

TÍTULO DE LA INVENCION

EVENTO DE MAÍZ TRANSGÉNICO ZM_BCS216090 Y MÉTODOS PARA SU DETECCIÓN Y SUS USOS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[01] Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de EE. UU. Acta Nro. 63/274.865, presentada el 2 de noviembre de 2021, y de la Solicitud Provisional de EE. UU. Acta Nro. 63/279.508, presentada el 15 de noviembre de 2021, las cuales se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

INCORPORACIÓN DE LISTADO DE SECUENCIAS

[02] El listado de secuencias contenido en el archivo denominado “MONS510US_ST26.xml” tiene 37,0 kilobytes (medido en Microsoft Windows®), se creó el 7 de octubre de 2022, se presenta con la presente solicitud mediante presentación electrónica, y se incorpora por referencia.

CAMPO DE LA INVENCION

[03] La presente invención se refiere a moléculas de ADN recombinante presentes y/o aisladas del evento de maíz ZM_BCS216090. La invención también se refiere a plantas de maíz transgénico, partes de plantas y semillas, células y productos agrícolas que contienen el evento de maíz ZM_BCS216090, así como métodos para su uso y para detectar la presencia del evento de maíz ZM_BCS216090.

ANTECEDENTES

[04] El maíz (*Zea mays*) es un cultivo importante y es una fuente primaria de alimento en muchas áreas del mundo. Los métodos de la biotecnología se han aplicado al maíz para mejorar los rasgos agronómicos y la calidad del producto. Los rasgos agronómicos mejorados pueden incluir un mayor potencial de rendimiento y tolerancia al estrés, tal como una mayor resistencia al acame, que puede lograrse a través de la expresión de un transgén insertado en el genoma de la planta de maíz.

[05] La expresión de transgenes en una planta, parte de planta, semilla o célula transgénica y, por lo tanto, su eficacia, pueden estar influidas por muchos factores diferentes, tales como los elementos reguladores utilizados en el casete del transgén, la ubicación cromosómica del sitio de

inserción del transgén, la estructura de la cromatina del genoma en el sitio de inserción del transgén o cerca de este, y la presencia o proximidad de cualquier elemento regulador endógeno cis y/o trans o gen cerca del sitio de inserción del transgén. Estas diferencias pueden lograr una variación en el nivel de expresión transgénica o en el patrón espacial o temporal de expresión transgénica entre diferentes eventos de inserción transgénica del mismo casete de expresión. Diferentes eventos transgénicos también pueden tener diferentes niveles o patrones de expresión transgénica en diferentes germoplasmas vegetales y condiciones de crecimiento y a través de diferentes tejidos vegetales y etapas de desarrollo. Además, los eventos de transformación también pueden variar en términos de la calidad molecular del evento. Por ejemplo, un evento de inserción transgénica se puede truncar en relación con la inserción prevista, o puede contener secuencias de espinazo del vector adicionales. También puede haber diferencias fenotípicas o agronómicas indeseables entre algunos eventos. Debido a que la transformación mediada por *Agrobacterium* con una construcción de T-ADN que contiene un casete de expresión transgénico es en gran medida variable y aleatoria en términos de dónde se puede insertar el transgén en el genoma de la planta, se puede generar una diversidad de eventos transgénicos diferentes con sitios de inserción cromosómicos únicos.

[06] Por estas razones, el desempeño de diferentes eventos de transformación de la misma construcción de vector de transformación puede variar, y es necesaria la identificación de eventos de transformación que confieren los rasgos o las características más beneficiosos, sin otras posibles anomalías o preocupaciones, a fin de seleccionar un evento superior para uso comercial. Por lo tanto, se debe producir y analizar una serie de eventos de transformación de plantas individuales para seleccionar un evento que tenga propiedades comerciales superiores, lo que puede ser una tarea importante que implica el análisis y la selección entre muchos eventos de transformación diferentes.

SÍNTESIS

[07] En un aspecto, una molécula de ADN recombinante se proporciona en este documento 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, y SEQ ID NO: 10, o un complemento completo de las mismas. En formas de realización particulares, la molécula de ADN recombinante es del evento de maíz

ZM_BCS216090, donde una muestra representativa de semillas que comprende el evento se ha depositado con el Acceso ATCC Nro. PTA-127050. En una forma de realización adicional, la molécula de ADN recombinante está comprendida en una planta de maíz, una célula vegetal, una semilla, una planta progenie, una parte de planta o un producto básico. En otras formas de realización, la molécula de ADN recombinante se forma mediante la inserción de una molécula de ácido nucleico heteróloga en el ADN genómico de una planta de maíz o una célula de maíz. En aún otras formas de realización, la molécula de ADN recombinante comprende un amplicón diagnóstico de la presencia de ADN derivado del evento de maíz ZM_BCS216090. En aún otra forma de realización más, la molécula de ADN recombinante se deriva de una planta de maíz transgénica que comprende el evento de maíz ZM_BCS216090, donde una muestra representativa de semilla que comprende el evento se ha depositado con ATCC Acceso Nro. PTA-127050.

[08] En otro aspecto, en el presente documento se proporciona una molécula de ADN que comprende un segmento de polinucleótido de longitud suficiente para funcionar como una sonda de ADN que se hibrida específicamente en condiciones de hibridación rigurosas con el ADN del evento de maíz ZM_BCS216090 en una muestra, donde la detección de la hibridación de la molécula de ADN bajo condiciones de hibridación rigurosas es diagnóstico de la presencia de ADN del evento de maíz ZM_BCS216090 en la muestra. En formas de realización particulares, la molécula de ADN comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, 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 un complemento completo de las mismas. En otras formas de realización, la muestra se deriva de una planta de maíz, una célula de planta de maíz, una semilla de maíz, una parte de planta de maíz, una planta de progenie de maíz, una semilla de maíz procesada, un alimento para animales que comprende maíz, aceite de maíz, sémola de maíz, harina de maíz, copos de maíz, salvado de maíz, pasta hecha con maíz, biomasa de maíz y productos combustibles producidos usando maíz y partes de maíz.

[09] En aún otro aspecto, se proporcionan un par de moléculas de ADN que comprenden 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 usan juntas en una reacción de amplificación con una muestra que contiene ADN patrón del evento de maíz ZM_BCS216090, para producir un amplicón diagnóstico de la presencia del ADN del evento de maíz

ZM_BCS216090 en la muestra, donde el amplicón 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, y SEQ ID NO: 10.

[10] En otro aspecto más, se proporciona en el presente documento un método para detectar la presencia de un segmento de ADN diagnóstico del evento de maíz ZM_BCS216090 en una muestra, donde el método comprende: a) poner en contacto la muestra con una molécula de ADN descrita en el presente documento; b) someter la muestra y la molécula de ADN a condiciones de hibridación rigurosas; y c) detectar la hibridación de la molécula de ADN con el ADN de la muestra, donde la detección es diagnóstico de la presencia del ADN del evento de maíz ZM_BCS216090 en la muestra.

[11] En otro aspecto más, se proporciona en el presente documento un método para detectar la presencia de un segmento de ADN diagnóstico del ADN del evento de maíz ZM_BCS216090 en una muestra, donde el método comprende: a) poner en contacto la muestra con el par de moléculas de ADN proporcionadas en el presente documento; b) realizar una reacción de amplificación suficiente para producir un amplicón de ADN; y c) detectar la presencia del amplicón de ADN en la reacción, donde el amplicón de ADN comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, 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 un complemento completo de las mismas.

[12] Aún en otro aspecto, se proporciona un método para detectar la presencia de un segmento de ADN diagnóstico del ADN del evento de maíz ZM_BCS216090 en una muestra, donde el método comprende: a) poner en contacto la muestra con una molécula de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que hibrida específicamente en condiciones de hibridación rigurosas con (i) ADN del evento de maíz ZM_BCS216090; (ii) una molécula de ADN 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, y SEQ ID NO: 10, o un complemento completo de las mismas; o (iii) una molécula de ADN que comprende un segmento de polinucleótido de suficiente longitud para funcionar como una sonda de ADN que hibrida específicamente en condiciones de hibridación rigurosas con ADN

del evento de maíz ZM_BCS216090 en una muestra; y b) efectuar una reacción de secuenciación para producir una secuencia objetivo, donde la secuencia objetivo comprende una secuencia de nucleótidos, o una porción o un fragmento de 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, y SEQ ID NO: 10, o un complemento completo de las mismas.

[13] Aún en otro aspecto, se proporciona en el presente documento una planta de maíz, una parte de planta de maíz, una semilla de maíz o una célula de maíz que comprende: (a) una molécula de ADN recombinante de la invención; o (b) un segmento de ADN 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, y SEQ ID NO: 10, o un complemento completo de las mismas. En formas de realización particulares, la planta de maíz, la parte de planta de maíz, la semilla de maíz, o la célula de maíz exhibe reducida expresión de por lo menos un primer gen endógeno de giberelina 20–oxidasa (*GA20ox*). En formas de realización adicionales, el gen de giberelina 20–oxidasa (*GA20ox*) es seleccionado del grupo que consiste en giberelina 20–oxidasa 3 (*GA20ox3*) y giberelina 20–oxidasa 5 (*GA20ox5*). En formas de realización particulares, la planta de maíz, la parte de planta de maíz, la semilla de maíz, o la célula de maíz tiene reducida expresión de un gen endógeno de giberelina 20–oxidasa 3 (*GA20ox3*) y un gen endógeno de giberelina 20–oxidasa 5 (*GA20ox5*). Aún en otras formas de realización, la planta de maíz, la parte de planta de maíz, la semilla de maíz, o la célula de maíz comprende el evento de maíz ZM_BCS216090, donde una muestra representativa de semillas que comprende el evento se ha depositado con el Acceso ATCC Nro. PTA–127050. Aún en otra forma de realización, la planta de maíz, la parte de planta de maíz, la semilla de maíz, o la célula de maíz además puede definirse como una planta de progenie de cualquier generación de una planta de maíz que comprende el evento de maíz ZM_BCS216090, o una parte de planta de maíz, semilla de maíz o célula de maíz derivada de esta.

[14] Aún en otro aspecto, se proporciona en el presente documento una planta de maíz, una parte de planta de maíz, una semilla de maíz o una célula de maíz que comprende el evento de maíz ZM_BCS216090, donde una muestra representativa de semillas que comprende el evento se ha depositado con el Acceso ATCC Nro. PTA–127050. En formas de realización particulares, una

planta de maíz que se proporciona en el presente documento tiene una altura de planta reducida en relación con una planta de maíz de control. En otras formas de realización, una planta de maíz descrita en el presente documento tiene una mayor resistencia al acame en relación con una planta de maíz de control. En formas de realización adicionales, la planta de maíz, la parte de planta de maíz, la semilla de maíz, o la célula de maíz descrita en el presente documento comprende (a) una molécula de ADN recombinante de la invención; o (b) un segmento de ADN 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, y SEQ ID NO: 10, o un complemento completo de las mismas, donde la secuencia de nucleótidos está presente en el cromosoma 1 de la planta de maíz, la parte de planta de maíz, la semilla de maíz, o la célula de maíz.

[15] Aún en otro aspecto, se proporciona en el presente documento un equipo de detección de ADN que comprende: (a) 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 usan juntas en una reacción de amplificación con una muestra que contiene ADN de patrón del evento de maíz ZM_BCS216090 para producir un amplicón diagnóstico de la presencia del ADN del evento de maíz ZM_BCS216090 en la muestra, donde el amplicón 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; y (b) una sonda de ADN que comprende un segmento de polinucleótido de suficiente longitud para funcionar como una sonda de ADN que hibrida específicamente en condiciones de hibridación rigurosas con ADN del evento de maíz ZM_BCS216090 en una muestra, donde la detección de la hibridación de la molécula de ADN en las condiciones de hibridación rigurosas es diagnóstico de la presencia de ADN del evento de maíz ZM_BCS216090 en la muestra.

[16] Aún en otro aspecto, se proporciona un método para producir una planta de maíz de progenie que comprende el evento de maíz ZM_BCS216090, que comprende: a) cruzar sexualmente una primera planta de maíz que comprende el evento de maíz ZM_BCS216090 consigo misma o con una segunda planta de maíz; b) recolectar una o más semillas producidas a partir del cruce; c) cultivar la semilla para producir una o más plantas de progenie; y d) seleccionar

al menos una primera planta o semilla de la progenie que comprende el evento de maíz ZM_BCS216090. En algunas formas de realización, la al menos una primera planta de progenie del método tiene una altura de planta reducida y/o una mayor resistencia al acame en relación con una planta de maíz de control. En formas de realización particulares, el método comprende además e) recolectar semillas de la al menos la primera planta de progenie que comprende el evento de maíz ZM_BCS216090.

[17] En todavía otro aspecto, se proporciona en el presente documento una planta o semilla de maíz híbrida que comprende el evento de maíz ZM_BCS216090 producida mediante un método de acuerdo con la invención.

[18] Aún en otro aspecto, se proporciona en el presente documento una semilla de maíz que comprende una cantidad detectable de 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, y SEQ ID NO: 10, o un complemento completo de las mismas.

[19] Aún en otro aspecto, se proporciona en el presente documento un material no vivo de planta de maíz que comprende una cantidad detectable de una molécula de ADN recombinante de acuerdo con la invención.

[20] Aún en otro aspecto, se proporciona un microorganismo que comprende una molécula de ADN recombinante de acuerdo con la invención. En formas de realización particulares, el microorganismo es una célula vegetal.

[21] Aún en otro aspecto, se proporciona en el presente documento un producto básico que comprende una molécula de ADN recombinante de acuerdo con la invención. En formas de realización particulares, el producto básico se produce a partir de una planta de maíz, parte de planta de maíz, semilla de maíz, o célula de maíz transgénica que comprende el evento de maíz ZM_BCS216090. En otras formas de realización, el producto básico además se selecciona del grupo que consiste en semilla de maíz entera o procesada, alimento animal que comprende maíz, aceite de maíz, sémola de maíz, harina de maíz, copos de maíz, salvado de maíz, biomasa de maíz y productos combustibles producidos usando maíz y partes de maíz.

[22] Aún en otro aspecto, se proporciona en el presente documento método para producir un

producto básico, donde el método comprende: (a) obtener una planta de maíz transgénica, una parte de planta de maíz o una semilla de maíz que comprende el evento de maíz ZM_BCS216090; y (b) producir un producto básico a partir de la planta de maíz transgénica, parte de planta de maíz o semilla de maíz.

[23] En otro aspecto más, se proporciona una planta de maíz, una parte de planta de maíz o una semilla de maíz que comprende una molécula de ADN funcional como patrón cuando se evalúa en un método de amplificación de ADN que produce un amplicón diagnóstico de la presencia de ADN del evento de maíz ZM_BCS216090.

[24] En otro aspecto más, se proporciona un método para determinar la cigosidad de una planta de maíz, parte de planta de maíz o semilla de maíz que comprende el evento de maíz ZM_BCS216090, que comprende: a) poner en contacto una muestra que comprende ADN de la planta de maíz, parte de planta de maíz, o semilla de maíz con un conjunto de pares de cebadores que comprende al menos dos pares de cebadores diferentes capaces de producir un primer amplicón diagnóstico del evento de maíz ZM_BCS216090, y un segundo amplicón diagnóstico del ADN genómico de maíz nativo que no comprende el evento de maíz ZM_BCS216090; b) realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico con la muestra y el conjunto de pares de cebadores; y c) detectar en la reacción de amplificación de ácido nucleico el primer amplicón diagnóstico del evento de maíz ZM_BCS216090 y el segundo amplicón diagnóstico del ADN genómico de maíz nativo que no comprende el evento de maíz ZM_BCS216090, donde la presencia de solo el primer amplicón es diagnóstico de una planta de maíz, parte de planta de maíz o semilla de maíz homocigota para el evento de maíz ZM_BCS216090, y la presencia tanto del primer amplicón como del segundo amplicón es diagnóstico de una planta de maíz, parte de planta de maíz o semilla de maíz heterocigota para el evento de maíz ZM_BCS216090.

[25] En otro aspecto más, se proporciona un método para determinar la cigosidad de una planta de maíz, parte de planta de maíz o semilla de maíz que comprende el evento de maíz ZM_BCS216090, que comprende: a) poner en contacto una muestra que comprende ADN de la planta de maíz, parte de planta de maíz, o semilla de maíz con un primer par de cebadores capaces de producir un primer amplicón de la totalidad o parte del evento de maíz ZM_BCS216090, y un segundo par de cebadores capaces de producir un segundo amplicón de una secuencia genómica estándar conocida por ser una sola copia y homocigota en la planta de maíz, parte de planta de

maíz o semilla de maíz; b) poner en contacto la muestra con una primera sonda que hibrida específicamente con el primer amplicón y/o la totalidad o parte del evento de maíz ZM_BCS216090, y una segunda sonda que hibrida específicamente con la secuencia genómica estándar; c) realizar una reacción de amplificación de ADN utilizando PCR en tiempo real, y determinar los umbrales de ciclo (valores Ct) del primer amplicón y el segundo amplicón; d) calcular la diferencia (ΔCt) entre los valores de Ct del segundo amplicón y el primer amplicón; y e) determinar la cigosidad del evento de maíz ZM_BCS216090, donde un ΔCt de alrededor de cero (0) indica homocigosidad del evento de maíz ZM_BCS216090, y un ΔCt de alrededor de uno (1) indica heterocigosidad del evento de maíz ZM_BCS216090. En formas de realización particulares de los métodos descritos en el presente documento, el conjunto de pares de cebadores comprende SEQ ID NO: 11 combinada con SEQ ID NO: 12, y SEQ ID NO: 14 combinada con SEQ ID NO: 15.

[26] En otro aspecto más, se proporciona un método para determinar la cigosidad de una planta de maíz, parte de planta de maíz o semilla de maíz que comprende el evento de maíz ZM_BCS216090, que comprende: a) poner en contacto una muestra que comprende ADN de la planta de maíz, parte de planta de maíz, o semilla de maíz, con un par de cebadores capaces de producir un primer amplicón diagnóstico del evento de maíz ZM_BCS216090, y un segundo amplicón diagnóstico del ADN genómico de maíz nativo que no comprende el evento de maíz ZM_BCS216090; b) realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico con la muestra y el conjunto de pares de cebadores; y c) detectar el primer amplicón y el segundo amplicón, donde la presencia de solo el primer amplicón es diagnóstico de una planta de maíz, una parte de planta de maíz o una semilla de maíz homocigota para el evento de maíz ZM_BCS216090; la presencia de solo el segundo amplicón es diagnóstico de una planta de maíz, una parte de planta de maíz o una semilla de maíz homocigota para el ADN genómico de maíz nativo que no comprende el evento de maíz ZM_BCS216090; y la presencia tanto del primer amplicón como del segundo amplicón es diagnóstico de una planta de maíz, una parte de planta de maíz o una semilla de maíz heterocigota para evento de maíz ZM_BCS216090.

[27] En otro aspecto más, se proporciona un método para determinar la cigosidad de una planta de maíz, una parte de planta de maíz o una semilla de maíz que comprende el evento de maíz ZM_BCS216090, que comprende: (a) poner en contacto una muestra que comprende ADN de la

planta de maíz, de la parte de planta de maíz, o de la semilla de maíz, con un conjunto de sondas que contiene al menos una primera sonda que se hibrida específicamente con el evento de maíz ZM_BCS216090, y al menos una segunda sonda que se hibrida específicamente con el ADN genómico de maíz que se altera por la inserción del ADN heterólogo del evento de maíz ZM_BCS216090 y no se hibrida con el ADN del evento de maíz ZM_BCS216090; y (b) hibridar el conjunto de sondas con la muestra en condiciones de hibridación rigurosas, donde la detección de la hibridación de solo la primera sonda en las condiciones de hibridación es diagnóstico de una planta de maíz, una parte de planta de maíz o una semilla de maíz homocigota para el evento de maíz ZM_BCS216090, y donde la detección de la hibridación tanto de la primera sonda como de la segunda sonda en las condiciones de hibridación es diagnóstico de una planta de maíz, una parte de planta de maíz o una semilla de maíz heterocigota para el evento de maíz ZM_BCS216090. En formas de realización particulares, el conjunto de sondas comprende SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 16.

[28] En otro aspecto más, se proporciona un método para producir una planta de maíz que tiene una altura de planta reducida o una mayor resistencia al acame, que comprende: introducir el evento de maíz ZM_BCS216090 en una planta de maíz, donde una muestra representativa de semilla que comprende el evento se ha depositado bajo ATCC Acceso Nro. PTA-127050. También se proporciona en el presente documento una población de plantas de maíz transgénicas producidas de acuerdo con un método de la invención, donde cada planta de maíz transgénica comprende el evento de maíz ZM_BCS216090. En formas de realización particulares, dicha población de plantas de maíz tiene una altura de planta reducida en promedio con respecto a una población de plantas de maíz de control que carecen del evento de maíz ZM_BCS216090. En formas de realización adicionales, la población de plantas de maíz tiene una mayor resistencia al acame en promedio en relación con una población de plantas de maíz de control que carecen del evento de maíz ZM_BCS216090.

[29] Lo anterior y otros aspectos de la divulgación se harán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[30] La FIG. 1 representa la secuencia del evento de maíz ZM_BCS216090. Las líneas horizontales y los cuadros corresponden a las posiciones 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, y SEQ ID NO: 9, en relación con SEQ ID NO: 10. Las flechas horizontales etiquetadas SQ51606 (SEQ ID NO: 11) y SQ51629 (SEQ ID NO: 12) representan la posición aproximada de un par de cebadores que pueden usarse para detectar el evento de maíz ZM_BCS216090, y la línea horizontal etiquetada PB50583 (SEQ ID NO: 13) representa la posición aproximada de una sonda de ADN que se puede usar para detectar el evento de maíz ZM_BCS216090.

