CAPÍTULO REIVINDICATORIO

1. Una molécula de ácido nucleico recombinante, **caracterizada** porque comprende genes quiméricos *cry14Ab-1.b* (SEQ ID NO: 7) y *hppdpf-4Pa* (SEQ ID NO: 9) en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 11 de la posición de nucleótido 188 a la posición de nucleótido 7101, una secuencia de nucleótido flanqueante 5' correspondiente a los nucleótidos 1-166 de SEQ ID NO: 5, y una secuencia de nucleótido flanqueante 3' correspondiente a los nucleótidos 359-691 de SEQ ID NO: 6, o el complemento de dichas secuencias.

2. Un método para identificar la molécula de ácido nucleico recombinante de acuerdo con la reivindicación 1 en muestras biológicas, **caracterizado** porque dicho método comprende la detección de una región que es específica para dicha molécula de ácido nucleico recombinante a través de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) usando un par de cebadores específicos o una sonda específica que reconoce específicamente la región que contiene parte de la región flanqueante 5' o 3' del ADN-T y parte del ADN-T insertado contiguo con la misma en EE-GM5;

en donde la secuencia del par de cebadores es como se establece en SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13, o en SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 19, o en SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 28, o en SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 29.

3. Un par de cebadores para detección específica de la molécula de ácido nucleico recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque comprende un cebador directo que comprende una secuencia que reconoce específicamente una secuencia en la región flanqueante de ADN-T 5' o 3' del ADN-T insertado en dicha molécula de ácido nucleico recombinante, y un cebador inverso que comprende una secuencia que reconoce específicamente una secuencia en el ADN-T insertado en dicha molécula de ácido nucleico recombinante contigua con dicha región flanqueante 5' o 3', donde dicha región flanqueante de ADN-T 5' comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 5 del nucleótido 1 al nucleótido 166, donde dicha región flanqueante de ADN-T 3' comprende la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO. 6 del nucleótido 359 al nucleótido 691, donde dicho ADN-T insertado comprende el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 5 del nucleótido 167 al nucleótido 353, o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 6 del nucleótido 1 al

nucleótido 358, o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 11 de la posición de nucleótido 1 a la posición de nucleótido 7459, o su complemento;

en donde la secuencia del par de cebadores es como se establece en SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13, o en SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 19, o en SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 28, o en SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 29.

4. El par de cebadores de acuerdo a la reivindicación 3, **caracterizado** porque el par de cebadores que abarcan la región de unión de la secuencia flanqueante 3' con la inserción de ADN-T comprende un cebador directo y un cebador inverso,

en donde la secuencia del cebador directo está indicada en SEQ ID NO 12, y la secuencia del cebador inverso está indicada en SEQ ID NO 13; y

en donde el par de cebadores que abarcan la región de unión de la secuencia flanqueante 5' con la inserción de ADN-T comprende un cebador directo y un cebador inverso,

en donde la secuencia del cebador directo está indicada en SEQ ID NO 18 y un cebador inverso como está indicada en SEQ ID NO 19.

5. Una sonda específica para la identificación de una molécula de ácido nucleico recombinante de acuerdo con la reivindicación 1 en muestras biológicas, **caracterizada** porque dicha sonda reconoce específicamente una secuencia que comprende parte de la secuencia flanqueante 5' del ADN-T de dicha molécula de ácido nucleico recombinante y parte del ADN-T insertado cadena abajo de la misma y contigua con la misma, o su complemento, o reconoce específicamente una secuencia que comprende parte de la secuencia flanqueante 3' del ADN-T de dicho ácido nucleico recombinante y parte del ADN-T insertado cadena arriba de la misma y contigua con la misma, o su complemento;

en donde la sonda comprende una secuencia de nucleótido seleccionada de SEQ ID NO. 14, 17, 20, 22 o 32, o el complemento de las mismas.

6. La sonda de la reivindicación 5, **caracterizada** porque comprende la secuencia de la SEQ ID NO. 14 o la secuencia de la SEQ ID NO. 17.

