto del primer amplicón como del segundo amplicón es de diagnóstico de una planta de maíz o semilla de maíz heterocigota para el evento MON 95379, o
 - i) poner una muestra que comprende ADN de maíz en contacto con un conjunto de sondas que contiene al menos una primera sonda que se hibrida específicamente con ADN del evento MON 95379 y al menos una segunda sonda que se hibrida específicamente con ADN genómico de maíz alterado por la inserción de ADN heterólogo del evento MON 95379 y que no se hibrida con ADN del evento MON 95379, e
 - ii) hibridar el conjunto de sondas con la muestra en condiciones de hibridación rigurosas, en donde la detección de hibridación de solo la primera sonda en condiciones de hibridación es de diagnóstico de una planta de maíz o semilla de maíz homocigota para el evento MNON 95379, y en donde la detección de hibridación tanto de la primera sonda como de la segunda sonda en condiciones de hibridación rigurosas es de diagnóstico para una planta de maíz o semilla de maíz

heterocigota para el evento MON 95379.

27. El método de la reivindicación 26, en donde el conjunto de pares de cebadores comprende SEQ ID NO:15 combinada con SEQ ID NO:16 y SEQ ID NO:15 combinada con SEQ ID NO:27.
- 5 28. El método de la reivindicación 26, en donde el conjunto de sondas comprende la SEQ ID NO:17 y la SEQ ID NO:28.

RESUMEN

La invención proporciona un evento de maíz MON 95379 transgénico, plantas, células vegetales, semillas, partes de plantas, plantas de la progenie y productos básicos que comprenden el evento MON 95379. La invención también provee polinucleótidos
5 específicos para el evento MON 95379 y métodos para usar y detectar el evento MON 95379, así como plantas, células vegetales, semillas, partes de plantas, plantas de progenie y productos básicos que comprenden el evento MON 95379.