[31] La FIG. 2 muestra el mapa del vector de la construcción pM578 usado para la transformación mediada por *Agrobacterium* de maíz, para producir eventos transgénicos que se proporcionan en el presente documento, incluido ZM_BCS216090.

[32] La FIG. 3 representa el casete de expresión de miARN del evento de maíz ZM_BCS216090 en relación con SEQ ID NO: 9, con sus respectivos elementos genéticos etiquetados como se describe en la Tabla 1.

[33] La FIG. 4 representa el tiempo aproximado de creación, prueba, caracterización y selección del evento de maíz ZM_BCS216090 como se describe en el presente documento.

[34] La FIG. 5 es una representación diagramática del proceso de reproducción para producir el evento de maíz ZM_BCS216090 libre de marcador. Los eventos de generación R₀ (“transformantes”) son aquellos que se derivan de la transformación inicial con el vector de transformación usado para generar el evento de maíz ZM_BCS216090. Las generaciones “R” posteriores (R₁ y R₂) representan generaciones sucesivas producidas a través de la autopolinización de plantas derivadas del transformante R₀ inicial que resultó en el evento de maíz ZM_BCS216090. Los transformantes R₂, que son homocigotos para la inserción de T-ADN, se cruzan por polinización con una línea de maíz transgénica de élite que comprende un casete transgénico para la expresión de Cre-recombinasa, lo que produce una generación F₁, en la que muchos de los descendientes han perdido el casete de marcador seleccionable CP4 EPSPS debido a la escisión de Cre-recombinasa. Se seleccionan plantas hemicigotas T-ADN positivas, CP4 EPSPS negativas, y se autopolinizan, para lograr una generación F₂. Las plantas F₂ homocigotas

para el T-ADN insertado sin el gen marcador CP4 EPSPS y que carecen del casete de transgén Cre-recombinasa se seleccionan y se autopolinizan para dar origen a una generación F₃. Las plantas de la generación F₃ se autopolinizan para dar origen a una línea pura de semillas F₄ estándar de oro.

[35] La FIG. 6 muestra una representación del sitio de inserción del evento de maíz ZM_BCS216090 en relación con el genoma de maíz endógeno en el cromosoma 1.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

[36] SEQ ID NO: 1 es una secuencia de 30 nucleótidos que representa la región de unión 5' del ADN genómico de maíz y el casete de expresión transgénico integrado. SEQ ID NO: 1 se encuentra dentro de SEQ ID NO: 10 en las posiciones de nucleótidos 986 a 1015.

[37] SEQ ID NO: 2 es una secuencia de 30 nucleótidos que representa la región de unión 3' del casete de expresión transgénico integrado y el ADN genómico de maíz. SEQ ID NO: 2 se encuentra dentro de SEQ ID NO: 10 en las posiciones de nucleótidos 3719 a 3748.

[38] SEQ ID NO: 3 es una secuencia de 60 nucleótidos que representa la región de unión 5' del ADN genómico de maíz y el casete de expresión transgénico integrado. SEQ ID NO: 3 se encuentra dentro de SEQ ID NO: 10 en las posiciones de nucleótidos 971 a 1030.

[39] SEQ ID NO: 4 es una secuencia de 60 nucleótidos que representa la región de unión 3' del casete de expresión transgénico integrado y el ADN genómico de maíz. SEQ ID NO: 4 se encuentra dentro de SEQ ID NO: 10 en las posiciones de nucleótidos 3704 a 3763.

[40] SEQ ID NO: 5 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. SEQ ID NO: 5 se encuentra dentro de SEQ ID NO: 10 en las posiciones de nucleótidos 951 a 1050.

[41] SEQ ID NO: 6 es una secuencia de 100 nucleótidos que representa la región de unión 3' del casete de expresión transgénico integrado y el ADN genómico de maíz. SEQ ID NO: 6 se encuentra dentro de SEQ ID NO: 10 en las posiciones de nucleótidos 3684 a 3783.

[42] SEQ ID NO: 7 es una secuencia de 1180 nucleótidos que representa 1000 nucleótidos de ADN genómico de maíz flanqueante 5' y 180 nucleótidos del T-ADN insertado. SEQ ID NO: 7 se encuentra dentro de SEQ ID NO: 10 en las posiciones de nucleótidos 1 a 1180.

[43] SEQ ID NO: 8 es una secuencia de 1107 nucleótidos que representa 107 nucleótidos del T-ADN insertado y 1000 nucleótidos del ADN genómico de maíz flanqueante 3' después del T-ADN insertado. SEQ ID NO: 8 se encuentra dentro de SEQ ID NO: 10 en las posiciones de nucleótidos 3627 a 4733.

[44] SEQ ID NO: 9 es una secuencia de 2733 nucleótidos correspondiente al T-DNA insertado transgénico del evento de maíz ZM_BCS216090. SEQ ID NO: 9 se encuentra dentro de SEQ ID NO: 10 en las posiciones de nucleótidos 1001 a 3733.

[45] SEQ ID NO: 10 es una secuencia de 5731 nucleótidos correspondiente a la secuencia de nucleótidos contig de la secuencia de nucleótidos de ADN flanqueante genómico 5', la secuencia de nucleótidos de T-ADN insertada en el evento ZM_BCS216090 y la secuencia de nucleótidos de ADN flanqueante 3'; e incluye SEQ ID NO: 17 (nucleótidos 1-1000), SEQ ID NO: 9 (nucleótidos 1001 a 3733) y SEQ ID NO: 18 (nucleótidos 3734 a 4733).

[46] SEQ ID NO: 11 es una secuencia de 19 nucleótidos correspondiente a un cebador de amplificación térmica referido como SQ51606 usado para identificar ADN del evento de maíz ZM_BCS216090 en una muestra, y es idéntica a la secuencia de nucleótidos correspondiente a las posiciones 982 a 1000 de SEQ ID NO: 10.

[47] SEQ ID NO: 12 es una secuencia de 21 nucleótidos correspondiente a un cebador de amplificación térmica referido como SQ51629 usado para identificar ADN del evento de maíz ZM_BCS216090 en una muestra, y es idéntica al complemento inverso de la secuencia de nucleótidos correspondiente a las posiciones 1049 a 1069 de SEQ ID NO: 10.

[48] SEQ ID NO: 13 es una secuencia de 19 nucleótidos correspondiente a una sonda referida como PB50583 usada para identificar ADN del evento de maíz ZM_BCS216090 en una muestra, y es idéntica al complemento inverso de la secuencia de nucleótidos correspondiente a las posiciones 1028 a 1046 de SEQ ID NO: 10.

[49] SEQ ID NO: 14 es una secuencia de 24 nucleótidos correspondiente a un cebador de amplificación térmica referido como SQ20222 usado como un control interno para el ensayo de evento y cigosidad para el evento de maíz ZM_BCS216090, e hibrida a una región del genoma de maíz.

[50] SEQ ID NO: 15 es una secuencia de 28 nucleótidos correspondiente a un cebador de amplificación térmica referido como SQ20221 usado como un control interno para el ensayo de evento y cigosidad para el evento de maíz ZM_BCS216090, e hibrida a una región del genoma de maíz.

[51] SEQ ID NO: 16 es una secuencia de 17 nucleótidos correspondiente a una sonda referida como PB50298 usada como un control interno para el ensayo de evento y cigosidad para el evento de maíz ZM_BCS216090, e hibrida a una región del genoma de maíz.

[52] SEQ ID NO: 17 es una secuencia de 1000 nucleótidos del ADN genómico de maíz flanqueante 5' hasta, pero sin incluir, la unión 5'. SEQ ID NO: 17 se encuentra dentro de SEQ ID NO: 10 en las posiciones de nucleótidos 1 a 1000.

[53] SEQ ID NO: 18 es una secuencia de 1000 nucleótidos del ADN genómico de maíz flanqueante 3' iniciando desde, pero sin incluir, la unión 3'. SEQ ID NO: 18 se encuentra dentro de SEQ ID NO: 10 en las posiciones de nucleótidos 3734 a 4733.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[54] La altura de la planta es un rasgo agronómico importante en los cultivos, ya que puede afectar directamente el potencial de rendimiento y la resistencia al acame. La manipulación de los niveles de GA en variedades de plantas semienanas de trigo, arroz y sorgo condujo a un aumento del rendimiento y una reducción del acame en los cultivos de cereales durante el siglo XX, que fue en gran parte responsable de la Revolución Verde. Las giberelinas (ácidos giberélicos o GA) son hormonas vegetales que regulan diversos procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas, incluidos el alargamiento del tallo, la germinación, la latencia, la floración, el desarrollo de las flores y la senescencia de las hojas y los frutos. Los GA bioactivos en el maíz incluyen GA₁, GA₃, GA₄ y GA₇. La biosíntesis de GA está regulada por genes que codifican GA20–oxidasa (*GA20ox*) y GA3–oxidasa (*GA3ox*) que catalizan pasos en la síntesis de GA bioactivos, mientras que el

catabolismo de GA está regulado por genes que codifican GA2–oxidasas (*GA2ox*) que reducen el nivel de GA activos. Mediante la manipulación de genes en las vías de catabolismo o biosíntesis de GA, se puede disminuir el nivel de GA activos para reducir la altura de la planta.

[55] La presente divulgación proporciona un evento de maíz transgénico, designado ZM_BCS216090, que comprende un casete de expresión transgénico que codifica un microARN (miARN) que suprime la expresión de los genes endógenos *GA20ox3* y *GA20ox5* en el maíz. La reducción en los niveles de giberelinas causada por el evento ZM_BCS216090 produce una disminución de la longitud de los entrenudos y una disminución general de la altura de la planta, sin ninguna anomalía observable. Estas plantas de maíz de baja estatura que comprenden el evento ZM_BCS216090 son menos susceptibles a la pérdida de cultivos debido al acame y al quebrado en verde. Por lo tanto, las plantas de maíz que comprenden el evento ZM_BCS216090 brindan a los productores de maíz una nueva opción para aumentar el potencial de rendimiento y reducir las pérdidas de cultivos debido al acame o al quebrado en verde, especialmente cuando se enfrentan a eventos climáticos o de viento adversos o extremos.

[56] Las técnicas de transformación de plantas, tales como la transformación mediada por *Agrobacterium* o por bombardeo de partículas, se pueden usar para insertar aleatoriamente ADN extraño (también conocido como ADN transgénico) en un cromosoma del genoma de una célula vegetal para producir una célula vegetal desarrollada genéticamente, también denominada célula “transgénica” o “recombinante”. Usando estas técnicas de transformación no dirigidas, se pueden transformar muchas células individuales, cada una de las cuales produce un "evento transgénico" o "evento" único debido a la inserción aleatoria (o en gran parte aleatoria) del ADN extraño en el genoma. A continuación, se puede regenerar una planta transgénica a partir de cada célula transgénica individual. Esto hace que cada célula de la planta transgénica contenga el evento transgénico insertado de forma única como parte estable de su genoma. A continuación, la planta transgénica se puede usar para producir plantas de progenie, cada una de las cuales contiene el evento transgénico único. El término “transgénico” se refiere a una planta, parte de planta, célula vegetal, tejido vegetal, o molécula, construcción o secuencia de ADN, según sea el caso, que comprende un transgén; por ejemplo, una “célula transgénica” se refiere a una célula que comprende un transgén.

[57] El evento de maíz ZM_BCS216090 fue producido por un proceso de transformación mediado por *Agrobacterium* de embriones inmaduros de maíz con un solo sistema binario de T-ADN. En este sistema, se utilizó una cepa de *Agrobacterium* que empleaba un vector de plásmido binario con un solo T-DNA. La construcción de T-DNA comprendía un casete transgénico para la expresión de un microARN (miARN) que suprime la expresión de los genes endógenos de giberelina oxidasa *GA20ox3* y *GA20ox5*, y un casete transgénico utilizado para la selección de células de maíz transformadas mediante la selección con glifosato (CP4). El casete de selección de glifosato estaba flanqueado en ambos lados con sitios de reconocimiento LoxP que son reconocidos por Cre-recombinasa, derivada del fago P1 de *Enterobacteria* (Gilbertson, *TRENDS in Biotechnology*, 21(12):550–555, 2003).

[58] Como se describe específicamente en este documento, el evento de maíz ZM_BCS216090 fue producido por un complejo proceso de investigación y desarrollo en el que: (1) una construcción de ADN y un vector que comprende dos casetes de expresión como se identificó anteriormente dentro de una región de T-ADN delimitada por secuencias de borde izquierdo y derecho se diseñaron y se seleccionaron en función de pruebas individuales de cada casete de expresión, así como en combinación; (2) se transformaron miles de células de maíz con la construcción utilizada para generar el evento ZM_BCS216090 y otros eventos, de modo de crear una población de plantas transgénicas en la que cada planta contenía un evento transgénico único que se regeneró; (3) más de cien plantas transgénicas avanzaron a través de una serie de cruces propios y cruzados para pruebas adicionales y selección de eventos después de excluir muchos eventos en función del cribado de calidad molecular y el desarrollo de producto y semillas de patrón de oro; (4) el casete de selección de glifosato en el evento de maíz ZM_BCS216090 se eliminó a través de una escisión Cre *in vivo* para crear eventos "libres de marcadores"; y (5) el evento principal final ZM_BCS216090 fue seleccionado entre muchos eventos diferentes después de un riguroso proceso de selección de eventos de varios años que involucró pruebas y análisis de sus características moleculares y genómicas, datos de eficacia y rendimiento, consideraciones de mejoramiento y rasgos, y propiedades agronómicas en una diversidad de antecedentes genéticos para cada evento que se adelantó para la prueba. El evento de maíz ZM_BCS216090 se produjo y se seleccionó como un evento excepcionalmente superior, útil para fines agronómicos a gran escala.

[59] El T-ADN del vector del plásmido de transformación e insertado en el genoma del evento de maíz ZM_BCS216090 se caracterizó mediante un análisis molecular detallado. Este análisis incluyó: el número de inserciones (número de sitios de integración dentro del genoma del maíz), la ubicación de la inserción genómica (el sitio específico en el genoma del maíz donde ocurrió la inserción), el número de copias (el número de copias del T-ADN dentro un locus), y la integridad del ADN transgénico insertado. El análisis molecular detallado demostró que el T-ADN integrado que contenía el casete de miARN transgénico permaneció intacto después de la integración y la escisión Cre del casete de selección de glifosato (CP4) EPSPS. Como se usa en el presente documento, un "casete de expresión" o "casete" o "transgén" es una molécula o secuencia de ADN recombinante que comprende una combinación de distintos elementos que pueden expresar un ARN y/o una proteína codificados por una secuencia de codificación del transgén en una célula vegetal transformada que comprende el transgén. Como se proporciona en el presente documento, un "casete de expresión" o "casete" o "transgén" incluye uno o más elementos reguladores unidos operativamente a la secuencia de ADN codificante o transcribible para el miARN, incluidas las secuencias de promotor, líder, intrón y de terminación. El "casete de expresión" o "casete" o "transgén" es recombinante y heterólogo con respecto al genoma de la célula vegetal transformada. Para los fines de la presente divulgación, dicho "casete de expresión" o "casete" o "transgén" es una molécula o secuencia de ADN recombinante que codifica un miARN como se describe en el presente documento. La Tabla 1 proporciona un listado de los elementos contenidos en SEQ ID NO: 10 después de la escisión Cre del casete CP4, la secuencia de ADN que corresponde al evento de maíz ZM_BCS216090.

Tabla 1. Descripción del evento de maíz ZM_BCS216090.

Elemento	Posición en SEQ ID NO: 10	Descripción
ADN flanqueante 5'	1-1000	Secuencia de ADN que flanquea el extremo 5' de la inserción transgénica
Región borde izquierdo	1001-1040	Región de ADN de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> que contiene la secuencia de borde izquierdo

Secuencia intermedia	1041–1296	Secuencia usada en la clonación de ADN
RTBV.–1:1:6	1297–2023	Secuencia de promotor del virus <i>Rice tungro bacilliform</i>
RTBV.–1:1:4	2024–2062	Secuencia líder del virus <i>Rice tungro bacilliform</i>
Secuencia intermedia	2063–2082	Secuencia usada en la clonación de ADN
I–Zm.DnaK:1	2083–2886	Secuencia de intrón de un gen de choque térmico de maíz (<i>Zea mays</i>)
Os.MIRMON13–1: 1:3	2887–2998	Secuencia de espinazo de un gen de miARN de arroz (<i>Oryza sativa</i>)
Zm.miRNA.nno:3	2999–3019	Secuencia de miARN transgénica
Os.MIRMON13–1: 1:2	3020–3053	Secuencia de bucle del gen de miARN de arroz (<i>Oryza sativa</i>)
Zm.miRNA.nno:42	3054–3074	Secuencia de miARN* transgénica
Os.MIRMON13	3075–3294	Secuencia de espinazo del miARN de arroz (<i>Oryza sativa</i>)
Secuencia intermedia	3295–3326	Secuencia usada en la clonación de ADN
T–GST43	3327–3626	Secuencia 3' UTR
Secuencia intermedia	3627–3733	Secuencia usada en la clonación de ADN
Secuencia flanqueante 3'	3734–4733	Secuencia de ADN que flanquea el extremo 3' de la inserción transgénica

[60] El evento de maíz ZM_BCS216090 se caracteriza como una inserción en un solo locus en el genoma del maíz, lo que produce dos nuevos loci o secuencias de unión (p. ej., secuencias establecidas en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO : 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y

SEQ ID NO: 6) que abarcan una porción del ADN insertado y el ADN genómico del maíz, los cuales no se conocen por aparecer o existir naturalmente en el genoma del maíz u otros eventos de maíz transgénicos –son exclusivos del evento ZM_BCS216090. SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 abarcan una de las uniones, y SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 abarcan la otra unión. Estas secuencias de unión son útiles para detectar la presencia del evento ZM_BCS216090 en células de maíz, tejido de maíz, semillas de maíz y plantas de maíz o productos de plantas de maíz, tales como productos básicos de maíz. En el presente documento se describen sondas moleculares de polinucleótidos o ADN y/o pares de cebadores que han sido o podrían ser desarrollados para el uso en la identificación de la presencia de estos diversos segmentos de unión en muestras biológicas que contienen o se derivan, o se sospecha que contienen o se derivan de células de maíz, semillas de maíz, partes de plantas de maíz, plantas de maíz o tejidos de plantas de maíz que contienen el evento ZM_BCS216090.

[61] Como se usa en este documento, el término "derivado" o "derivado de" con referencia a una molécula, un amplicón o secuencia de ADN particular en relación con una célula de maíz, tejido de maíz, semilla de maíz, planta de maíz, parte de planta de maíz y/o producto de la planta de maíz, tal como un producto básico de maíz, significa que la molécula, el amplicón o la secuencia de ADN se toma, se purifica, se aísla o se fabrica, directa o indirectamente, a partir de dicha célula de maíz, tejido de maíz, semilla de maíz, planta de maíz, parte de planta de maíz y/o producto de planta de maíz, tal como un producto básico de maíz, según sea el caso. Alternativamente, el término "derivado" o "derivado de" con referencia a un producto de planta de maíz, tal como un producto básico de maíz, en relación con una célula de maíz, tejido de maíz, semilla de maíz, planta de maíz y/o parte de planta de maíz, significa que el producto de planta de maíz se toma, se purifica, se aísla o se elabora, directa o indirectamente, a partir de dicha célula de maíz, tejido de maíz, semilla de maíz, planta de maíz y/o parte de planta de maíz, según sea el caso. "Capaz de ser detectado" se refiere a la capacidad de una molécula, un segmento o una secuencia de ADN particular para detectarse en una muestra, por ejemplo, mediante amplificación, y la determinación de su presencia, tamaño o secuencia, por ejemplo, mediante análisis de secuencia de ADN y/o unión de una sonda a la molécula, el segmento o la secuencia de ADN objetivo.

[62] Una “muestra” tiene la intención de referirse a cualquier composición que comprenda o se derive, directa o indirectamente, de una muestra, fuente o material biológico. La muestra puede

comprender generalmente ADN de maíz y/o ADN de maíz sustancialmente o completamente puro, purificado o aislado. Una "muestra biológica" contiene materiales biológicos, incluidos, entre otros, ADN obtenido o derivado, o bien directa o indirectamente, del genoma de una o más células de maíz, tejidos de maíz, semillas de maíz, plantas de maíz, partes de plantas de maíz y/o productos de plantas de maíz, tales como productos básicos de maíz. Tales células de maíz, tejidos de maíz, semillas de maíz, plantas de maíz, partes de plantas de maíz y/o productos de plantas de maíz, tales como productos básicos de maíz, pueden comprender el evento de maíz ZM_BCS216090 o moléculas de ADN y/o segmentos de ADN que comprenden el evento de maíz ZM_BCS216090. En algunas formas de realización, una muestra o muestra biológica puede comprender células de maíz, tejidos de maíz, semillas de maíz, plantas de maíz, partes de plantas de maíz y/o productos de plantas de maíz, cuyas células o membranas celulares se han fracturado (p. ej., se han alterado o abierto) para liberar el contenido de las células de maíz, incluido el ADN genómico, y/o hacer que el contenido de las células de maíz, incluido el ADN genómico, sea accesible o utilizable para ensayos o pruebas. "Directamente" se refiere a la obtención directa de ADN por parte de un experto a partir del genoma del maíz mediante la fracturación de células de maíz (o mediante la obtención de muestras de maíz que contienen células de maíz fracturadas) y la exposición o el uso del ADN genómico de las células de maíz con fines de detección. "Indirectamente" se refiere a la obtención por parte de un experto, de un ADN objetivo o de referencia específico (es decir, uno o más segmentos de unión nuevos y únicos descritos en este documento como diagnósticos de la presencia del evento ZM_BCS216090) en una muestra particular, por medios distintos de la obtención directa mediante la fracturación de células de maíz, o la obtención de una muestra de maíz que contiene células de maíz fracturadas. Dichos medios indirectos incluyen, sin limitación, la amplificación de un segmento de ADN que contiene una secuencia de ADN dirigida por una o más sondas particulares y/o conjuntos de cebadores diseñados para unirse con especificidad a la secuencia objetivo o cerca de ella, o la amplificación de un segmento de ADN que comprende la totalidad o parte de una secuencia objetivo que puede medirse y caracterizarse (p. ej., medirse mediante migración o separación de otros segmentos de ADN y/o identificación en una matriz eficaz, tal como un gel de agarosa o acrilamida o similares, o caracterizarse por el análisis de secuencia directa de los amplicones, o la clonación de los amplicones en un vector o vectores y la secuenciación directa de los amplicones insertados presentes en dichos vectores).