7. El método de la reivindicación 5, **caracterizado** porque dicho método comprende amplificar un fragmento de ADN de entre 50 y 1000 pb de un ácido nucleico presente en dichas muestras biológicas usando una reacción en cadena de la polimerasa con al menos

dos cebadores, en donde dichos dos cebadores son los cebadores de una cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5.

8. El método de la reivindicación 7, que comprende además la etapa de hibridar una sonda específica para el fragmento de ADN amplificado con dichos al menos dos cebadores, en donde dicha sonda comprende la secuencia de SEQ ID NO: 14, 17, 20, 22 o 32.

9. Un método para confirmar la pureza de las semillas o para relevar semillas para determinar la presencia de la molécula de ácido nucleico recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque donde dicho método comprende la detección de una región específica de dicha molécula de ácido nucleico recombinante con el par de cebadores de una cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5 o la sonda de una cualquiera de las reivindicaciones 5 y 6, en muestras de dicha semilla.

10. El método de la reivindicación 9, **caracterizado** porque comprende amplificar un fragmento de ADN de 85 pb y en donde dichos cebadores comprenden la secuencia de la SEQ ID NO. 12 y la SEQ ID NO. 13, respectivamente, y en donde dicha sonda comprende la secuencia de la SEQ ID NO. 14, o amplificar un fragmento de ADN de 84 pb y en donde dichos cebadores comprenden la secuencia de la SEQ ID NO. 18 y la SEQ ID NO. 19, respectivamente, y en donde dicha sonda comprende la secuencia de la SEQ ID NO. 20.

11. Un método para detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico recombinante de acuerdo con la reivindicación 1 en muestras biológicas mediante hibridación con una sonda de ácido nucleico complementaria marcada en la que la relación de sonda:ácido nucleico diana se amplifica mediante el reciclado de la secuencia de ácido nucleico diana, **caracterizado** porque dicho método comprende:

a) hibridar dicha secuencia de ácido nucleico diana con un primer oligonucleótido de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 5 de la posición de nucleótido 167 a la posición de nucleótido 184 o su complemento o donde dicho primer oligonucleótido de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 6 de la posición de nucleótido 341 a la posición de nucleótido 358 o su complemento;

b) hibridar dicha secuencia de ácido nucleico diana con un segundo oligonucleótido de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 5 del nucleótido 149 al nucleótido 166 o su complemento o donde dicho oligonucleótido de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 6 del nucleótido 359 al nucleótido 376 o su complemento, en donde dicho primer y segundo oligonucleótido se solapan en al menos un nucleótido y en donde dicho primer o dicho segundo oligonucleótido se marca para ser dicha sonda de ácido nucleico marcada;

c) escindir solamente la sonda marcada en el dúplex de sonda:secuencia de ácido nucleico diana con una enzima que provoca escisión de sonda selectiva que da como resultado disociación de dúplex, dejando la secuencia diana intacta;

d) reciclar la secuencia de ácido nucleico diana repitiendo las etapas (a) a (c); y

e) detectar una sonda marcada escindida, con lo que se determina la presencia de dicha secuencia de ácido nucleico diana;

en donde la secuencia del primer cebador es como se establece en la SE ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13, o en SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 19, o en SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 28, o en SEQ ID NO:27 y SEQ ID NO: 29;

y en donde dicha sonda comprende la secuencia de SEQ ID NO: 14, 17, 20, 22 o 32.

12. Un método para determinar el estado de cigosidad de una planta, material de planta o semilla que comprende una molécula de ácido nucleico recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicho método comprende la etapa de amplificar fragmentos de ADN de entre 50 y 1000 pb de un ácido nucleico presente en dichas muestras biológicas usando una reacción en cadena de la polimerasa con al menos tres cebadores, donde dos de dichos cebadores reconocen específicamente ADN de planta preinserción, donde el tercero de dichos cebadores reconoce una secuencia en el ADN-T insertado;

en donde dichos dos cebadores que reconocen específicamente ADN de planta preinserción son un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 19 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 21 y en donde el cebador que reconoce una secuencia en el ADN-T insertado es un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 18.