[63] El análisis molecular detallado demostró que el evento ZM_BCS216090 contiene una única inserción de T-ADN con una copia del casete de expresión de miARN transgénico SD419. En el evento ZM_BCS216090, no se identificaron elementos adicionales de la construcción de transformación que no fueran porciones de la región del borde izquierdo de *Agrobacterium tumefaciens* utilizada para la transferencia de ADN transgénico desde el plásmido de transformación de planta hacia el genoma del maíz. Finalmente, se realizó la amplificación térmica que produjo amplicones específicos diagnóstico de la presencia del evento ZM_BCS216090 en una muestra, y se realizaron análisis de secuencias de ADN para determinar las uniones 5' y 3' asignadas de inserción al genoma de la planta, confirmar la organización de los elementos dentro de la inserción, y determinar la secuencia de ADN completa del ADN transgénico insertado (SEQ ID NO: 9). SEQ ID NO: 7 es una secuencia correspondiente a la secuencia de ADN genómico de maíz 5' de SEQ ID NO: 10 y una porción de la secuencia de T-ADN insertada presentada como SEQ ID NO: 9. SEQ ID NO: 8 es una secuencia correspondiente a la secuencia de ADN genómico de maíz 3' de SEQ ID NO: 10 y una porción de la secuencia de T-ADN insertada presentada como SEQ ID NO: 9. SEQ ID NO: 10 corresponde al evento de maíz ZM_BCS216090 y contiene una secuencia contigua (contig) que comprende la secuencia flanqueante genómica de maíz en 5', la inserción transgénica del evento ZM_BCS216090 y la secuencia flanqueante genómica de maíz 3' y, por lo tanto, contiene las secuencias de unión de inserción al genoma de planta 5' y 3'. Como se usa en el presente documento, las designaciones 5' y 3' con referencia a la unión, la dirección y el lado de la inserción del evento transgénico son relativas a la dirección 5' a 3' del transgén, donde la unión 5' y la secuencia genómica están corriente ascendente del transgén, y la unión 3' y la secuencia genómica están corriente descendente del transgén.

[64] A menos que se indique lo contrario en este documento, los términos deben entenderse de acuerdo con el uso convencional por los expertos en la técnica pertinente. Las definiciones de términos comunes en biología molecular se pueden encontrar en Rieger *et al.*, Glossary of Genetics: Classical and Molecular, 5th edition, Springer-Verlag: New York, 1991; y Lewin, Genes V, Oxford University Press: New York, 1994, junto con otras fuentes conocidas por los expertos en la técnica pertinente. Como se usa en este documento, el término "maíz" significa especies de plantas dentro de *Zea mays* y todas las variedades de plantas pertenecientes al género *Zea* que se pueden reproducir con plantas de *Zea mays*, incluidas las especies de maíz silvestre.

[65] La presente descripción proporciona plantas de maíz o maíz transgénicos que se han transformado con una construcción de ADN que contiene un casete de expresión que codifica un miARN transgénico para suprimir la expresión de genes objetivo de *GA20 oxidasa* endógenos. Los términos "suprimir" y "supresión", tal como se utilizan en el presente documento, se refieren a una disminución, reducción o eliminación del nivel de expresión de un ARNm y/o una proteína codificados por un gen objetivo en una planta, célula vegetal o tejido vegetal en una o más etapas de desarrollo de la planta, en comparación con el nivel de expresión de dicho ARNm y/o proteína de gen objetivo en una planta, célula o tejido de tipo salvaje o de control en las mismas etapas de desarrollo de la planta. Las plantas de maíz transformadas de acuerdo con los métodos y con la construcción de ADN descrita en el presente documento tienen un fenotipo de estatura baja (altura de la planta más baja).

[66] Una planta transgénica se produce mediante la transformación de una célula vegetal con una construcción de ADN recombinante que incluye el casete de expresión y el transgén que codifica el miARN como se describe en este documento. Tal construcción de ADN recombinante también es heteróloga con respecto a la célula vegetal, la regeneración de al menos una planta a partir de la célula vegetal que comprende una inserción del transgén en el genoma de la célula vegetal y la selección de una planta particular caracterizada por la inserción del transgén en una ubicación genómica particular de la planta en función de una serie de características y rasgos eficaces y de calidad del evento y la planta transgénica regenerada y la progenie como se describe más adelante en el presente documento. El término "evento transgénico" o "evento" se refiere al ADN transgénico insertado en el genoma de la planta y las secuencias genómicas que lo flanquean inmediatamente adyacentes al ADN transgénico insertado en el genoma de la planta transformada, pero también se refiere a una molécula de ADN que comprende el ADN transgénico insertado en el genoma de la planta y las secuencias genómicas flanqueantes. Cada evento es único, y se esperaría su transferencia a las plantas de progenie que reciben el ADN transgénico y el evento a través de herencia genética y/o segregación a partir de un progenitor como resultado de un cruce sexual o autocruzamiento de una primera línea parental que incluye el ADN transgénico insertado y el evento, o bien consigo misma, o con una segunda línea parental que puede o no contener el mismo ADN transgénico y evento. La línea parental que incluye el ADN transgénico insertado y el evento puede ser en sí misma el transformante original o una planta de progenie de dicho

transformante original que puede haber sido generada por "autofecundación" del transformante consigo mismo, o cruzando el transformante o una planta de progenie del transformante que incluye el ADN transgénico insertado y el evento, con otra planta. A los efectos de la presente divulgación, el "evento" se refiere al evento de maíz ZM_BCS216090.

[67] Tal como se usa en el presente documento, el término "flanqueante" con referencia a un evento transgénico se refiere a la(s) secuencia(s) genómica(s) de la planta inmediatamente adyacentes a la inserción de ADN transgénico en el genoma de una planta transformada, parte de la planta, tejido vegetal o célula vegetal que comprende el evento transgénico en el(los) lado(s) o extremo(s) 5' y/o 3' de la inserción del evento transgénico. Asimismo, "ADN flanqueante" se refiere a una longitud de secuencia de ADN genómico inmediatamente adyacente a la inserción de ADN transgénico en el genoma de la planta transformada en los lados o extremos 5' y/o 3' de la inserción.

[68] La presente descripción proporciona la planta transformante original y la progenie del transformante que incluye el ADN transgénico y el evento. Dicha progenie se puede producir mediante un cruzamiento sexual o un cruce entre plantas que comprenden el mismo ADN transgénico y evento, o entre una planta que comprende el ADN transgénico y evento con otra planta, o por cualquier otro método conocido en la técnica, incluido cualquier método de cultivo de células o tejidos, donde la progenie incluye el ADN transgénico y el evento. Dicha otra planta puede ser una planta transgénica que comprende el mismo y/o diferente transgén, o puede ser una planta no transgénica, y cada planta parental en un cruce o cruzamiento externo puede ser el mismo o diferente germoplasma o línea de reproducción. Incluso después de repetidos retrocruzamientos con un progenitor recurrente, el ADN transgénico y el evento están presentes en la progenie del cruce en la misma ubicación cromosómica. Por lo tanto, una "planta transgénica" puede ser la planta transformante original regenerada a partir de la célula vegetal transformada y que comprende el ADN transgénico y el evento, o una planta de progenie de la planta transformante original, que puede estar separada del transformante por una o más generaciones, que retiene el ADN transgénico y el evento en la misma ubicación específica y contexto de secuencia en el genoma de la planta. La planta transformante o progenie puede ser homocigota o heterocigota para el evento ZM_BCS216090. Además, una "planta transgénica" puede incluir una planta producida a partir de una célula o un tejido vegetal transformados, o a partir de otra planta o parte de planta

transgénica, mediante o utilizando métodos de cultivo de células o tejidos conocidos en la técnica. Una "planta transgénica" puede comprender una planta que tiene un transgén insertado de forma estable en el genoma de al menos una célula de la planta (es decir, evento de maíz ZM_BCS216090 en al menos una célula de la planta), y la planta puede ser quimérica o no quimérica con respecto al transgén y/o evento. Una planta transgénica es quimérica con respecto a un transgén si no todas las células de la planta comprenden el transgén.

[69] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "recombinante" se refiere a un ADN, una proteína o una combinación no naturales que normalmente no se encontrarían en la naturaleza, tales como una combinación de secuencias de ADN, proteínas que no se encontrarían naturalmente juntas, y es el resultado de la intervención humana. Una "molécula de ADN recombinante" es una molécula de ADN que comprende una combinación de secuencias de ADN que no ocurrirían naturalmente juntas y es el resultado de la intervención humana. Dos o más elementos de dicha combinación de secuencias de ADN se pueden unir operativamente entre sí. Por ejemplo, una molécula de ADN recombinante puede comprender una combinación de al menos dos secuencias de ADN que son heterólogas entre sí, tal como una molécula de ADN que comprende una secuencia de ADN codificante o transcribible unida operativamente a un promotor heterólogo y/u otros elementos de expresión reguladores, y/o una secuencia de ADN genómico vegetal que comprende la totalidad o parte de un transgén y una o más secuencias genómicas heterólogas y flanqueantes adyacentes al transgén, y/o una molécula de ADN que se sintetiza artificialmente y comprende una secuencia de polinucleótido que se desvía de cualquier secuencia de polinucleótido que existiría normalmente en la naturaleza. Una molécula de ADN recombinante puede comprender la totalidad o parte de una secuencia de unión del genoma de una planta y la totalidad o parte de la inserción del transgén en el genoma de la planta, y/o puede comprender un fragmento de ADN recombinante o heterólogo del evento ZM_BCS216090. Un ejemplo de una molécula de ADN recombinante es una molécula de ADN que comprende al menos una de las SEQ ID NO: 1-10. Como se usa en el presente documento, una planta recombinante, parte de planta, célula vegetal o tejido vegetal es una planta, parte de planta, célula vegetal o tejido vegetal que normalmente no existiría en la naturaleza, es el resultado de la intervención humana y contiene un transgén incorporado en el genoma de la planta, parte de la planta, célula vegetal o tejido vegetal. Como resultado de tal inserción genómica, la planta recombinante es algo nuevo y

claramente diferente de cualquier planta, parte de planta, célula vegetal o tejido vegetal relacionado de tipo salvaje o natural. Un ejemplo de una planta recombinante, parte de planta, célula vegetal o tejido vegetal recombinante es una planta de maíz, parte de planta, célula vegetal o tejido vegetal que contiene el evento ZM_BCS216090.

[70] Como se usa en el presente documento, el término "heterólogo" con referencia a una combinación de dos o más secuencias o elementos de ADN significa que las dos o más secuencias o elementos de ADN normalmente no existen juntos como tal combinación en la naturaleza sin intervención humana. Tal como se usa en el presente documento, el término "heterólogo" con referencia a una molécula, construcción o secuencia de ADN en relación con una planta, un microorganismo, una célula vegetal o un genoma de planta significa que la molécula, construcción o secuencia de ADN no existe en la naturaleza como parte de tal planta, microorganismo, célula vegetal o genoma vegetal, y/o no existe en la misma ubicación física o genómica, contexto u orientación como parte de dicha planta, microorganismo, célula vegetal o genoma vegetal en la naturaleza, sin intervención humana.

[71] La presente divulgación proporciona moléculas y fragmentos de ADN y sus correspondientes secuencias de ADN. Los términos "ADN" y "molécula de ADN", como se usan en el presente documento, se refieren a una molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN). Una molécula de ADN puede ser de origen genómico o sintético y/o comprender una molécula o secuencia de ADN recombinante o heteróloga. Una molécula de ADN puede describirse con referencia a su extremo 5' (corriente ascendente) y su extremo 3' (corriente descendente). Como se usa en el presente documento, el término "secuencia de ADN" se refiere a la secuencia de polinucleótido de la molécula de ADN, es decir, la secuencia de nucleótidos consecutivos en la molécula de ADN. Como se usa en el presente documento con referencia a los nucleótidos de un polinucleótido o secuencia o molécula de ADN, los términos "consecutivo" y "contiguo" son intercambiables y sinónimos y se refieren al orden de 5' a 3' de los nucleótidos en un polinucleótido o en una secuencia, hebra o molécula de ADN, sin ningún espacio o interrupción entre ellos. Por convención, las secuencias de ADN de la descripción y los fragmentos de las mismas se describen con referencia a la dirección 5' a 3' de solo una hebra de las dos hebras de ADN complementarias y antiparalelas de una molécula de ADN. Por implicación e intención, las secuencias complementarias de las secuencias proporcionadas aquí (es decir, las secuencias de la hebra

complementaria, opuesta o antiparalela), también denominadas en la técnica secuencias complementarias inversas o de complemento inverso, están dentro del alcance de la presente divulgación y están expresamente destinadas a estar dentro del alcance potencial del objeto del asunto reivindicado. Una molécula de ADN, o un fragmento derivado de la misma, también puede extraerse de partes de plantas, células de plantas y/o tejidos o un homogeneizado, extracto o lisado de partes de plantas, células de plantas y/o tejido(s), o puede producirse como un amplicón a partir de ADN extraído, purificado o aislado de parte(s) de plantas, célula(s) de plantas y/o tejido(s), o un homogeneizado, extracto o lisado de parte(s) de plantas, célula(s) vegetal(es) y/o tejido(s), que puede comprender también el evento ZM_BCS216090.

[72] Como se usa en este documento, el término "fragmento" se refiere a un trozo o una secuencia más pequeña de una molécula o secuencia de ADN más grande o completa. Por ejemplo, un fragmento de SEQ ID NO: 9 o 10 puede incluir una secuencia que es por lo menos alrededor de 12 nucleótidos consecutivos, por lo menos alrededor de 13 nucleótidos consecutivos, por lo menos alrededor de 14 nucleótidos consecutivos, por lo menos alrededor de 15 nucleótidos consecutivos, por lo menos alrededor de 16 nucleótidos consecutivos, por lo menos alrededor de 17 nucleótidos consecutivos, por lo menos alrededor de 18 nucleótidos consecutivos, por lo menos alrededor de 19 nucleótidos consecutivos, por lo menos alrededor de 20 nucleótidos consecutivos, por lo menos alrededor de 21 nucleótidos consecutivos, por lo menos alrededor de 22 nucleótidos consecutivos, por lo menos alrededor de 23 nucleótidos consecutivos, por lo menos alrededor de 24 nucleótidos consecutivos, por lo menos alrededor de 25 nucleótidos consecutivos, por lo menos alrededor de 30 nucleótidos consecutivos, por lo menos alrededor de 35 nucleótidos consecutivos, por lo menos alrededor de 40 nucleótidos consecutivos, por lo menos alrededor de 45 nucleótidos consecutivos, por lo menos alrededor de 50 nucleótidos consecutivos, por lo menos alrededor de 60 nucleótidos consecutivos, por lo menos alrededor de 70 nucleótidos consecutivos, por lo menos alrededor de 80 nucleótidos consecutivos, por lo menos alrededor de 90 nucleótidos consecutivos, por lo menos alrededor de 100 nucleótidos consecutivos, por lo menos alrededor de 200 nucleótidos consecutivos, por lo menos alrededor de 300 nucleótidos consecutivos, por lo menos alrededor de 400 nucleótidos consecutivos, o por lo menos alrededor de 500 nucleótidos consecutivos de la molécula de ADN o secuencia de SEQ ID NO: 9 o 10 más grande, entera o completa.

[73] Como se usa en el presente documento, el término "aislado" con referencia a una molécula significa que la molécula está al menos parcialmente separada de otras moléculas o secuencias que normalmente están asociadas con la molécula en su estado nativo o natural. En algunas formas de realización, el término "aislada/o" se refiere a una molécula de ADN que está al menos parcialmente separada de los ácidos nucleicos o polinucleótidos o secuencia(s) de ADN que normalmente la flanquean y que están unidas covalentemente a la secuencia de la molécula de ADN en su estado nativo o natural. Una molécula de ADN "aislada" puede tener una secuencia de ADN correspondiente a una porción del genoma de una célula vegetal sin otras secuencias de ADN genómicas que normalmente flanquean y están unidas covalentemente a la secuencia de ADN en la naturaleza. Dicha molécula de ADN "aislada" puede comprender la totalidad o parte de un transgén y/o evento transgénico, que puede comprender la totalidad o parte del evento de maíz ZM_BCS216090 o el transgén o casete de expresión descrito en el presente documento. Las secuencias o elementos de ácido nucleico, tales como una secuencia codificante, una secuencia de intrones, una secuencia líder no traducida, una secuencia de promotor, una secuencia de terminación de la transcripción y similares, que se encuentran de forma natural en el ADN del genoma de un organismo, no se consideran "aislados", siempre que el elemento esté dentro del genoma del organismo y en la ubicación dentro del genoma en la que se encuentra naturalmente. Sin embargo, cada uno de estos elementos, y las subpartes de estos elementos, estarían "aislados" dentro del alcance de esta divulgación siempre que el elemento o la subparte no esté dentro del genoma del organismo y en la ubicación dentro del genoma del organismo en los que se encuentra naturalmente. Una molécula de ADN "aislada" puede ser cualquier molécula de ADN recombinante o producto de amplificación o amplicón, y/o puede comprender cualquier secuencia de ADN extraída de su estado natural o biológico y fusionada covalentemente a otra molécula o secuencia de ADN con la que no está asociada en la naturaleza. Una molécula de ADN aislada de este tipo podría crearse mediante el uso de técnicas de biotecnología, tales como la fabricación de un ADN recombinante o la integración de una molécula de ADN extraña o heteróloga en el cromosoma de una célula, planta o semilla. Por lo tanto, cualquier molécula de ADN que comprenda una secuencia de nucleótidos, un transgén o casete de expresión transgénicos, recombinantes, quiméricos o artificiales se consideraría una molécula de ADN "aislada", ya que estas secuencias no se producen de forma natural, independientemente de si la secuencia, el

transgén o el casete de expresión está presente dentro de un plásmido, vector o construcción usados para transformar células vegetales, dentro del genoma de una planta, parte de planta, tejido vegetal o célula vegetal, o está presente en cantidades detectables en tejidos, progenie, muestras biológicas o productos básicos derivados de una planta, parte de planta, tejido vegetal o célula vegetal. Una molécula o secuencia de ADN recombinante, o cualquier fragmento derivado de la misma, que comprenda la totalidad o parte de un transgén o una secuencia de unión del evento de maíz, por lo tanto, también se consideraría "aislada". Una molécula de ADN "aislada" puede extraerse o purificarse a partir de una o más plantas transgénicas, partes de plantas, células o tejidos vegetales, o puede estar presente en un homogeneizado, extracto o lisado de cualquiera de dichas plantas, partes de plantas, células y/o tejidos de plantas transgénicos, o puede producirse como un amplicón o producto de amplificación a partir de ADN genómico de plantas y/o ADN extraído o purificado de planta(s), parte(s) de planta, célula(s) y/o tejido(s) vegetal(es), o un homogeneizado, extracto o lisado de planta(s), parte(s) de planta, célula(s) vegetal(es) y/o o tejido(s). A los efectos de esta divulgación, cualquier secuencia de ADN o polinucleótido transgénica, es decir, la secuencia de nucleótidos del ADN insertada en el genoma de una planta o bacteria, o presente en un vector extracromosómico, se consideraría una secuencia de ADN o nucleótido "aislada", ya sea que esté presente dentro del plásmido o estructura similar utilizada para transformar las células, 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. Una molécula de ADN "aislada" es una molécula química o bioquímica, independientemente de si la molécula se denomina ácido nucleico, secuencia de ácido nucleico, secuencia de polinucleótido, secuencia de ADN, molécula de ácido nucleico, molécula de polinucleótido, molécula de ADN, o similar. Una molécula "aislada" puede proporcionar aplicabilidad industrial cuando está presente en una célula vegetal o en un genoma vegetal, o cuando está presente fuera de una célula vegetal y, por lo tanto, proporciona y exhibe (y tiene la intención de proporcionar y exhibir) utilidad independientemente de dónde se encuentra ubicada la molécula.

[74] La unión del enlace de fosfodiéster entre un extremo de un inserto (o inserción) transgénico en el genoma de una planta y el ADN genómico de maíz flanqueante se denomina "unión". En otras palabras, una "unión" es el punto de conexión o la unión covalente de un extremo de un inserto transgénico y el ADN genómico flanqueante. Una unión se encuentra en el extremo 5' de

la inserción transgénica y la otra se encuentra en el extremo 3' de la inserción transgénica, denominadas aquí unión 5' y 3', respectivamente. Una "secuencia de unión" se refiere a una secuencia de ADN de cualquier longitud de nucleótidos consecutivos que abarca la unión 5' o 3' de un evento transgénico en el genoma de la planta. Para que una "secuencia de unión" sea específica de una unión entre un evento transgénico y una secuencia genómica flanqueante, la secuencia de unión generalmente comprenderá una cantidad suficiente de nucleótidos consecutivos en un extremo de la inserción y una cantidad suficiente de nucleótidos consecutivos de la secuencia genómica flanqueante. De acuerdo con algunas formas de realización, una "secuencia de unión" puede comprender (i) por lo menos cinco (5) nucleótidos consecutivos, por lo menos diez (10) nucleótidos consecutivos, por lo menos quince (15) nucleótidos consecutivos, por lo menos veinte (20) nucleótidos consecutivos, o por lo menos treinta (30) nucleótidos consecutivos en un extremo de la inserción, y (ii) por lo menos cinco (5) nucleótidos consecutivos, por lo menos diez (10) nucleótidos consecutivos, por lo menos quince (15) nucleótidos consecutivos, por lo menos veinte (20) nucleótidos consecutivos, o por lo menos treinta (30) nucleótidos consecutivos de secuencia de ADN genómica flanqueante, aunque se entiende que cualquier longitud de nucleótidos consecutivos que abarque una unión de un evento transgénico en el genoma de una planta puede ser una secuencia de unión. El experto en la técnica puede determinar una diversidad de secuencias de unión del evento de maíz ZM_BCS216090 usando SEQ ID NO: 10. Ejemplos de secuencias de unión del evento ZM_BCS216090 se proporcionan como SEQ ID NOs: 1–8. La FIG. 1 ilustra la disposición física y las ubicaciones de las secuencias de unión, dispuestas de 5' a 3' (izquierda a derecha), en relación con SEQ ID NO: 10. Las secuencias de unión del evento ZM_BCS216090 pueden estar presentes como parte del genoma de una planta de maíz, parte de una planta, semilla de planta o tejido o célula vegetal que contiene el evento ZM_BCS216090, una molécula de ADN que contiene la totalidad o parte del evento ZM_BCS216090, o un microorganismo que contiene el evento ZM_BCS216090. La identificación de una o más de las secuencias de unión en una molécula de ADN o muestra de una planta, parte de planta, semilla de planta o tejido o célula de planta indica que la planta, parte de planta, semilla de planta o tejido o célula de planta contiene o comprende el evento ZM_BCS216090, o la molécula de ADN contiene o comprende el evento ZM_BCS216090 o se obtuvo de una planta de maíz, parte de una planta, semilla de planta o tejido o célula vegetal que contiene o comprende el

evento ZM_BCS216090, y es diagnóstico en cada caso de la presencia del evento ZM_BCS216090.

[75] Una secuencia de unión para el evento ZM_BCS216090 puede ser representada por una secuencia 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, y SEQ ID NO: 10. Por ejemplo, las secuencias de unión pueden ser o comprender SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 4, o SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6. Las secuencias de unión pueden comprender una primera o 5' secuencia de unión y una segunda o 3' secuencia de unión, donde la primera o 5' secuencia de unión es o comprende una o más de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, y/o SEQ ID NO: 5, y donde la segunda o 3' secuencia de unión es o comprende una o más de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, y/o SEQ ID NO: 6. Alternativa o adicionalmente, una primera o 5' secuencia de unión puede ser o comprender SEQ ID NO: 7, y/o una segunda o 3' secuencia de unión puede ser o comprender SEQ ID NO: 8.

[76] Las secuencias de unión descritas en el presente documento son diagnóstico de la presencia de la totalidad o parte del evento ZM_BCS216090 y/o una molécula de ADN que comprende la totalidad o parte del transgén codificante de miARN, construcción o casete de expresión descritos en el presente documento. Por lo tanto, la identificación o detección, directa o indirectamente, de una o más 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, y SEQ ID NO: 10 en una muestra o molécula de ADN derivada de una planta de maíz, parte de planta de maíz, semilla de maíz, o tejido o célula de maíz, o un producto básico de una planta de maíz, parte de planta de maíz, semilla de maíz, o tejido o célula de maíz, es diagnóstico de que la planta de maíz, parte de planta de maíz, semilla de maíz, o tejido o célula de maíz, o un producto básico de una planta de maíz, parte de planta de maíz, semilla de maíz, o tejido o célula de maíz tiene o comprende la totalidad o parte del evento de maíz ZM_BCS216090. La identificación o detección, directa o indirectamente, de una secuencia de unión 5' y una secuencia de unión 3' (cada una, proporcionada o descrita en el presente documento) en una muestra o molécula de ADN derivada de una planta de maíz, parte de planta de maíz, semilla de maíz, o tejido o célula de maíz, o un producto básico de una planta de maíz, parte de planta de maíz, semilla de maíz, o tejido o célula de maíz, es diagnóstico de que la

planta de maíz, parte de planta de maíz, semilla de maíz, o tejido o célula de maíz, o un producto básico de una planta de maíz, parte de planta de maíz, semilla de maíz, o tejido o célula de maíz tiene o comprende el evento de maíz ZM_BCS216090. La presente divulgación, por lo tanto, proporciona una molécula de ADN que contiene por lo menos una de las secuencias de nucleótidos proporcionadas como 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 ZM_BCS216090 que sea suficiente para incluir por lo menos una de las secuencias proporcionadas como 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 encuentra dentro del alcance de la presente divulgación. Además, cualquier molécula o secuencia de ADN o polinucleótido que comprenda una secuencia complementaria a cualquiera de las secuencias descriptas en el presente documento también se encuentra dentro del alcance de la presente divulgación.

[77] La descripción proporciona moléculas de ADN, polinucleótidos o ácidos nucleicos, que pueden ser de monocatenarias o bicatenarias, que pueden usarse como cebadores o sondas para detectar la presencia de ADN que comprende la totalidad o parte del evento ZM_BCS216090 en una muestra derivada de una planta de maíz, parte de planta de maíz, semilla de maíz o tejido o célula de maíz, o un producto básico de una planta de maíz, parte de planta de maíz, semilla de maíz o tejido o célula de maíz. Dichos cebadores o sondas son específicos para una secuencia de ácido nucleico, polinucleótido o ADN objetivo y, como tales, son útiles para la identificación de secuencia de ácido nucleico, polinucleótido o ADN del evento de maíz ZM_BCS216090, mediante los métodos descritos en este documento. Un cebador o una sonda puede hibridar con una secuencia de ácido nucleico, polinucleótido o ADN objetivo para permitir la detección o amplificación específica de una molécula o secuencia de ácido nucleico, polinucleótido o ADN que comprende, o está unida covalentemente y asociada con la secuencia de ácido nucleico, polinucleótido o ADN objetivo. De acuerdo con las presentes formas de realización, los cebadores y/o las sondas pueden seleccionarse para identificar y distinguir la detección de un evento transgénico particular y no solo la presencia de un transgén en el genoma de una planta. La molécula o secuencia de ácido nucleico, polinucleótido o ADN objetivo puede comprender la totalidad o parte del evento de maíz ZM_BCS216090, una secuencia de unión y/o ADN genómico

flanqueante. Las sondas y los cebadores de acuerdo con la presente descripción pueden tener (i) completa o 100 % de complementariedad de secuencia (es decir, 100 % de complementariedad) con una secuencia de ADN objetivo o (ii) incompleta complementariedad de secuencia con una secuencia de ADN objetivo, tal como por lo menos 60 % de complementariedad, por lo menos 65 % de complementariedad, por lo menos 70 % de complementariedad, por lo menos 75 % de complementariedad, por lo menos 80 % de complementariedad, por lo menos 85 % de complementariedad, por lo menos 90 % de complementariedad, por lo menos 95 % de complementariedad, o por lo menos 99 % de complementariedad con la secuencia de ADN objetivo, siempre que la sonda o el cebador tengan suficiente complementariedad con la secuencia de ADN objetivo para hibridarse con la secuencia de ADN objetivo en condiciones de hibridación rigurosas que sean adecuadas y necesarias para el uso de la sonda o el cebador en el ensayo, la reacción o el método de amplificación o detección pertinente. Como se entiende en la técnica, el porcentaje de complementariedad de un cebador o una sonda puede ser menor si la longitud del cebador o la sonda es mayor, y depende de la rigurosidad y el uso.

[78] Una "sonda" es una molécula de ácido nucleico que es complementaria a una hebra de ácido nucleico objetivo y es útil en métodos de hibridación. Una sonda puede estar unida a una etiqueta detectable convencional o a una molécula reportera, por ejemplo, un isótopo radiactivo, un fluoróforo, un ligando, un agente quimioluminiscente o una enzima. Dicha sonda es complementaria a una hebra de un ácido nucleico objetivo y, en el caso de la presente descripción, a una hebra de ADN del evento ZM_BCS216090, o bien de una planta que contiene el evento ZM_BCS216090 o de una muestra que incluye ADN del evento ZM_BCS216090. Las sondas de acuerdo con la presente invención incluyen no solo ácidos desoxirribonucleicos o ribonucleicos, sino también poliamidas y otros materiales de sonda que se unen específicamente a una secuencia de ADN objetivo y pueden usarse para detectar la presencia de esa secuencia de ADN objetivo. Una secuencia de ADN ejemplar útil como una sonda para detectar el evento de maíz ZM_BCS216090 se proporciona como SEQ ID NO: 13 (PB50583). También se puede usar una "sonda" para unir un ADN patrón en una muestra que comprende la totalidad o parte de una secuencia de ADN o de nucleótidos del evento de maíz ZM_BCS216090, para purificar el ADN patrón del resto de la muestra usando métodos o técnicas de purificación conocidos en la técnica, por ejemplo, si la sonda está unida o puede estar unida a un sustrato o una partícula o perla que

puede purificarse o separarse. Dicho ADN patrón puede comprender la totalidad o parte de una secuencia de ADN o nucleótidos del evento de maíz ZM_BCS216090, o una porción o un fragmento de la misma, tal como 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 y SEQ ID NO: 10, o un complemento de las mismas.

[79] Un "cebador" es una molécula de ADN o un oligonucleótido diseñado para el uso en métodos de anelación o hibridación específicos que involucran una reacción de amplificación *in vitro*. Se puede usar un par de cebadores con ADN patrón (tal como una muestra de ADN genómico de maíz) en una reacción de amplificación térmica (tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, conforme a sus siglas en inglés)) o cualquier otro método de amplificación adecuado conocido en la técnica para producir un producto de amplificación o amplicón, donde el amplicón producido a partir de dicha reacción tendrá una secuencia de ADN correspondiente a la secuencia del ADN patrón situado entre los dos sitios en los que los cebadores se hibridaron con el ADN patrón. Como se entiende en la técnica, un "producto de amplificación" o "amplicón" es una molécula o segmento de ADN producidos por una reacción de amplificación. La amplificación o amplificar se refiere a hacer múltiples copias de una molécula o segmento de ADN objetivo a partir de un ADN patrón. También se puede usar un único "cebador" para iniciar una reacción de secuenciación a fin de determinar una secuencia de ADN de un ADN patrón de acuerdo con los métodos de secuenciación conocidos en la técnica. Dicha reacción de secuenciación puede usarse para determinar la presencia o ausencia de una molécula de ADN o secuencia de nucleótidos, o una porción o un fragmento de la misma, del evento de maíz ZM_BCS216090. Dicho ADN patrón puede comprender la totalidad o parte de una secuencia de ADN o de nucleótidos del evento de maíz ZM_BCS216090, o una porción o un fragmento de la misma, tal como 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, y SEQ ID NO: 10, o un complemento de las mismas.

[80] Las reacciones, los métodos y las técnicas de amplificación de ADN son conocidos por los expertos en la técnica. La amplificación de ADN se puede lograr mediante cualquiera de los diversos métodos de amplificación de ácidos nucleicos conocidos en la técnica, incluidos los

métodos de amplificación térmica e isotérmica, incluida la reacción en cadena de la polimerasa o PCR. Los métodos de amplificación son conocidos en la técnica y se describen, entre otros, en las Patentes Estadounidenses Números 4.683.195 y 4.683.202 y en *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, ed. Innis *et al.*, Academic Press, San Diego, 1990. Se han desarrollado métodos de amplificación por PCR para amplificar hasta 22 kb (kilobase) de ADN genómico y hasta 42 kb de ADN de bacteriófago (Cheng *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 5695–5699, 1994). Estos métodos, así como otros métodos conocidos en la técnica de amplificación de ADN, pueden usarse en la puesta en práctica de la presente invención. Los ejemplos de métodos de amplificación de ADN incluyen PCR, amplificación de la polimerasa de recombinasa (RPA, por sus siglas en inglés) (ver, por ejemplo, la Patente de EE. UU. Nro. 7.485.428), amplificación por desplazamiento de hebra (SDA, por sus siglas en inglés) (ver, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. Nros. 5.455.166 y 5.470.723), amplificación mediada por transcripción (TMA, por sus siglas en inglés) (ver, por ejemplo, Guatelli *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:1874–1878, 1990), amplificación circular en rodamiento (RCA, por sus siglas en inglés) (ver, por ejemplo, Fire and Xu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:4641–4645, 1995; Lui, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 118:1587–1594, 1996; Lizardi, *et al.*, *Nature Genetics* 19:225–232, 1998; Patentes Estadounidenses Nros. 5.714.320 y 6.235.502), amplificación dependiente de la helicasa (HDA, por sus siglas en inglés) (ver, por ejemplo, Vincent *et al.*, *EMBO Reports* 5 (8): 795–800, 2004; Patente Estadounidense Nro. 7.282.328), y amplificación de desplazamiento múltiple (MDA, por sus siglas en inglés) (ver, por ejemplo, Dean *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 5261–5266, 2002). Una secuencia del inserto de ADN heterólogo y/o secuencia de ADN genómico flanqueante del evento de maíz ZM_BCS216090 puede verificarse o evaluarse amplificando dichas moléculas de ADN de semillas de maíz que contienen ADN del evento ZM_BCS216090 o plantas de maíz cultivadas a partir de semillas de maíz que contienen ADN del evento ZM_BCS216090, utilizando cebadores derivados de las secuencias proporcionadas en este documento, seguido de secuenciación de ADN estándar del amplicón de PCR o un fragmento de ADN clonado del mismo.

[81] De acuerdo con las presentes formas de realización, la secuencia de un amplicón de una reacción de amplificación puede comprender una o más 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, o un fragmento de las mismas. De acuerdo con las presentes formas

de realización, la secuencia de un amplicón comprende por lo menos una secuencia de unión o dos secuencias de unión, tal como una secuencia de unión 5' y/o una secuencia de unión 3' para el evento de maíz ZM_BCS216090.

[82] Típicamente, un cebador está diseñado para hibridar de una manera específica de secuencia con una hebra de ADN objetivo complementaria para formar un híbrido entre el cebador y la hebra de ADN objetivo, y el cebador hibridado o unido a la hebra de ADN objetivo complementaria es un punto de reconocimiento para que una polimerasa comience la extensión del cebador (es decir, la polimerización de nucleótidos adicionales en una molécula de nucleótido en alargamiento) utilizando como patrón la hebra de ADN diana. Los pares de cebadores se refieren al uso de dos cebadores que se unen a hebras opuestas de un segmento de ADN o polinucleótido de doble hebra con el fin de amplificar el segmento de ADN o polinucleótido entre las posiciones objetivo para la unión de los cebadores individuales del par de cebadores al ADN patrón original o un amplicón de la reacción de amplificación, típicamente, en una reacción de amplificación de ciclos térmicos u otro método convencional de amplificación de ADN. Los pares de cebadores generalmente se diseñan para hibridar con diferentes posiciones objetivo cercanas de una molécula de ADN patrón en hebras opuestas de la molécula de ADN patrón, de modo que la región o secuencia intermedia entre los dos cebadores se pueda amplificar específicamente para el uso o la detección a través de múltiples rondas de amplificación.

[83] A fin de detectar la presencia o ausencia del evento de maíz ZM_BCS216090, las posiciones objetivo y/o la región o secuencia intermedia de una molécula de ADN patrón pueden comprender al menos una secuencia de unión y/o al menos una porción del inserto del evento de maíz ZM_BCS216090. Para detectar la ausencia del evento de maíz ZM_BCS216090, las posiciones objetivo y/o la región o secuencia intermedia de una molécula de ADN patrón pueden comprender ADN genómico de maíz que no incluye una secuencia de unión o cualquier porción del inserto del evento de maíz ZM_BCS216090. Por lo tanto, la presencia o ausencia de un amplicón con un par de cebadores puede ser un diagnóstico de la presencia o ausencia, respectivamente, del evento de maíz ZM_BCS216090 en una molécula o muestra de ADN, o viceversa. Esto también puede ser posible con más de un par de cebadores. Por ejemplo, un primer par de cebadores puede producir un primer amplicón si el evento de maíz ZM_BCS216090 está presente, y un segundo par de cebadores puede producir un segundo amplicón si el evento de maíz

ZM_BCS216090 está ausente o no está presente. Alternativamente, el tamaño de un amplicón producido en una reacción de amplificación también puede ser un diagnóstico de la presencia o ausencia del evento de maíz ZM_BCS216090 en una molécula o muestra de ADN –por ejemplo, un par de cebadores puede producir un primer amplicón de un primer tamaño si el evento de maíz ZM_BCS216090 está presente, o un segundo amplicón de un segundo tamaño, si el evento de maíz ZM_BCS216090 está ausente y no presente; o un primer par de cebadores puede producir un primer amplicón de un primer tamaño si el evento de maíz ZM_BCS216090 está presente, y un segundo par de cebadores puede producir un segundo amplicón de un segundo tamaño si el evento de maíz ZM_BCS216090 está ausente o no está presente. De acuerdo con algunas de estas formas de realización, se pueden usar al menos dos pares de cebadores en los que al menos uno de los pares de cebadores se usa como control interno y no está asociado con el evento de maíz ZM_BCS216090.

[84] De acuerdo con las presentes formas de realización, un par de cebadores para detectar la presencia de la totalidad o parte del evento de maíz ZM_BCS216090 en una molécula o muestra de ADN comprende un primer cebador y un segundo cebador, donde el primer cebador es complementario a una secuencia de ADN genómico flanqueante 5', y el segundo cebador es complementario a una secuencia dentro del inserto transgénico; o donde el primer cebador es complementario a una secuencia de ADN genómico flanqueante en 5', y el segundo cebador es complementario a una secuencia de ADN genómico flanqueante 3'; o donde el primer cebador es complementario a una secuencia de ADN genómico flanqueante 3', y el segundo cebador es complementario a una secuencia de ADN genómico flanqueante 5'; o donde el primer cebador es complementario a una secuencia dentro del inserto transgénico y el segundo cebador es complementario a una secuencia de ADN genómico flanqueante 3'; o donde el primer cebador es complementario a una secuencia dentro del inserto transgénico, y el segundo cebador es complementario a una secuencia de ADN genómico flanqueante 5'; o donde el primer cebador es complementario a una secuencia de ADN genómico flanqueante 3', y el segundo cebador es complementario a una secuencia dentro del inserto transgénico. Cada referencia en este párrafo a un cebador complementario a una secuencia de ADN genómico flanqueante 5', una secuencia de ADN genómico flanqueante 3' o una secuencia dentro del inserto transgénico del evento de maíz ZM_BCS216090 también tiene la intención de incluir potencialmente un cebador complementario

al complemento inverso o la hebra opuesta de la respectiva secuencia de ADN genómico flanqueante 5', secuencia de ADN genómico flanqueante 3', o secuencia dentro del inserto transgénico del evento de maíz ZM_BCS216090.

[85] Se proporcionan ejemplos de moléculas de ADN útiles como cebadores como SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 15. El par de cebadores SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12 puede ser útil como una primera molécula de ADN o cebador y una segunda molécula de ADN o cebador, donde cada cebador tiene suficiente longitud de nucleótidos consecutivos de SEQ ID NO: 10 o una secuencia complementaria a SEQ ID NO: 10 para funcionar como cebadores de ADN que, cuando se usan juntos en una reacción de amplificación con ADN patrón derivado del evento de maíz ZM_BCS216090, hibridan con hebras opuestas del ADN patrón y producen un amplicón diagnóstico del ADN del evento de maíz ZM_BCS216090 en una muestra. El par de cebadores SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 15 son útiles como una primera molécula de ADN o cebador y una segunda molécula de ADN o cebador, donde cada cebador tiene una longitud suficiente de nucleótidos consecutivos de un locus dentro del genoma del maíz para funcionar como cebadores de ADN que, cuando se usan juntos en una reacción de amplificación térmica con ADN patrón derivado del evento de maíz ZM_BCS216090, producen un amplicón que sirve como control interno tanto para el diagnóstico del evento de maíz ZM_BCS216090 como para la cigosidad del ADN del evento de maíz ZM_BCS216090 en una muestra.

[86] Las sondas de ADN y los cebadores de ADN tienen generalmente once (11) polinucleótidos o más de longitud y, a menudo, dieciocho (18) polinucleótidos o más, veintiún (21) polinucleótidos o más, veinticuatro (24) polinucleótidos o más, o treinta (30) polinucleótidos o más de longitud. Dichas sondas y cebadores se seleccionan de modo de tener suficiente longitud y complementariedad de secuencia con una secuencia objetivo para hibridar específicamente con la secuencia objetivo en condiciones de hibridación de alta rigurosidad. Preferentemente, las sondas y los cebadores de acuerdo con la presente descripción tienen una completa complementariedad de secuencia o identidad con la secuencia objetivo, aunque las sondas y los cebadores que difieren de la secuencia objetivo en términos de identidad o complementariedad pero conservan la capacidad de hibridarse con la secuencia objetivo pueden diseñarse mediante métodos convencionales.

[87] Las sondas de ácido nucleico y los cebadores de la presente descripción se hibridan en condiciones rigurosas con una molécula de ADN objetivo. Puede usarse cualquier método convencional de hibridación o amplificación de ácidos nucleicos para detectar o identificar la presencia de un ADN objetivo de una planta transgénica en una muestra. Las moléculas de ácido polinucleico o ADN, también denominadas segmentos de ADN o ácido nucleico, o fragmentos de los mismos, son capaces de hibridarse específicamente con otras moléculas de ácido nucleico o ADN complementarias en determinadas circunstancias.

[88] Como se usa en el presente documento, se dice que dos moléculas de ácido polinucleico son capaces de hibridarse específicamente entre sí, si las dos moléculas son capaces de formar una estructura de ácido nucleico bicatenaria antiparalela. Se dice que una molécula de ácido nucleico es el "complemento" de otra molécula de ácido nucleico si estas presentan una complementariedad completa. Como se usa en el presente documento, se dice que las moléculas de ácido nucleico exhiben "complementariedad completa" y son "completamente complementarias" cuando cada nucleótido de una de las moléculas es complementario a un nucleótido de la otra, en el orden de sus respectivas secuencias. Se dice que dos moléculas son "mínimamente complementarias" si pueden hibridar entre sí con suficiente estabilidad para permitirles permanecer aneladas entre sí al menos en condiciones convencionales de "baja rigurosidad". De manera similar, se dice que las moléculas son "complementarias" si pueden hibridar entre sí con suficiente estabilidad para permitirles permanecer aneladas entre sí en condiciones convencionales de "alta rigurosidad". Las condiciones de rigurosidad convencionales están descritas por Sambrook *et al.*, 1989, y por Haymes *et al.*, en: *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, DC (1985). Por lo tanto, se permiten desviaciones de la complementariedad completa, siempre que tales desviaciones no excluyan por completo la capacidad de las moléculas para formar una estructura bicatenaria. Para que una molécula de ácido nucleico sirva como cebador o sonda, solo necesita ser suficientemente complementaria en términos de secuencia para poder formar una estructura bicatenaria estable bajo las concentraciones particulares de solvente y sal y otras condiciones empleadas.

[89] Como se usa en el presente documento, una secuencia sustancialmente homóloga en relación con una secuencia de ácido nucleico de referencia es una secuencia de ácido nucleico que

se hibridará específicamente con el complemento de la secuencia de ácido nucleico de referencia con la que se compara en condiciones de alta rigurosidad.

[90] Las condiciones de rigurosidad apropiadas que promueven la hibridación del ADN, por ejemplo, 6,0 x cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a alrededor de 45°C, seguido de un lavado de 2,0 x SSC a 50°C, son conocidas por los expertos en la técnica, o se puede 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 se puede seleccionar desde una rigurosidad baja de alrededor de 2,0 x SSC a 50°C hasta una rigurosidad alta de alrededor de 0,2 x SSC a 50°C. Además, la temperatura en la etapa de lavado se puede aumentar desde condiciones de baja rigurosidad a temperatura ambiente, alrededor de 22°C, hasta condiciones de alta rigurosidad a alrededor de 65°C. Tanto la temperatura como la sal pueden variarse, o la temperatura o la concentración de sal pueden mantenerse constantes mientras se cambia la otra variable. En algunas formas de realización, un ácido polinucleico de la presente descripción, tal como un cebador o una sonda, se hibridará específicamente con una o más de las secuencias de moléculas de ácido nucleico establecidas 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/o SEQ ID NO: 10, o sus complementos o fragmentos, en condiciones moderadamente rigurosas, por ejemplo a alrededor de 2,0 x SSC y alrededor de 65°C. En algunas formas de realización, un ácido nucleico de la presente descripción, tal como un cebador o una sonda, se hibridará específicamente con una o más de las secuencias de moléculas de ácido nucleico establecidas 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/o SEQ ID NO: 10, o sus complementos o fragmentos, en condiciones de alta rigurosidad. En un aspecto de la presente invención, una molécula de ácido nucleico preferida de la presente divulgación tiene o comprende la secuencia de ácido nucleico establecida en una o más 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, o SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, y/o SEQ ID NO: 10, o sus complementos o fragmentos. La hibridación de una molécula de ácido nucleico, tal como un cebador o una sonda, con una molécula de ADN objetivo puede detectarse mediante varios métodos conocidos por los expertos en la técnica, que pueden incluir, entre otros, etiquetas fluorescentes, etiquetas radiactivas, etiquetas a base de anticuerpos y etiquetas quimioluminiscentes.

[91] Con respecto a la amplificación de una secuencia de ácido nucleico objetivo (p. ej., mediante PCR) utilizando un par de cebadores de amplificación particular, las "condiciones rigurosas" son condiciones que permiten que el par de cebadores se hibride solo con la secuencia de ácido nucleico objetivo a la que un cebador que tiene la secuencia correspondiente (o su complemento) se uniría y preferentemente para producir un producto de amplificación único, el amplicón, en una reacción de amplificación térmica de ADN.

[92] El término "específico para (una secuencia objetivo)" indica que una sonda o un cebador hibrida en condiciones de hibridación rigurosas solo con la secuencia objetivo en una muestra que comprende la secuencia objetivo

[93] Como se usa en el presente documento, "ADN amplificado" o "amplicón" se refiere al producto de ácido nucleico o ADN de una reacción o de un método de amplificación de ácido polinucleico o ADN como se describe aún más en el presente documento, que se dirige a una molécula de ADN o ácido polinucleico objetivo que es parte de una molécula de ADN o ácido polinucleico patrón. Por ejemplo, para determinar si una planta de maíz, etc., resultante de un cruce sexual de dos progenitores contiene ADN genómico de planta transgénica de una planta de maíz que comprende el evento ZM_BCS216090 de la presente descripción, el ADN puede extraerse de una muestra de tejido de planta de maíz y someterse a una reacción o un método de amplificación que utiliza un par de cebadores que es específico para una secuencia objetivo que está asociada de forma única o es parte del evento ZM_BCS216090, tal como, por ejemplo, un primer cebador derivado de una secuencia de ADN genómico en la región que flanquea el ADN heterólogo insertado del evento ZM_BCS216090 que es alargado por la polimerasa de 5' a 3' en la dirección del ADN insertado, y un segundo cebador derivado de la molécula de ADN insertada heteróloga que es alargada por la polimerasa de 5' a 3' en la dirección del ADN genómico flanqueante del que se deriva el primer cebador. El amplicón puede variar en longitud desde la longitud combinada del par de cebadores más un par de bases de nucleótidos, o más alrededor de cincuenta pares de bases de nucleótidos, o más alrededor de doscientos cincuenta pares de bases de nucleótidos, o más alrededor de cuatrocientos cincuenta pares de bases de nucleótidos o más, de acuerdo con la longitud de la secuencia de ácido polinucleico, polinucleótido o ADN intermedia entre las dos secuencias objetivo de cebador en la molécula patrón de ácido polinucleico, polinucleótido o ADN. Alternativamente, se puede derivar un par de cebadores de la secuencia genómica en ambos lados

del ADN heterólogo insertado para producir un amplicón que incluye la secuencia de polinucleótido de inserción entera (p. ej., un cebador delantero aislado de la porción genómica en el extremo 5' de SEQ ID NO: 10 y un cebador inverso aislado de la porción genómica en el extremo 3' de SEQ ID NO: 10 que amplifica una molécula de ADN que comprende la secuencia de ADN insertada (SEQ ID NO: 9) identificada aquí en el genoma del evento ZM_BCS216090). Un miembro de un par de cebadores derivado de la secuencia genómica de la planta adyacente al ADN transgénico insertado está ubicado a una distancia de la secuencia de ADN insertada, donde esta distancia puede variar desde un par de bases de nucleótidos hasta alrededor de veinte mil pares de bases de nucleótidos. El uso del término "amplicón" excluye específicamente los dímeros de cebadores que pueden formarse en una reacción de amplificación de ADN.

[94] A efectos prácticos, se deben diseñar cebadores que produzcan amplicones de un rango de tamaño limitado, por ejemplo, entre 100 y 1000 bases. Los amplicones de tamaño más pequeño (longitud de polinucleótido más corta) en general se producen de manera más confiable en las reacciones de amplificación térmica, permiten tiempos de ciclo más cortos y se pueden separar y visualizar fácilmente en geles de agarosa o adaptarse para el uso en ensayos de criterios de valoración tipo TaqMan®. Los amplicones más pequeños pueden producirse y detectarse mediante métodos conocidos en la técnica de detección de amplicones de ADN. Además, los amplicones producidos utilizando los pares de cebadores pueden clonarse en vectores, propagarse, aislarse y secuenciarse, o pueden secuenciarse directamente con métodos bien establecidos en la técnica. Cualquier par de cebadores de cebadores delanteros e inversos, que pueden ser idénticos o complementarios a parte de SEQ ID NO: 10, tal como una combinación apropiada de SEQ ID NOs: 11, 12, 14 y 15, que es útil en un método de amplificación de ADN para producir un amplicón diagnóstico del evento ZM_BCS216090 o su progenie es un aspecto de la divulgación. Cualquier molécula de cebador de polinucleótido de ADN aislada única que comprenda al menos 15 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 10, o su complemento que sea útil en un método de amplificación de ADN para producir un amplicón diagnóstico del evento ZM_BCS216090 o su progenie es un aspecto de la descripción. Cualquier molécula de cebador de polinucleótido de ADN aislada única que comprenda al menos 15 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 12, o su complemento que sea útil en un método de amplificación de ADN para producir un amplicón diagnóstico de plantas que comprenden el evento ZM_BCS216090 o su progenie es un aspecto de

la divulgación. Cualquier molécula de cebador de polinucleótido de ADN aislada única que comprenda al menos 15 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 9, o su complemento que sea útil en un método de amplificación de ADN para producir un amplicón diagnóstico del evento ZM_BCS216090 o su progenie es un aspecto de la divulgación.

[95] Un amplicón de diagnóstico producido mediante los métodos descritos en el presente documento puede detectarse mediante una pluralidad de técnicas conocidas en la técnica, tales como secuenciación, mapeo de restricción, análisis Northern, análisis Southern, o cualquier otro enfoque o técnica adecuados sobre la base de hibridación, transferencia, polimerización y/o amplificación de ADN o polinucleótido. Un método es el análisis de bits genéticos (Nikiforov et al., *Nucleic Acid Res.* 22: 4167–4175, 1994), en el que se diseña un oligonucleótido de ADN que se superpone tanto a la secuencia de ADN genómico flanqueante adyacente como a la secuencia de ADN insertada, es decir, una secuencia de unión. El oligonucleótido se inmoviliza en pocillos de una placa de microtitulación. Después de la PCR de la región de interés (usando, por ejemplo, un cebador en la secuencia insertada, y uno en la secuencia genómica flanqueante adyacente), un producto de PCR monocatenario se puede hibridar con el oligonucleótido inmovilizado y servir como un patrón para una reacción de extensión de una sola base usando una polimerasa de ADN y trifosfatos de didesoxinucleótido marcados (ddNTP) específicos para la siguiente base esperada. La lectura puede ser fluorescente o sobre la base de ELISA. Una señal indica la presencia del transgén/secuencia de unión genómica debido a una amplificación, hibridación y extensión de una sola base exitosas.

[96] Otro método es la técnica de pirosecuenciación descrita por Winge (*Innov. Pharma. Tech.* 00:18–24, 2000). En este método, se diseña un oligonucleótido que se superpone al ADN genómico adyacente y la unión de ADN de inserción. El oligonucleótido se hibrida con el producto de PCR monocatenario de la región de interés (un cebador en la secuencia insertada, y otro en la secuencia genómica flanqueante), y se incuba en presencia de una ADN polimerasa, ATP, sulfurilasa, luciferasa, apirasa, adenosina 5' fosfosulfato y luciferina. Los DNTP se agregan individualmente, y la incorporación produce una señal luminosa, que se mide. Una señal luminosa indica la presencia del transgén/secuencia genómica debido a la exitosa amplificación, hibridación y extensión de base única o múltiple.

[97] La polarización de fluorescencia según lo descrito por Chen et al. (*Genome Res.* 9: 492–498, 1999) es un método que puede usarse para detectar el amplicón de la presente invención. Usando este método, se diseña un oligonucleótido que se superpone con la unión de ADN insertado y flanqueante genómico. El oligonucleótido se hibrida con el producto PCR monocatenario de la región de interés (un cebador en el ADN insertado, y otro en la secuencia de ADN genómico flanqueante) y se incuba en presencia de una ADN polimerasa y un ddNTP marcado con fluorescencia. La extensión de base única da como resultado la incorporación del ddNTP. La incorporación se puede medir como un cambio en la polarización utilizando un fluorímetro. Un cambio en la polarización indica la presencia del transgén/secuencia genómica debido a la exitosa amplificación, hibridación y extensión de una sola base.

[98] La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real es la capacidad de monitorear el progreso de la PCR a medida que ocurre (es decir, en tiempo real). Los datos se recopilan a lo largo del proceso de PCR, en lugar de al final de la PCR. En la PCR en tiempo real, las reacciones se caracterizan por el punto de tiempo durante el ciclo cuando se detecta por primera vez la amplificación de un objetivo, en lugar de la cantidad de objetivo acumulada después de un número fijo de ciclos. En un ensayo de PCR en tiempo real, se detecta una reacción positiva mediante la acumulación de una señal fluorescente. Cuanto mayor sea el número de copias iniciales del objetivo de ácido nucleico, antes se observará un aumento significativo de la fluorescencia. El umbral de ciclo (valor Ct) se define como el número de ciclos necesarios para que la señal fluorescente cruce el umbral (es decir, exceda el nivel de fondo). Los niveles de Ct son inversamente proporcionales a la cantidad de ácido nucleico objetivo en la muestra (es decir, cuanto menor sea el valor de Ct, mayor será la cantidad de ácido nucleico objetivo en la muestra).

[99] Taqman® (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) se describe como un método para detectar y cuantificar la presencia de una secuencia de ADN mediante PCR en tiempo real y se comprende completamente en las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Brevemente, se diseña una sonda de oligonucleótidos FRET que se superpone con la unión de ADN de inserción flanqueante genómica. La sonda FRET y los cebadores de PCR (un cebador en la secuencia de ADN de inserción y otro en la secuencia genómica flanqueante) se ciclan en presencia de una polimerasa termoestable y dNTP. La hibridación de la sonda FRET da como resultado la escisión y la liberación del resto fluorescente para alejarse del resto de apagado en la sonda FRET. Una

señal fluorescente indica la presencia del transgén/secuencia genómica debido a una amplificación e hibridación satisfactorias.

[100] Se han descrito balizas moleculares para el uso en la detección de secuencias como se describe en Tyangi et al. (*Nature Biotech.* 14: 303–308, 1996). Brevemente, se diseña una sonda de oligonucleótidos FRET que se superpone a la unión de ADN de inserción flanqueante genómico. La estructura única de la sonda FRET hace que contenga una estructura secundaria que mantiene los restos fluorescente y de apagado muy cerca. La sonda FRET y los cebadores de PCR (un cebador en la secuencia de ADN de inserción, y otro, en la secuencia genómica flanqueante) se ciclan en presencia de una polimerasa termoestable y dNTP. Luego de una amplificación por PCR exitosa, la hibridación de la sonda FRET con la secuencia objetivo produce la eliminación de la estructura secundaria de la sonda y la separación espacial de los restos fluorescente y de apagado. Se produce una señal fluorescente. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia de inserción de transgén/flanqueante debido a una amplificación e hibridación exitosas.

[101] Se pueden utilizar otros métodos de detección conocidos en la técnica. Por ejemplo, la microfluídica (véase, por ejemplo, la Publicación de Patente de EE. UU. Nro. 2006/068398; la Patente de EE. UU. Nro. 6.544.734) proporciona métodos y dispositivos que pueden usarse para separar y amplificar muestras o moléculas de ADN. Los tintes ópticos se pueden usar para detectar y medir moléculas de ADN específicas (ver, por ejemplo, WO/05017181). Entonces pueden detectarse dispositivos de nanotubos (ver, por ejemplo, WO/06024023) que comprenden un sensor electrónico para la detección de moléculas de ADN o nanoesferas que se unen a moléculas de ADN específicas.

[102] Los equipos de detección de ADN que se sustentan en métodos de amplificación de ADN contienen moléculas cebadoras de ADN que hibridan específicamente con un ADN objetivo y amplifican un amplicón de diagnóstico en las condiciones de reacción apropiadas. El equipo puede proporcionar un método de detección sobre la base de gel de agarosa o cualquier número de métodos para detectar el amplicón de diagnóstico que se conocen en la técnica. Los equipos de detección de ADN se pueden desarrollar utilizando las composiciones descritas en el presente documento y son útiles para la identificación del ADN del evento ZM_BCS216090 de maíz en una muestra, y se pueden aplicar a métodos para cultivar plantas de maíz que contienen ADN del evento ZM_BCS216090. Un equipo que contiene cebadores de ADN que son homólogos o

complementarios a cualquier porción de la región genómica de maíz como se establece en SEQ ID NO: 10 y a cualquier porción del ADN transgénico insertado como se establece en SEQ ID NO: 9 es un objeto de la invención. Las moléculas de ADN pueden usarse en métodos de amplificación de ADN (PCR) o como sondas en métodos de hibridación de ácidos polinucleicos, es decir, análisis Southern, análisis Northern, etc. Los equipos de la invención también pueden comprender opcionalmente reactivos o instrucciones para realizar las reacciones de detección o diagnóstico descritas en este documento.

[103] Las sondas y los cebadores que se proporcionan en este documento pueden tener una identidad de secuencia completa con la secuencia objetivo, aunque los cebadores y las sondas que difieren de la secuencia objetivo que conservan la capacidad de hibridarse preferentemente con las secuencias objetivo pueden diseñarse mediante métodos convencionales. Para que una molécula de ácido nucleico sirva como cebador o sonda, solo necesita ser lo suficientemente complementaria en la secuencia para poder formar una estructura de doble hebra estable bajo las concentraciones particulares de solvente y sal empleadas. Cualquier método convencional de hibridación o amplificación de ácidos nucleicos puede usarse para identificar la presencia de ADN transgénico del evento de maíz ZM_BCS216090 en una muestra.

[104] Se puede utilizar cualquier número de métodos bien conocidos por los expertos en la técnica para aislar y manipular una molécula de ADN, o un fragmento de la misma, descritos en el presente documento, incluidos los métodos de aislamiento o amplificación térmica o PCR de ADN. Dicha molécula o fragmento de ADN puede insertarse o colocarse en cualquier vector o plásmido adecuado, o puede combinarse con otros elementos, secuencias o fragmentos utilizando técnicas moleculares o recombinantes.

[105] Por lo tanto, las moléculas de ADN y las secuencias de nucleótidos correspondientes proporcionadas en este documento son útiles, entre otras cosas, para identificar el evento de maíz ZM_BCS216090, detectar la presencia de ADN derivado del evento de maíz transgénico ZM_BCS216090 en una muestra, y monitorear las muestras para determinar la presencia y/o ausencia del evento de maíz ZM_BCS216090 o partes de plantas derivadas de plantas de maíz que comprenden el evento ZM_BCS216090.

[106] La referencia en el presente documento a "maíz" en general pretende incluir plantas de maíz, células de plantas de maíz, tejidos de plantas de maíz, semillas de maíz, partes de plantas de maíz, plantas de progenie de maíz y/o productos básicos de maíz, según el contexto de uso en la presente solicitud, a menos que se disponga lo contrario. La presente divulgación proporciona plantas de maíz, células de plantas de maíz, tejidos de plantas de maíz, semillas de maíz, partes de plantas de maíz (tales como polen, óvulo, seda, espiga, antera, mazorca, tejido de raíz, tejido de tallo, tejido de hoja), plantas de progenie de maíz, y productos básicos de maíz. Estas plantas de maíz, células de plantas de maíz, tejidos de plantas de maíz, semillas de maíz, partes de plantas de maíz, plantas de progenie de maíz y productos básicos de maíz contienen una cantidad detectable de un polinucleótido o molécula o secuencia de ADN que comprende al menos una secuencia de unión y/o secuencia de inserción heteróloga del evento de maíz ZM_BCS216090, tal como una molécula o secuencia de ADN o polinucleótido que tiene o comprende al menos una de las secuencias proporcionadas como 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.

[107] La invención proporciona plantas de maíz, células de plantas de maíz, tejidos de plantas de maíz, semillas de maíz, partes de plantas de maíz (tales como polen, óvulo, seda, espiga, antera, mazorca, tejido de raíz, tejido de tallo, tejido de hoja), plantas de progenie de maíz o productos básicos de maíz que contienen o comprenden ADN de ZM_BCS216090 o se derivan de una planta de maíz transgénica, una célula de planta de maíz, un tejido de planta de maíz, una semilla de maíz, una parte de una planta de maíz, una planta de progenie de maíz o un producto básico de maíz que contiene o comprende ADN del evento ZM_BCS216090. Una muestra representativa de semilla de maíz que contiene ADN del evento ZM_BCS216090 ha sido depositada de acuerdo con el Tratado de Budapest con la Colección Estadounidense de Cultivos Tipo (ATCC®). El depósito de la ATCC ha asignado la Designación de Depósito de Patente PTA-127050 a la semilla que contiene ADN del evento ZM_BCS216090.

[108] La presente descripción proporciona además un microorganismo, tal como una célula bacteriana o fúngica, 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, que puede estar presente en su genoma. Se pretende que un microorganismo incluya cualquier célula u organismo

microscópico, o bien procariota, eucariota o de otro tipo, que contenga ADN dentro de un genoma o cromosoma o una estructura de ADN extracromosómica, tal como un plásmido o un vector, en dicha célula microscópica. Las células o los organismos microscópicos incluyen bacterias (procariotas) y células correspondientes a formas de vida superiores (eucariotas) que están por debajo del alcance visual del ser humano promedio. Un ejemplo de dicho microorganismo es una célula vegetal transgénica. Los microorganismos, tales como una célula vegetal de la presente divulgación, son útiles en muchas aplicaciones industriales, que incluyen, sin limitación: (i) uso como herramienta de investigación para investigación científica o investigación industrial; (ii) el uso en cultivo para producir productos de carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos o proteínas, endógenos o recombinantes, o moléculas pequeñas que puedan usarse para investigaciones científicas posteriores o como productos industriales; y (iii) uso con técnicas modernas de cultivo de tejidos de plantas para producir plantas transgénicas, partes de plantas, órganos de plantas o cultivos de tejidos de plantas que luego pueden usarse para investigación o producción agrícola. La producción y el uso de microorganismos, tales como las células vegetales transgénicas, utiliza técnicas microbiológicas modernas y la intervención humana para producir un microorganismo único creado por el hombre. En este proceso, el ADN recombinante se inserta en el genoma de una célula vegetal para crear una célula vegetal transgénica que es distinta y única de las células vegetales naturales. Esta célula de planta transgénica puede entonces cultivarse de forma muy similar a las células de bacterias y levaduras utilizando técnicas modernas de microbiología, y puede existir en un estado unicelular indiferenciado. La nueva composición genética y fenotipo de la célula vegetal transgénica es un efecto técnico creado por la integración o inserción del ADN heterólogo en el genoma de la célula. Otro aspecto de la presente divulgación es un método de uso de un microorganismo proporcionado en el presente documento. Los métodos de uso de microorganismos de la presente descripción, tales como células vegetales transgénicas, incluyen (i) métodos para producir células transgénicas integrando ADN recombinante en el genoma de la célula y luego usando esta célula para derivar células adicionales que posean el mismo ADN heterólogo; (ii) métodos de cultivo de células que contienen ADN recombinante utilizando técnicas modernas de microbiología; (iii) métodos para producir y purificar productos de carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos o proteínas endógenos o recombinantes a partir de células cultivadas; y (iv) métodos de uso de técnicas modernas de cultivo de tejidos de plantas con células

de plantas transgénicas para producir plantas transgénicas o cultivos de tejidos de plantas transgénicas.

[109] Las plantas de maíz de la presente divulgación pueden transmitir el ADN del evento ZM_BCS216090, incluido el transgén insertado como parte del evento de maíz ZM_BCS216090, a la progenie o descendencia. Dicha progenie puede incluir cualquier planta de maíz, célula vegetal, semilla, gameto y/o parte de planta regenerable que contenga o comprenda el ADN del evento ZM_BCS216090 heredado o derivado de plantas de maíz parentales o ancestrales, al menos una de los cuales comprende una molécula de ADN que tiene o comprende 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. Las plantas de maíz, la progenie y las semillas pueden ser homocigotas o heterocigotas para el evento ZM_BCS216090 y el transgén del evento ZM_BCS216090. La progenie puede cultivarse a partir de semillas producidas por una planta de maíz que comprende o contiene el evento ZM_BCS216090 y/o a partir de semillas producidas por una planta fertilizada con polen de una planta de maíz que comprende o contiene el evento ZM_BCS216090 (es decir, fertilizada con polen que comprende o contiene el evento ZM_BCS216090).

[110] Se proporcionan métodos para producir plantas y semillas de maíz que contienen o comprenden el evento de maíz ZM_BCS216090. Las plantas de maíz se pueden cultivar utilizando cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, las descripciones de los métodos de cultivo que se usan comúnmente se pueden encontrar en W. R. Fehr, en *Breeding Methods for Cultivar Development*, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison, WI (1987). Las plantas de maíz o las plantas de progenie que contienen o comprenden el evento de maíz ZM_BCS216090 pueden autopolinizarse (también conocido como "autofecundación") para generar una línea de reproducción genuina de plantas de maíz, es decir, plantas de maíz homocigotas para el transgén y el evento ZM_BCS216090. La autofecundación puede dar como resultado una progenie conocida como "endogámica" que se puede usar para producir líneas endogámicas de maíz que son genéticamente uniformes.

[111] Alternativamente, las plantas de maíz o las plantas de progenie que contienen o comprenden el evento de maíz ZM_BCS216090 pueden cruzarse o polinizarse de forma cruzada (también conocido como "cruzamiento"), por ejemplo, cultivarse con otra planta que tenga un

germoplasma o genotipo diferente, para producir una semilla o planta varietal o híbrida que puede ser homocigota o heterocigota para el transgén y el evento ZM_BCS216090 según si la otra planta parental también comprende o contiene el transgén y el evento ZM_BCS216090. La otra planta parental puede ser transgénica o no transgénica para el mismo y/o diferente rasgo, transgén o evento. Por lo tanto, una semilla o planta varietal o híbrida de la invención puede ser derivada cruzando sexualmente un primer progenitor que carece del evento de maíz específico y único ZM_BCS216090 con un segundo progenitor que comprende el evento de maíz ZM_BCS216090, lo que da como resultado una planta híbrida o una planta de progenie que contiene o comprende el evento de maíz ZM_BCS216090 específico y único. Cada progenitor puede ser un híbrido o una planta endogámica/varietal, siempre que una planta o semilla progenitora o de progenie del cruce tenga o comprenda al menos una copia del evento de maíz ZM_BCS216090 y/o una molécula de ADN que tenga o comprenda 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.

[112] El cruce sexual de una planta con otra planta, es decir, la polinización cruzada, puede lograrse o facilitarse mediante la intervención humana, por ejemplo: por manos humanas u otros medios mecánicos bajo control humano, computarizado o automatizado, recolectando el polen de una planta y contactando este polen con el estilo o estigma de una segunda planta; por manos humanas y/o acciones humanas u otros medios mecánicos bajo control humano, computarizado o automatizado, eliminando, destruyendo, desvitalizando o cubriendo el estambre o las anteras de una planta (p. ej., mediante intervención manual o mediante la aplicación de un gametocida químico) de modo de evitar la autopolinización natural, y de modo de tener lugar la polinización cruzada para que se produzca la fertilización; mediante la colocación humana de insectos polinizadores en una posición de "polinización dirigida" (por ejemplo, colocando colmenas en huertos o campos, o enjaulando plantas con insectos polinizadores); por apertura humana o remoción de partes de la flor para permitir la colocación o el contacto de polen extraño en el estilo o estigma; mediante la colocación selectiva de plantas (p. ej., la plantar intencional de plantas en proximidad de polinización); y/o mediante la aplicación de productos químicos para precipitar la floración o fomentar la receptividad (del estigma para el polen).

[113] Por lo tanto, se pueden cruzar dos plantas transgénicas diferentes para producir plantas descendientes híbridas, partes de plantas y/o semillas que contengan dos transgenes o eventos segregantes independientemente, donde al menos uno de esos transgenes o eventos comprende o está contenido en el evento de maíz ZM_BCS216090. Por ejemplo, las plantas transgénicas que comprenden el evento de maíz ZM_BCS216090 pueden cruzarse con otras plantas de maíz transgénicas para producir una planta que tiene las características de ambos progenitores transgénicos. También se contemplan el retrocruzamiento con una planta parental y el cruce con una planta no transgénica, al igual que la propagación vegetativa. Las descripciones de otros métodos de mejoramiento que se usan comúnmente para diferentes rasgos y cultivos se conocen en la técnica y 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).

[114] De acuerdo con algunas formas de realización, se puede usar un rasgo o fenotipo de altura de planta reducida para seleccionar una o más plantas de maíz de progenie, partes de plantas o semillas que contienen el evento de maíz ZM_BCS216090. Alternativamente, las plantas, partes de plantas o semillas de la progenie pueden analizarse usando métodos de diagnóstico como se describe en el presente documento para seleccionar plantas, partes de plantas o semillas que contienen o comprendan el evento de maíz ZM_BCS216090.

[115] Las plantas de maíz y las plantas de la progenie que comprenden el evento de maíz ZM_BCS216090 pueden tener un rasgo o fenotipo de baja estatura o semienano y un rasgo o fenotipo de resistencia al acame y/o al quebrado en verde, como se describe, por ejemplo, en la Solicitud PCT Nro. PCT/US201 047405 (Publicación de Solicitud PCT Nro. WO 2018/035354), cuyo contenido completo y descripción se incorporan aquí como referencia. Las plantas de maíz, la progenie, las semillas, los tejidos, las células y las partes de la planta que comprenden el evento de maíz ZM_BCS216090 tal como se establece en el presente documento también pueden contener uno o más rasgos de maíz o eventos transgénicos adicionales, tal como por ejemplo al cruzar una planta de maíz que contiene el evento de maíz ZM_BCS216090 con otra planta de maíz que contiene los rasgos o eventos transgénicos adicionales. Dichos rasgos adicionales o eventos transgénicos pueden incluir, entre otros, aumento de la resistencia a insectos, tolerancia a herbicidas, aumento de la eficiencia en el uso del agua, aumento del rendimiento, aumento de la

resistencia a la sequía, aumento de la calidad de las semillas, mejora de la calidad nutricional, producción de semillas híbridas, o resistencia a enfermedades u hongos. Un rasgo de maíz puede incluir cualquier rasgo transgénico o mutante, o alelos o rasgos editados. Los alelos o rasgos mutantes de un gen pueden crearse mediante cualquier técnica de mutagénesis conocida en la técnica, mientras que los rasgos editados pueden generarse mediante cualquier método de edición del genoma conocido en la técnica. Muchos eventos transgénicos de maíz son conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el Servicio de Inspección de Salud Animal y Vegetal (APHIS) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) proporciona un listado de tales rasgos, que se puede encontrar en su sitio web: www.aphis.usda.gov. Dos o más alelo(s) y/o evento(s) transgénico(s) que comprenden al menos una copia del evento de maíz ZM_BCS216090 se pueden combinar, por lo tanto, en una semilla o planta de progenie, cruzando dos plantas progenitoras, cada una de las cuales comprende uno o más alelo(s) y /o evento(s) transgénico(s), recolectando las semillas de la progenie, y seleccionando las semillas o plantas de la progenie que contienen los dos o más alelo(s) y/o evento(s) transgénico(s). Estos pasos pueden repetirse hasta conseguir la combinación deseada de alelos y/o eventos transgénicos en una planta de progenie. Para la presente solicitud, la planta de progenie comprenderá generalmente el evento de maíz ZM_BCS216090. También se contemplan el retrocruzamiento con una planta parental y el cruce con una planta no transgénica, así como la propagación vegetativa.

[116] Se proporciona una parte de la planta que comprende el evento ZM_BCS216090 y/o que se deriva de plantas de maíz que comprenden el evento ZM_BCS216090. Como se usa aquí, una "parte de planta" se refiere a cualquier parte de una planta que puede comprender el evento ZM_BCS216090 y/o material derivado de una planta de maíz que comprende el evento ZM_BCS216090. Las partes de plantas incluyen, sin limitación, tejido vegetal, polen, óvulo, seda, espiga, antera, mazorca, tejido de raíz, tejido de tallo y tejido de hoja. Las partes de la planta pueden ser viables, no viables, regenerables y/o no regenerables.

[117] Se proporciona un producto básico que se deriva de una o más plantas de maíz, partes de plantas, semillas y/o tejidos vegetales que comprenden el evento ZM_BCS216090 y que contiene una cantidad detectable de una molécula de ácido nucleico o ADN, segmento o secuencia específicos para el evento ZM_BCS216090. Como se usa en el presente documento, un "producto básico" se refiere a cualquier composición o producto que comprende material derivado de una o

más plantas de maíz, semillas de maíz enteras o procesadas, una o más células vegetales y/o una o más partes de plantas que contienen o comprenden ADN del evento de maíz ZM_BCS216090. Los productos básicos no viables incluyen, entre otros, semillas, semillas enteras o procesadas, partes de semillas y partes de plantas, no viables; alimentos para animales que comprenden maíz, aceite de maíz, sémola de maíz, harina de maíz, hojuelas de maíz, salvado de maíz, pasta hecha con maíz, biomasa de maíz y productos combustibles producidos con maíz y partes de maíz. Los productos básicos viables incluyen, entre otros, semillas, plantas y células vegetales. Por lo tanto, las plantas de maíz que comprenden el evento ZM_BCS216090 se pueden usar para fabricar cualquier producto básico adquirido típicamente a partir del maíz. Cualquier dicho producto básico derivado de plantas de maíz que comprenden el evento ZM_BCS216090 puede contener al menos una cantidad detectable del ADN específico y único correspondiente al evento de maíz ZM_BCS216090, y específicamente puede contener una cantidad detectable de una molécula de ADN o polinucleótido que tiene o que comprende 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. La detección de una o más de estas secuencias de ADN o polinucleótido en una muestra puede usarse para determinar o diagnosticar que la muestra se tomó de una planta de maíz, parte de una planta de maíz, tejido de planta de maíz, célula de planta de maíz y/o producto de planta de maíz, tal como un producto básico de maíz, que comprende el evento ZM_BCS216090, o para determinar el contenido o la fuente de una planta de maíz, parte de planta de maíz, tejido de planta de maíz, célula de planta de maíz, y/o producto de planta de maíz, tal como un producto básico de maíz. Se puede usar cualquier método estándar de detección de moléculas de nucleótidos, incluidos los métodos de detección descritos en el presente documento. Un producto básico está dentro del alcance de la presente divulgación si hay alguna cantidad detectable de una molécula de ADN que tenga 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 contenida o comprendida en el producto básico.

[118] Las plantas de maíz, las células de las plantas de maíz, las semillas de maíz, las partes de plantas de maíz (tales como polen, óvulos, seda, espiga, antera, mazorca, tejido de raíz, tejido de tallo, tejido de hoja), las plantas de la progenie del maíz y los productos básicos de la presente

divulgación, por lo tanto, son útiles para, entre otras cosas, cultivar plantas con el fin de producir semillas y/o partes de plantas que comprenden el evento de maíz ZM_BCS216090 para fines agrícolas, producir progenie que comprende el evento de maíz ZM_BCS216090 para fines de investigación y fitomejoramiento; para usar con técnicas de microbiología para aplicaciones industriales y de investigación, y para la venta a consumidores.

[119] Se proporcionan métodos para producir plantas de maíz que comprenden las secuencias de ADN específicas y únicas del evento ZM_BCS216090 de la presente divulgación. Una planta de maíz de progenie que comprende el evento ZM_BCS216090 se puede producir, por ejemplo, mediante la autofecundación de una planta o línea progenitora que comprende el evento ZM_BCS216090, donde dicha planta o línea progenitora es homocigota o hemicigota para el evento ZM_BCS216090; o cruzando una primera planta o línea progenitora que comprende el evento ZM_BCS216090, donde dicha planta o línea progenitora es homocigota o hemicigota para el evento ZM_BCS216090, con una segunda planta o línea progenitora que tiene un genotipo o germoplasma diferente del de la primera línea progenitora, donde la segunda planta o línea progenitora puede o no puede contener o comprender el evento ZM_BCS216090. Como se explica más adelante en este documento, el evento de maíz ZM_BCS216090 contiene un transgén o casete de expresión que codifica un miARN que se dirige a los genes de oxidasa GA20 para suprimirlos, lo que conduce a niveles más bajos de GA activos en la planta y una altura de planta reducida (es decir, un fenotipo o rasgo semienano). De acuerdo con algunas formas de realización, las plantas de maíz transgénicas que comprenden el evento ZM_BCS216090 de la presente descripción son semienanas y/o tienen una altura de planta más corta en relación con una planta de control no transgénica. De acuerdo con algunas formas de realización, la(s) planta(s) de maíz transgénicas que comprenden el evento ZM_BCS216090 de la presente descripción son resistentes al acame (resistentes al acame de la raíz y/o del tallo) y/o son resistentes al quebrado en verde, en relación con una planta de control no transgénica. Las plantas transgénicas utilizadas en estos métodos pueden ser homocigotas o heterocigotas para el transgén. Las plantas de progenie producidas por estos métodos pueden ser plantas varietales o híbridas; pueden cultivarse a partir de semillas producidas por una planta que contiene el evento de maíz ZM_BCS216090 y/o a partir de semillas producidas por una planta fertilizada con polen de una planta que contiene el evento de maíz ZM_BCS216090; y pueden ser homocigotas o heterocigotas para el transgén y/o evento

ZM_BCS216090. Las plantas de progenie pueden autopolinizarse posteriormente para generar una línea de plantas de cultivo genuino, es decir, plantas homocigotas para el transgén, o alternativamente, pueden cruzarse, por ejemplo, pueden cultivarse con otra planta no relacionada, para producir una semilla o planta varietal o híbrida.

[120] Se proporcionan métodos para detectar la presencia de ADN derivado de una célula de maíz, tejido de maíz, semilla de maíz, parte de planta de maíz, o planta de maíz que comprende el evento de maíz ZM_BCS216090 en una muestra. Un método comprende (i) extraer una muestra de ADN de por lo menos una célula de maíz, tejido de maíz, semilla de maíz, o planta de maíz; (ii) poner en contacto la muestra de ADN con por lo menos un cebador que es capaz de producir secuencia de ADN específica para ADN del evento ZM_BCS216090 en condiciones apropiadas para la secuenciación de ADN; (iii) realizar una reacción de secuenciación de ADN; y luego (iv) confirmar que la secuencia de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos específica para el evento ZM_BCS216090, de la construcción allí comprendida, tal como una 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.

[121] Otro método comprende (i) extraer una muestra de ADN de por lo 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 que es capaz de producir un amplicón del ADN del evento ZM_BCS216090 en condiciones apropiadas para la amplificación de ADN; (iii) realizar una reacción de amplificación de ADN; y luego (iv) detectar la molécula de amplicón y/o confirmar que la secuencia de nucleótidos del amplicón comprende una secuencia de nucleótidos específica para el evento ZM_BCS216090, tal como una 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. El amplicón debe ser aquel específico para el evento ZM_BCS216090, tal como un amplicón que comprende SEQ ID NO: 1, o SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3, o SEQ ID NO: 4, o SEQ ID NO: 5, o SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 7, o SEQ ID NO: 8, o SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 10. La detección de una secuencia de nucleótidos específica para el evento ZM_BCS216090 en el amplicón es determinante y/o diagnóstico de la presencia del ADN específico del evento de maíz ZM_BCS216090 en la muestra. Un ejemplo de un par de cebadores que es capaz de producir un amplicón del ADN del evento ZM_BCS216090

en condiciones apropiadas para la amplificación de ADN se proporciona como SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12. El experto en la técnica puede diseñar sin dificultad otros pares de cebadores para producir un amplicón que comprende SEQ ID NO: 1, o SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3, o SEQ ID NO: 4, o SEQ ID NO: 5, o SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 7, o SEQ ID NO: 8, o SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 10, donde dicho par de cebadores comprende por lo menos un cebador dentro de la región genómica que flanquea la inserción, y un segundo cebador dentro de la inserción, siempre que pueda diseñarse y usarse cualquier par de cebadores que produzca un amplicón que comprende una secuencia de unión y/o la totalidad o parte de la secuencia de transgén o inserción. La detección de un amplicón podría ser sobre la base de cualquier método adecuado, tal como secuenciación, determinación del tamaño de fragmento o migración del amplicón en una matriz o en un gel, o un método sobre la base de la hibridación.

[122] Otro método de detección de 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 ZM_BCS216090 en una muestra consiste en (i) extraer una muestra de ADN de por lo 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 ZM_BCS216090; (iii) permitir que la sonda y la muestra de ADN hibriden en condiciones de hibridación rigurosas; y luego (iv) la detección de la hibridación entre la sonda y la muestra de ADN objetivo. Un ejemplo de la secuencia de una sonda de ADN que es específica para el evento ZM_BCS216090 se proporciona como SEQ ID NO: 13. El experto en la técnica puede diseñar sin dificultad otras sondas que comprenden una secuencia de unión, por lo menos un fragmento de ADN genómico que flanquea la inserción y por lo menos un fragmento de ADN de inserción, y/o una o más secuencias proporcionadas 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, y SEQ ID NO: 10. La detección de la hibridación de la sonda a la muestra de ADN es diagnóstico de la presencia de ADN específico del evento de maíz ZM_BCS216090 en la muestra. La ausencia de hibridación es alternativamente diagnóstico de la ausencia de ADN específico del evento de maíz ZM_BCS216090 en la muestra.

[123] Se proporcionan equipos de detección de ADN que son útiles para la identificación del ADN del evento ZM_BCS216090 de maíz en una muestra, y que también se pueden aplicar a métodos para cultivar plantas de maíz que contienen el ADN del evento apropiado. Dichos equipos

contienen cebadores y/o sondas de ADN que son específicos para el evento de maíz ZM_BCS216090. Dichos cebadores y/o sondas de ADN pueden comprender una o más 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, o un fragmento de las mismas. Un ejemplo de dicho equipo comprende al menos una molécula de ADN de longitud suficiente de nucleótidos continuos de SEQ ID NO: 10 para funcionar como una sonda de ADN útil para detectar la presencia y/o ausencia de ADN derivado de plantas de maíz transgénicas que comprenden el evento ZM_BCS216090 en una muestra. El ADN derivado de plantas de maíz transgénicas que comprende el evento ZM_BCS216090 comprenderá 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. Asimismo, los cebadores pueden comprender un par de cebadores que incluyen un primer cebador y un segundo cebador, donde al menos uno de los cebadores se hibrida con una secuencia flanqueante, y el otro cebador se hibrida con una secuencia de inserción del evento ZM_BCS216090 en el genoma de la planta o la secuencia flanqueante en el lado opuesto de la inserción. Los cebadores primero y segundo se hibridan con hebras opuestas del ADN genómico de la planta de maíz en diferentes posiciones separadas, de modo que una reacción de amplificación que involucra a los dos cebadores produce un amplicón que comprende las secuencias de cebador y la secuencia intermedia entre los dos cebadores. Se puede elegir una sonda para que se corresponda o hibride con el amplicón producido con un par de cebadores o un conjunto de cebadores, y puede comprender la totalidad o parte de la(s) secuencia(s) del cebador y/o la secuencia intermedia del amplicón entre los dos cebadores. Las sondas adecuadas pueden ser diseñadas fácilmente por un experto en la técnica, y deben comprender por lo menos 15, por lo menos 16, por lo menos 17, por lo menos 18, por lo menos 19, por lo menos 20, por lo menos 21, por lo menos 22, por lo menos 23, por lo menos 24, por lo menos 25, por lo menos 26, por lo menos 27, por lo menos 28, por lo menos 29, por lo menos 30, por lo menos 31, por lo menos 32, por lo menos 33, por lo menos 34, por lo menos 35, por lo menos 36, por lo menos 37, por lo menos 38, por lo menos 39, o por lo menos 40 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 10, y deben ser suficientemente únicas para el ADN del evento de maíz ZM_BCS216090 a fin de identificar ADN derivado del evento.

[124] Otro tipo de equipo comprende un par de cebadores útiles para producir un amplicón útil para detectar la presencia y/o ausencia de ADN derivado del evento de maíz ZM_BCS216090 transgénico en una muestra. Dicho equipo empleará un método que comprende poner en contacto una muestra de ADN objetivo con un par de cebadores como se describe en el presente documento, luego realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico suficiente para producir un amplicón que comprende una molécula de ADN que tiene por lo 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 luego detectar la presencia y/o ausencia del amplicón. Dicho método además puede incluir la secuenciación del amplicón o un fragmento de este, que será determinante, es decir, diagnóstico, de la presencia de ADN específico del evento de maíz ZM_BCS216090 en la muestra de ADN objetivo. Otros pares de cebadores pueden ser fácilmente diseñados por el experto en la técnica, que deben comprender por lo menos 15, por lo menos 16, por lo menos 17, por lo menos 18, por lo menos 19, por lo menos 20, por lo menos 21, por lo menos 22, por lo menos 23, por lo menos 24, por lo menos 25, por lo menos 26, por lo menos 27, por lo menos 28, por lo menos 29, o por lo menos 30 nucleótidos contiguos de secuencias proporcionadas, sin limitación, 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, y ser suficientemente únicos para el ADN del evento de maíz ZM_BCS216090 a fin de identificar ADN derivado del evento.

[125] Los equipos y métodos de detección de la invención son útiles para, entre otras cosas, identificar el evento de maíz ZM_BCS216090, seleccionar variedades de plantas o híbridos que comprenden el evento de maíz ZM_BCS216090, detectar la presencia de ADN derivado de la planta de maíz transgénica que comprende el evento ZM_BCS216090 en una muestra, y monitorear muestras para detectar la presencia y/o ausencia de plantas de maíz que comprenden el evento ZM_BCS216090, o partes de plantas derivadas de plantas de maíz que comprenden el evento ZM_BCS216090.

[126] Las secuencias del inserto de ADN heterólogo, las secuencias de unión o la secuencia flanqueante del evento de maíz ZM_BCS216090 pueden determinarse o verificarse amplificando dichas secuencias del evento utilizando cebadores derivados de las secuencias proporcionadas en este documento, seguido de la secuenciación de ADN estándar del amplicón o del ADN clonado.

[127] Se proporcionan métodos para detectar la cigosidad del evento y el transgén con ADN genómico derivado de al menos una célula de maíz, tejido de maíz, semilla de maíz, parte de planta de maíz o planta de maíz que comprende el evento de maíz ZM_BCS216090 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, parte de una planta de maíz o planta de maíz; (ii) poner en contacto la muestra de ADN con un primer par de cebadores que es capaz de producir un primer amplicón diagnóstico del evento ZM_BCS216090; (iii) poner en contacto la muestra de ADN con un segundo par de cebadores que es capaz de producir un segundo amplicón diagnóstico de ADN genómico de maíz nativo que no comprende el evento ZM_BCS216090; (iv) realizar una reacción de amplificación de ADN; y luego (v) detectar los amplicones, donde la presencia de solo el primer amplicón es diagnóstico de ADN de un evento homocigoto ZM_BCS216090 en la muestra, la presencia tanto del primer amplicón como del segundo amplicón es diagnóstico de una planta de maíz heterocigota para el evento ZM_BCS216090, y la presencia de solo el segundo amplicón es diagnóstico de la ausencia de ADN del evento ZM_BCS216090 en la muestra. Se presenta un conjunto ejemplar de pares de cebadores como SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12 que producen un amplicón diagnóstico del evento ZM_BCS216090; y SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 15, que produce un amplicón diagnóstico de ADN genómico de maíz de tipo salvaje no insertado que no comprende el evento ZM_BCS216090. También se puede incorporar un conjunto de sondas en dicho método de amplificación para usar en un formato de PCR en tiempo real utilizando los conjuntos de pares de cebadores descritos anteriormente. Se presenta un conjunto ejemplar de sondas como SEQ ID NO: 13 (diagnóstico del amplicón para el evento ZM_BCS216090) y SEQ ID NO: 16 (diagnóstico del amplicón para ADN genómico de maíz de tipo salvaje que no comprende el evento ZM_BCS216090).

[128] 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, parte de una planta de maíz o planta de maíz; (ii) poner en contacto la muestra de ADN con un conjunto de sondas que contiene al menos una primera sonda que se hibrida específicamente con el ADN del evento ZM_BCS216090 y al menos una segunda sonda que se hibrida específicamente con el ADN genómico de maíz que se alteró mediante la inserción del ADN heterólogo del evento ZM_BCS216090 y no se hibrida con el ADN del evento ZM_BCS216090; (iii) hibridar el conjunto de sondas con la muestra en

condiciones de hibridación rigurosas, donde la detección de la hibridación de solo la primera sonda en las condiciones de hibridación es diagnóstico de una célula de maíz, tejido de maíz, semilla de maíz, parte de una planta de maíz o planta de maíz homocigotos para el ADN del evento ZM_BCS216090 en la muestra; donde la detección de la hibridación de la primera y la segunda sondas en las condiciones de hibridación es un diagnóstico de una célula de maíz, tejido de maíz, semilla de maíz, parte de planta de maíz o planta de maíz heterocigotos para el evento ZM_BCS216090 en una muestra de ADN; y la detección de la hibridación de solo la segunda sonda en las condiciones de hibridación es un diagnóstico de la ausencia del ADN del evento ZM_BCS216090 en la muestra.

[129] Otro método más 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, parte de una planta de maíz o planta de maíz; (ii) poner en contacto la muestra de ADN con un primer par de cebadores que es capaz de producir un primer amplicón diagnóstico del evento ZM_BCS216090; (iii) poner en contacto la muestra de ADN con un segundo par de cebadores que es capaz de producir un segundo amplicón de un estándar interno que se sabe que es de una sola copia y homocigoto en la planta de maíz; (iv) poner en contacto la muestra de ADN con un conjunto de sondas que contiene al menos una primera sonda que se hibrida específicamente con el primer amplicón y al menos una segunda sonda que se hibrida específicamente con el segundo amplicón; (v) realizar una reacción de amplificación de ADN utilizando PCR en tiempo real, y determinar los umbrales de ciclo (valores C_t) del primer y segundo amplicones; (vi) calcular la diferencia (ΔC_t) entre el valor de C_t del primer amplicón y del segundo amplicón; y (vii) determinar la cigosidad, donde un ΔC_t de alrededor de cero (0) indica homocigosidad del evento o T-ADN insertado, y un ΔC_t de alrededor de uno (1) indica heterocigosidad del evento o T-ADN insertado. Los eventos heterocigotos y homocigotos se diferencian por una unidad de valor de ΔC_t de aproximadamente uno (1). Dada la variabilidad normal observada en la PCR en tiempo real debido a múltiples factores, tales como la eficiencia de la amplificación y las temperaturas de anelación ideales, el rango de “alrededor de uno (1)” se define como un ΔC_t de 0,75 a 1,25, y el rango de “alrededor de cero (0)” se define como un ΔC_t de -0,25 a 0,25 (o de 0,0 a 0,25 si el ΔC_t se mide como un valor absoluto). Los pares de cebadores y las sondas para el método anterior para determinar la cigosidad pueden amplificar y detectar amplicones del transgén o ADN de evento y el patrón de ADN interno.

[130] De acuerdo con formas de realización de la presente descripción, una planta o parte de planta de maíz transgénico, una o más plantas o partes de planta de maíz transgénico o una pluralidad de plantas o partes de planta de maíz transgénico como se proporciona en el presente documento, o un campo o suelo agrícola en el que se plantan o se cultivan una planta o parte de una planta de maíz transgénico, una o más plantas o partes de planta de maíz transgénico o una pluralidad de plantas o partes de planta de maíz transgénico como se proporciona en el presente documento, se pueden tratar con una composición agrícola que comprende uno o más ingredientes activos u otros agentes, tales como, por ejemplo y sin limitación, un herbicida o uno o más herbicidas, un fungicida o uno o más fungicidas, un insecticida o uno o más insecticidas, un regulador del crecimiento vegetal o estimulante vegetal o uno o más reguladores del crecimiento vegetal y/ o estimulantes de plantas, y/o un asegurador o uno o más aseguradores. A continuación se proporcionan listas de compuestos posibles o representativos para cada uno de estos tipos de ingredientes activos o agentes, y una composición agrícola puede comprender uno o cualquier combinación o multiplicidad de estos ingredientes activos, agentes o compuestos. Tal composición agrícola se puede aplicar, por ejemplo, como tratamiento foliar, de suelo o en surco, como tratamiento preemergente, previo a la siembra y/o posemergente, y/o en algunos casos, se puede aplicar a una parte o semilla de una planta transgénica proporcionada en el presente documento.

[131] Una composición agrícola puede formularse de acuerdo con su uso y aplicación previstos. La formulación apropiada de la composición agrícola puede elegirse para tener diferentes parámetros fisicoquímicos, componentes y estabilidades de los compuestos respectivo. Los posibles tipos de formulaciones para una composición agrícola pueden incluir, por ejemplo: polvos humectables (WP), polvos solubles en agua (SP), concentrados solubles en agua, concentrados emulsionables (EC), emulsiones (EW), tales como emulsiones de aceite en agua y agua en aceite, soluciones pulverizables, concentrados de suspensión (SC), dispersiones a base de aceite o agua, soluciones miscibles con aceite, suspensiones para cápsulas (CS), productos para espolvorear (DP), abonos, gránulos para esparcir y aplicar al suelo, gránulos (GR) en forma de microgránulos, gránulos de pulverización, gránulos de absorción y adsorción, gránulos dispersables en agua (WG), gránulos solubles en agua (SG), formulaciones de ULV, microcápsulas y ceras. Si es apropiado, algunas composiciones agrícolas de un compuesto pesticida o uno o más compuestos pesticidas

podrían formularse y usarse como un recubrimiento de semillas aplicado a una parte de la planta o semilla como se proporciona en este documento.

INFORMACIÓN DE DEPÓSITO

[132] El 14 de julio de 2021 se realizó un depósito de una muestra representativa de semilla de maíz que contiene el evento ZM_BCS216090, de acuerdo con el Tratado de Budapest, en la Colección Estadounidense de Cultivos Tipo (ATCC) con domicilio en 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110, EE. UU., y se le asignó el Número de Acceso ATCC PTA-127050.

EJEMPLOS

[133] Los siguientes ejemplos se incluyen para describir más completamente la invención. Se resumen la producción y las pruebas de más de quince mil (15.000) eventos únicos para la construcción transgénica pM578 de miARN, y el análisis de cientos de miles de plantas individuales durante siete años a través de las rigurosas pruebas moleculares, agronómicas y de campo requeridas para la creación y selección final del evento principal de maíz ZM_BCS216090 (ver, por ejemplo, FIG. 4 y FIG. 5).

[134] Si bien los Ejemplos demuestran ciertas formas de realización de la presente invención, debe apreciarse que todas las formas de realización y los ejemplos específicos proporcionados en este documento son ilustrativos y no exhaustivos. Los expertos en la técnica deben apreciar, a la luz de la presente divulgación, que se pueden realizar cambios y modificaciones a las formas de realización, los ejemplos y detalles que se divulgan aquí, sin apartarse del espíritu y alcance de la presente invención.

EJEMPLO 1

Prueba de casete de expresión, diseño de construcción, prueba de plantas y selección de construcción

[135] La expresión transgénica en las plantas es influenciada por numerosos factores diferentes. Se debe encontrar la combinación correcta de un gen de interés (GOI) y diferentes elementos de expresión que impulsen la expresión en las plantas, sin dar como resultado fenotipos anormales que tengan rasgos nocivos. Además, más allá de los propios elementos de expresión y su combinación y orientación en un casete, la expresión de los transgenes en las

plantas puede ser influenciada por la posición de la inserción cromosómica, quizás, debido a la estructura de la cromatina (p. ej., heterocromatina) o la proximidad de elementos de regulación de la transcripción (p. ej., mejoradores, etc.) cerca del sitio de integración (Kurt Weising *et al.*, *Annu. Rev. Genet.*, 22: 421–77, 1988). Por ejemplo, puede haber variación en los niveles de expresión de un gen introducido de la misma construcción entre diferentes eventos con diferentes posiciones de inserción cromosómica en el genoma de la planta. Las diferentes posiciones de inserción cromosómica también pueden producir diferencias en los patrones de expresión espaciales o temporales que pueden no corresponder a los patrones esperados de los elementos reguladores de la transcripción presentes en la construcción génica introducida.

[136] Por estas razones, a menudo es necesario crear y cribar múltiples construcciones y una gran cantidad de eventos de transformación para una determinada construcción, a fin de identificar la construcción y luego el evento óptimo (el evento principal), que demuestra rasgos óptimos y expresión adecuada del gen de interés introducido, junto con la ausencia de problemas moleculares y de inserción genómica (p. ej., seleccionar inserciones limpias sin truncamientos transgénicos o secuencia de vector extraña, y evitar posiciones de inserción que estén cerca de genes, loci o transgenes de interés existentes), mientras que tampoco produce anomalías agronómicas o fenotípicas. Antes de dichos estudios, puede que no sea posible determinar si se puede obtener un fenotipo de evento beneficioso particular, o qué evento proporcionará estos rasgos y características óptimos. En una prueba de concepto inicial y etapa de desarrollo durante varios años y múltiples temporadas de crecimiento, se transformaron en plantas de maíz una serie de construcciones diferentes con diferentes elementos de expresión. Las plantas transformadas se evaluaron y se seleccionaron progresivamente para pruebas posteriores, sobre la base de un rango deseable de altura de planta y altura de mazorca reducidas, y ausencia de anomalías fenotípicas y agronómicas. La construcción principal resultante, denominada pM578 (ver la Figura 2), se seleccionó para realizar más pruebas extensas de eventos de transformación.

[137] Se usaron células de *Agrobacterium tumefaciens* (cepa AB32) portadoras de la construcción pM578, que contiene el gen CP4 EPSPS como marcador seleccionable y un gen de miARN transgénico (el transgén), en la transformación de plantas de una línea de élite de maíz denominada "EL0", a fin de generar plantas de maíz de baja estatura que comprenden el transgén. Se obtuvo un total de 1533 plantas transgénicas a partir de la transformación mediada por

Agrobacterium de explantes de embriones de tipo salvaje utilizando las células de la cepa AB32 de *Agrobacterium tumefaciens* que portaban el vector pM578 o la construcción de plásmido.

[138] Las plantas transgénicas se sometieron a una serie de cribados moleculares y ensayos de campo agronómicos para identificar eventos libres de espinazo que portaban una sola copia del T-ADN intacto. Luego, se seleccionó un evento superior como candidato principal en función de los datos moleculares y los fenotipos agronómicos.

[139] Para el cribado del control de calidad molecular (MQC, por sus siglas en inglés), se utilizaron tres ensayos de PCR cuantitativa TaqMan para la genotipificación, a fin de detectar la presencia y el número de copias del gen de interés (GOI, por sus siglas en inglés), el marcador de selección y el espinazo. Los eventos con una copia de GOI, una copia de marcador pero sin espinazo pasaron los cribados de MQC. Los eventos con más de una copia del GOI o marcador o que dieron positivo para el espinazo no pasaron los cribados del MQC. Si los eventos tuvieron resultados no concluyentes de cualquiera de los ensayos, se clasificaron como no recuperables y se excluyeron de evaluaciones posteriores.

[140] De las 1533 plantas transgénicas, se identificaron 225 eventos (15 %) que carecían de espinazo y contenían solo una copia de la inserción en las plantas, a través de los cribados R₀ MQC. La FIG. 5 muestra una ilustración del proceso completo de mejoramiento utilizado para generar y seleccionar el evento de maíz ZM_BCS216090 libre de marcador. Los resultados del cribado R₀ MQC indicaron que el evento precursor para el evento de maíz ZM_BCS216090 (antes de la escisión del marcador Cre, ver a continuación), seleccionado posteriormente como el evento principal, tenía una copia del gen marcador CP4 EPSPS y el transgén, pero sin el espinazo del vector de transformación.

[141] La Tabla 2 ilustra que de estos eventos de una copia y sin espinazo, 80 eventos (36 %) y 15 eventos (7 %) se descartaron por fenotipos con animalias o por cuestiones de salud vegetal, respectivamente, mientras que 130 eventos (58 %) pasaron el cribado MQC y las plantas R₀ con estos eventos se cultivaron hasta la madurez. La cantidad de eventos avanzados a cada generación sucesiva se agrupan en varias rondas de transformaciones.

Tabla 2. Descomposición de plantas transgénicas de maíz R₀.

Descripción	Número	Porcentaje
Total eventos generados	1533	100 %

No pasaron los cribados MQC	1293	84 %
No recuperables	15	1 %
Pasaron cribados MQC	225	15 %
Desechados – fenotipos con anomalías	80	35 %
Desechados – pobre salud vegetal	15	7 %
Pasaron cribado MQC R ₀	130	58 %

[142] Las plantas transgénicas se sometieron a exámenes moleculares adicionales, tales como la secuenciación del genoma completo (E–Southern), para determinar la secuencia y el contexto genómico de los eventos R₀ que crecieron hasta la madurez, y 84 de esos eventos se seleccionaron y se autofecundaron para producir semilla R₁ en función de estas consideraciones genómicas adicionales. Sobre la base de la información de secuencia mapeada contra los genomas de B73 y las líneas de élite internas, la ubicación genómica de la inserción de TADN *in planta* se identificó en el cromosoma 1, con una delección de 41 pares de bases en el genoma en el sitio de inserción.

[143] Se realizó un cribado de R₁ MQC para confirmar que los eventos individuales en las plantas R₀ estaban presentes en una sola copia y segregados en una relación esperada de 1:2:1 (homocigotos: hemicigotos: nulos de tipo salvaje). Por ejemplo, como se muestra en la Tabla 3, los resultados del cribado de R₁ MQC para el evento precursor del evento de maíz ZM_BCS216090 (antes de la escisión del marcador Cre) mostraron la segregación 1:2:1 para el transgén codificante de miARN y CP4–EPSPS. Las plantas R₁ homocigotas para eventos seleccionados se autofecundaron para producir plantas R₂, y se realizó un cribado MQC de R₂ para confirmar que todos los descendientes R₂ derivados de las plantas homocigotas R₁ también eran homocigotas para el evento respectivo. Por ejemplo, como se muestra en la Tabla 4, los resultados del cribado de R₂ MQC para el evento precursor del evento de maíz ZM_BCS216090 (antes de la escisión del marcador Cre) revelaron que todas las plantas R₂ eran homocigotas para el transgén codificante de miARN y CP4–EPSPS, lo que confirma nuevamente que la inserción de T–ADN fue una sola copia en el evento principal. De los 84 eventos seleccionados en la etapa R₀ que se autofecundaron para producir semillas R₁, se seleccionaron y se autofecundaron 66 eventos en plantas R₁ para producir semillas R₂ homocigotas. La selección y el desgaste en el número de

eventos avanzados hacia cada generación subsiguiente se debió a múltiples factores, incluidos, por ejemplo, la disponibilidad de semillas y la capacidad limitada.

Tabla 3. Resultados del cribado de R₁ MQC para el precursor del evento de maíz ZM_BCS216090.

Cigosidad	Evento de maíz ZM_BCS216090 (recuento y %)	
Homocigotos	5	23 %
Hemicigotos	12	55 %
Tipo salvaje (nulos)	5	23 %

Nota: Las recuperaciones tanto para el CP4 EPSPS como para el gen de transgén de miARN fueron las mismas para cada planta.

Tabla 4. Resultados del cribado de R₂ MQC para el precursor del evento de maíz ZM_BCS216090.

Cigosidad	Evento de maíz ZM_BCS216090 (recuento y %)	
Homocigotos	73	100 %
Hemicigotos	0	0 %
Tipo salvaje (nulos)	0	0 %

Nota: Se combinaron tres lotes de datos de genotipado. Las recuperaciones para el CP4 EPSPS y el transgén de miARN fueron las mismas para cada planta.

EJEMPLO 2

Escisión Cre del casete de selección de glifosato en el evento de maíz ZM_BCS216090

[144] Este ejemplo describe la remoción del casete de selección de glifosato del evento de maíz ZM_BCS216090 a través de la escisión Cre *in planta*. El casete de selección de glifosato se usó para seleccionar eventos transformados. Mediante la eliminación del casete de selección, se creó un evento "libre de marcador" en el que solo permaneció el casete de expresión de miARN transgénico en el evento final.

[145] La FIG. 5 ilustra el proceso de mejoramiento utilizado para generar el evento de maíz ZM_BCS216090 libre de marcador. La construcción pM578 comprende el casete de expresión de miARN y un casete usado para la selección de células vegetales transformadas usando la selección

de glifosato. El casete de selección estaba flanqueado en ambos lados con sitios de reconocimiento de LoxP Cre–recombinasa. Como se describió anteriormente, se transformaron explantes de embriones de línea de maíz de élite utilizando un proceso de transformación mediada por *Agrobacterium* con la construcción pM578. Después de la transformación, los transformantes R₀ se autopolinizaron durante dos (2) generaciones, tiempo durante el cual se eliminaron muchos eventos en función de diversos ensayos y el desgaste normal como se mencionó anteriormente, tal como el retorno de semillas, la salud de las plantas y la caracterización molecular. En esta etapa, las plantas en la generación R₂ que comprenden un evento transgénico se cruzaron con plantas que expresaban Cre–recombinasa, como se muestra en la FIG. 5. Específicamente, plantas de la generación R₂ despanojadas (hembras) homocigotas para el casete de expresión de miARN se polinizaron de forma cruzada con plantas de maíz transgénicas (machos) homocigotas para un casete transgénico que codifica una enzima Cre–recombinasa. El polen del donante masculino que expresa Cre–recombinasa germina después de aterrizar en el tejido de seda de la planta hembra que comprende el casete de expresión de miARN, de modo de liberar los dos espermatozoides del donante masculino que expresa Cre–recombinasa. El núcleo de un espermatozoide se fusiona con el núcleo de un óvulo de la planta hembra, para formar un cigoto, y el otro núcleo espermático se fusiona con uno de los dos núcleos polares, lo que a su vez se fusiona con el otro núcleo polar, de manera de establecer así el núcleo del endospermo primario. Por lo tanto, al usar la planta que expresa Cre–recombinasa como donante masculino de polen, tanto el embrión como el endospermo del cruce resultante expresarán Cre–recombinasa a medida que las células se dividen y se desarrollan y se convierten en un grano de maíz (es decir, una semilla). La Cre–recombinasa se une a repeticiones invertidas en el sitio LoxP y cataliza un cruce en una región espaciadora de ocho pares de bases de los dos sitios LoxP que flanquean el casete de expresión, lo que da como resultado la escisión del casete marcador con un sitio LoxP restante en el T–ADN integrado debido a la recombinación.

[146] Como se muestra en la FIG. 5, se cruzaron plantas R₂ para 43 eventos, con plantas que expresaban la recombinasa Cre (Línea Cre Élite). La progenie F₁ resultante de este cruce se seleccionó por la ausencia del casete de selección CP4 EPSPS, y se permitió que la progenie F₁ para 38 eventos libres de marcadores se autopolinizara para producir plantas de progenie F₂. Esta autopolinización de la progenie F₁ se identifica como la Auto F₁ en la línea de tiempo presentada

en la FIG. 5. A través de este proceso, los dos casetes de expresión restantes –el casete de expresión de Cre–recombinasa y el transgén que codifica miARN– se segregaron en la población F₂ resultante, para lograr progenie homocigota o heterocigota para uno o ambos casetes de expresión o transgenes.

[147] Se seleccionó la progenie F₂ que demostró la ausencia del casete de expresión de Cre–recombinasa y la homocigosidad para el casete de expresión de miARN transgénico sin el casete marcador. Esta progenie F₂ seleccionada para 23 eventos se autopolinizó (identificado como Auto F₂ en la línea de tiempo presentada en la FIG. 5), para dar origen a una generación F₃ homocigota para el casete de expresión de miARN. Además de la ausencia del casete de Cre–recombinasa y la homocigosidad del transgén, los eventos para el Auto F₂ también se seleccionaron en función de consideraciones genómicas, de integración de rasgos y de reproducción adicionales.

[148] Se realizó una autopolinización adicional de la progenie F₃ para 22 eventos (identificados como Auto F₃ en la línea de tiempo presentada en la FIG. 5) para producir progenie F₄ y semillas cuya pureza se analizó y se designó como "Semilla estándar de oro" (o "GSS"). La semilla estándar de oro es semilla cuya pureza se ha analizado para garantizar la ausencia de eventos transgénicos distintos del evento de maíz ZM_BCS216090. F₄ fue la primera generación de semillas estándar de oro. Después de la creación de la GSS, se seleccionaron plantas de progenie F₄ para solo 10 eventos, y se autopolinizaron adicionalmente para producir generaciones adicionales de plantas de progenie y semillas homocigotas para el casete de expresión de miARN o transgén, o, alternativamente, pueden cruzarse plantas de progenie homocigotas para el casete de expresión de miARN o el transgén de la generación F₄ o generaciones subsiguientes, con otras plantas que tengan un genotipo o germoplasma diferente, para permitir la integración de rasgos de un evento descrito en este documento, tal como el evento de maíz ZM_BCS216090, en otros germoplasmas o antecedentes genéticos y/o con otros rasgos.

[149] La escisión del casete del marcador de selección de glifosato no afectó la expresión del transgén. La eliminación del casete de selección de glifosato del evento de maíz ZM_BCS216090 a través de la escisión Cre proporcionó un evento de maíz transgénico que produjo plantas de maíz de baja estatura sin el casete CP4 EPSPS en el evento final. Este evento "libre de marcador" asegura la flexibilidad al construir pilas de mejoramiento de maíz con otros eventos transgénicos de maíz, a fin de proporcionar una multiplicidad de productos que incorporan el evento de maíz

ZM_BCS216090 y permitir múltiples opciones para proporcionar rasgos adicionales en las pilas de mejoramiento o reproducción comercial finales.

EJEMPLO 3

Ensayos TaqMan® de criterio de valoración específico de evento, del evento de maíz ZM_BCS216090

[150] El siguiente ejemplo describe métodos útiles para identificar la presencia del evento de maíz ZM_BCS216090 en una muestra de maíz.

[151] La detección del evento de maíz ZM_BCS216090 en una muestra se puede realizar mediante técnicas de detección sobre la base de ADN o ARN. En el presente documento se proporcionan ejemplos de métodos y materiales de detección. La detección puede determinar la presencia o ausencia del evento en una muestra. La detección también puede indicar el número de copias genómicas del evento de maíz ZM_BCS216090 (es decir, hemicigoto, homocigoto o heterocigoto) en una muestra de ADN genómico.

[152] Se desarrolló un método de amplificación térmica de Applied Biosystems™ TaqMan (Thermo Fisher Scientific) de criterio de valoración específico de evento para identificar el evento de maíz ZM_BCS216090 en una muestra. Los cebadores y la sonda de ADN usados en el ensayo de criterio de valoración para este ejemplo se muestran en la Tabla 5, aunque se aprecia que también se pueden usar otros cebadores y sondas.

Tabla 5. Cebadores y sondas de control interno y específicos de evento ZM_BCS216090.

SEQ ID NO.	Nombre	Tipo
11	Cebador SQ51606	Específico de evento
12	Cebador SQ51629	Específico de evento
13	Sonda 6FAM™ PB50583	Específico de evento
14	Cebador SQ20222	Control interno
15	Cebador SQ20221	Control interno
16	Sonda VIC® PB50298	Control interno

[153] 6-FAM es un producto de tinte fluorescente de Applied Biosystems (Foster City, CA) y se adjunta a la sonda de ADN. Para las sondas TaqMan MGB, la actividad exonucleasa 5' de la ADN polimerasa Taq escinde la sonda desde el extremo 5', entre el fluoróforo y el extintor. Cuando se hibridan con la hebra de ADN objetivo, el extintor y el fluoróforo se separan lo suficiente como para producir una señal fluorescente, de modo de liberar así la fluorescencia. El par de cebadores, cuando se usa con estos métodos de reacción y la sonda, produce un amplicón de ADN que es diagnóstico para el evento de maíz ZM_BCS216090. Los controles para este análisis deben incluir un control positivo que contenga el evento de maíz ZM_BCS216090, un control negativo de una planta no transgénica y un control negativo que no contenga ADN patrón. Además, un control para la reacción de PCR debe incluir de manera óptima cebadores de control interno y una sonda de control interno, específicos para un gen de una sola copia en el genoma del maíz. Estos ensayos están optimizados para su uso con el sistema GeneAmp® PCR System 9700 de Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific) ejecutado a máxima velocidad, pero se pueden utilizar otros equipos.

[154] Se desarrollaron y se validaron ensayos de PCR específicos de evento para la identificación de líneas (ID de línea). Sobre la base de T-ADN integrado y secuencias genómicas flanqueantes, se diseñaron ensayos de PCR TaqMan. Se realizaron pruebas de validación simplificada (sValid) para identificar buenos ensayos ejecutando PCR de criterio de valoración en réplicas de 8 muestras positivas, 6 negativas y 2 de agua. Las puntuaciones se calcularon sobre la base de la diferencia de las lecturas de FAM, usando la fórmula definida como puntuación = (promedio de muestras positivas – promedio de muestras negativas). El rendimiento del ensayo se clasificó en función de la puntuación en un sistema de cinco estrellas, considerándose aceptable un ensayo con tres o más estrellas. Se realizó una prueba de pureza para garantizar que los tejidos de hojas que contenían secuencias objetivo mostraran el positivo en los ensayos correspondientes. Se realizó una prueba de competencia (PT) para garantizar que el procedimiento se pudiera replicar para obtener los resultados esperados con el ensayo.

[155] Los ensayos de PCR TaqMan de criterio de valoración específico de evento (ID de línea) se utilizan para viveros GSS y otros programas de cribado de calidad a fin de verificar la presencia de rasgos de interés. Sobre la base de las secuencias flanqueantes de la planta y las secuencias de T-ADN *in planta* identificadas por la hibridación rápida de secuencia no ligada (RUSH) de R₀,

dos ID de línea, que incorporan un oligonucleótido transgénico, un segundo oligonucleótido correspondiente posicionado apropiadamente en la secuencia flanqueante 5' o 3' y una sonda marcada con fluorescencia para el evento principal, fueron diseñados y validados.

[156] El ensayo de ID de línea que se ha seleccionado y utilizado en caracterizaciones moleculares posteriores para el evento de maíz ZM_BCS216090 es un ensayo de PCR TaqMan de criterio de valoración cualitativo específico de evento. La información de configuración y secuencia para el ensayo de ID de línea del evento de maíz ZM_BCS216090 se enumeran en la Tabla 6, y las condiciones de ciclado se presentan en la Tabla 7.

Tabla 6. Componentes de la reacción de PCR TaqMan de criterio de valoración específico de evento ZM_BCS216090.

Paso	Reactivo	Concentración de carga (μM)	Volumen (μl)	Concentración final (μM)	Observaciones
—	Volumen de reacción		5		
1	Agua 18 megohm		0,00		Ajuste para volumen final
2	Mezcla maestra 2×		2,28		1× concentración final de tampón
3	Cebador específico de evento SQ51606	100	0,05	0,9	
4	Cebador específico de evento SQ51629	100	0,05	0,9	
5	Sonda específica de evento 6FAM™ PB50583	100	0,01	0,2	La sonda es sensible a la luz
6	Cebador de control interno SQ20222	100	0,05	0,9	
7	Cebador de control interno SQ20221	100	0,05	0,9	
8	Sonda de control interno VIC® PB50298	100	0,01	0,2	La sonda es sensible a la luz
9	ADN extraído (patrón): • Muestras de hoja por analizar • Control negativo (ADN no		2,5		Se realizan reacciones separadas para cada patrón

transgénico) • Control de agua negativo (Control sin patrón) • Controles de calidad positivos ADN de ZM_BCS216090				
--	--	--	--	--

Tabla 7. Condiciones de termociclador TaqMan de criterio de valoración.

Paso Nro.	Ciclo Nro.	Parámetros
1	1	95°C, 20 segundos
2	35	95°C, 3 segundos 60°C, 20 segundos
3	1	10°C

[157] Aquí se describe un ensayo de cigosidad para determinar si una planta que comprende el evento principal es heterocigota u homocigota para el evento o la secuencia de tipo salvaje. Se puede diseñar un ensayo de reacción de amplificación utilizando la información de secuencia proporcionada en este documento. Por ejemplo, dicho ensayo de PCR incluiría el diseño de al menos tres cebadores: cebador-1, cebador-2 y cebador-3, donde el cebador-1 es específico del ADN genómico en el flanco 3' del evento principal; el cebador-2 es específico para la inserción transgénica del evento principal; y el cebador-3 es específico de la secuencia de tipo salvaje. Cuando se utiliza como un par de cebadores en una reacción de amplificación, el cebador 1 con el cebador 2 producirán un amplicón de PCR específico para el evento principal. Cuando se utiliza como un par de cebadores en una reacción de amplificación, el cebador 1 con el cebador 3 producirán un amplicón de PCR específico para la secuencia de tipo salvaje. En una reacción de PCR realizada en ADN genómico de maíz, los amplicones de PCR respectivos generados a partir del cebador-1 + cebador-2 y aquel generado a partir del cebador-1 + cebador-3 diferirán en la secuencia y el tamaño del amplicón. Cuando los tres cebadores se incluyen en una reacción de PCR con ADN extraído de una planta homocigota para el evento principal, solo se generará el amplicón del cebador 1 + el cebador 2 (específico para la inserción del evento principal). Cuando los tres cebadores se incluyen en una reacción de PCR con ADN extraído de una planta heterocigota para el evento principal, se generarán tanto el amplicón del cebador-1 + cebador-2

(específico para la inserción del evento principal) como el amplicón del cebador-1 + cebador-3 (específico para la secuencia de tipo salvaje o la ausencia de la inserción del evento principal). Cuando los tres cebadores se mezclan en una reacción de PCR con ADN extraído de una planta que es nula para el evento principal (de tipo salvaje), solo se generará el amplicón del cebador-1 + cebador-3 (específico para la secuencia de tipo salvaje). Los amplicones producidos usando la reacción de PCR pueden identificarse o distinguirse usando cualquier método conocido en la técnica.

[158] Otro ensayo de cigosidad para el evento principal es una reacción de amplificación térmica TaqMan. Para este tipo de ensayo, además de los cebadores descritos anteriormente, el ensayo incluiría dos sondas marcadas con fluorescencia. La sonda-1 sería específica para el evento principal, y la sonda-2 sería específica para una planta de maíz que es nula para el evento principal (tipo salvaje), y donde las dos sondas contienen etiquetas fluorescentes diferentes, por ejemplo, la etiqueta 6-FAM o la etiqueta VIC. Cuando se utiliza en una reacción TaqMan, el cebador-1 + el cebador-2 + la sonda-1 producirán una primera señal fluorescente específica para el evento principal, y el cebador-1 + el cebador-3 + la sonda-2 producirán una segunda señal fluorescente específica para una planta de tipo salvaje. Cuando los tres cebadores y las dos sondas se incluyen en una reacción TaqMan con ADN extraído de una planta homocigota para el evento principal, solo se generará la primera señal fluorescente (específica del cebador-1 + cebador-2 + sonda-1). Cuando los tres cebadores y las dos sondas se incluyen en una reacción TaqMan con ADN extraído de una planta heterocigota para el evento principal, se generarán tanto la primera señal fluorescente (específica del cebador-1 + cebador-2 + sonda-1) como la segunda señal fluorescente (específica del cebador-1 + cebador-3 + sonda-2). Cuando los tres cebadores se mezclan en una reacción TaqMan con ADN extraído de una planta que es nula para el evento principal (de tipo salvaje), solo se generará la segunda señal fluorescente (específica del cebador-1 + cebador-3 + sonda-2).

[159] Otro método para detectar la presencia del evento principal en una muestra de planta sería el análisis de Southern tal como se entiende generalmente en la técnica. Un experto en la técnica, en función de la presente divulgación y la descripción del evento principal, entenderá cómo diseñar sondas de hibridación Southern específicas para el evento principal y una segunda sonda de hibridación Southern específica para una planta que es nula para el evento principal (tipo salvaje). Con el análisis de Southern, una señal detectada solo de la primera sonda de hibridación Southern

será indicativa de una planta homocigota para el evento principal; una señal detectada tanto de la primera sonda de hibridación Southern como de la segunda sonda de hibridación Southern será indicativa de una planta heterocigota para el evento principal; y una señal detectada solo de la segunda sonda de hibridación Southern será indicativa de que el ADN se extrajo de una planta que es nula para el evento principal (de tipo salvaje).

EJEMPLO 4

Rendimiento y rasgos agronómicos del evento de maíz ZM_BCS216090 sobre la base de ensayos de campo en múltiples temporadas de cultivo

[160] Este ejemplo demuestra que el evento de maíz transgénico ZM_BCS216090 minimiza las pérdidas de rendimiento de cultivos para los agricultores, aunque mejora la estabilidad y aumenta la resistencia al acame debido a su baja estatura o fenotipo semienano. Además, la estatura reducida de las plantas de maíz que comprenden el evento ZM_BCS216090 permite el acceso de campo durante toda la temporada, lo que conduce a una mayor precisión de la entrada de cultivos y la sostenibilidad. Los endogámicos para estos estudios de campo (designados como la generación F₄* en la FIG. 5) se hicieron mediante la autofecundación de plantas F₃ que tenían los mismos 10 eventos que avanzaron como GSS en F₄ y generaciones posteriores, y los híbridos para estos estudios de campo se hicieron cruzando plantas F₃ que tenían los mismos 10 eventos con otras cuatro líneas de élite (EL1–4) que carecían del transgén para producir plantas de progenie F₁* (el "*" pretende distinguir las generaciones F₁ y F₄ para la escisión del marcador y la generación de semillas estándar de oro; las plantas F₃ que comprendían cada uno de los eventos y las plantas de control isogénicas que carecían de cualquier evento transgénico se designaron cada una como línea de élite 0 o EL0 en los cruces híbridos).

[161] En años consecutivos, las plantas transgénicas que comprendían cada uno de los 10 eventos seleccionados para GSS, incluido el evento de maíz ZM_BCS216090 y otros 9 eventos (designados Eventos 2–9), se probaron en el campo en 34 ubicaciones en ensayos de rendimiento agronómico en estados del medio oeste de EE. UU. En comparación con las plantas de control no transformadas, las plantas híbridas que incluían el evento de maíz ZM_BCS216090 demostraron rendimientos constantes, una altura de planta reducida y una mayor resistencia al acame, y las plantas endogámicas que incluían el evento de maíz ZM_BCS216090 mostraron una altura de planta reducida y una floración constante.

[162] Las medidas de rendimiento se calcularon ajustando la humedad y se expresaron como bushels por acre (bu/acre). La altura de la planta se mide como la distancia en pulgadas (pul) desde la línea del suelo hasta el cuello de la hoja bandera. La altura de la mazorca se mide como la distancia en pulgadas entre la línea del suelo y el nódulo primario de la mazorca. Las mediciones de acame se expresan como el porcentaje de plantas con una parcela inclinada 30 grados o más desde la perpendicular. El cincuenta por ciento (50 %) de desprendimiento de polen y el cincuenta por ciento (50 %) de maduración se expresaron como días después de la siembra (DAP, por sus siglas en inglés).

[163] La Tabla 8 muestra el rendimiento y las características agronómicas medidas para híbridos del evento de maíz ZM_BCS216090. La Tabla 9 muestra las características agronómicas medidas para endogámicos del evento de maíz ZM_BCS216090 producidos por autofecundación de la línea EL0 transformada. Las líneas endogámicas que contenían el evento ZM_BCS216090 o cada uno de los Eventos 2–9 se compararon con el control no transformado de la línea EL0 autocruzada, y las líneas híbridas que contenían el evento ZM_BCS216090 o cada uno de los Eventos 2–9 y que se cruzaron con cada EL1–EL4 se compararon con los híbridos de control no transformados del mismo cruce. La media de medidas y el error típico (SE) se informan en las tablas.

Tabla 8. Rendimiento y características agronómicas para híbridos del evento ZM_BCS216090 en relación con controles no transgénicos en el año uno de la prueba de campo.

	Altura de la planta (cm) (pul)		Altura de la mazorca (cm) (pul)		Rendimiento (kg/ha) (bu/acre)		Acame de raíz, %	
	Media	SE	Media	SE	Media	SE	Media	SE
ZM_BCS216090 EL0 x EL1	161,31 63,51	3,17 1,25	63,11 24,85	1,95 0,77	16171,19 240,46	412,25 6,13	4,20	8,17
ZM_BCS216090 EL0 x EL2	159,61 62,84	3,17 1,25	67,91 26,74	1,95 0,77	15743,48 234,10	414,27 6,16	10,47	8,20
ZM_BCS216090 EL0 x EL3	156,56 61,64	3,17 1,25	63,70 25,08	1,95 0,77	16183,30 240,64	413,59 6,15	12,18	8,17
ZM_BCS216090 EL0 x EL4	158,21 62,29	3,17 1,25	63,01 24,81	1,95 0,77	16467,10 244,86	411,58 6,12	12,64	8,17

Evento 2 EL0 x EL1	159,53 62,81	3,17 1,25	62,66 24,67	1,95 0,77	15780,46 234,65	412,95 6,14	2,88	8,20
Evento 2 EL0 x EL2	156,92 61,78	3,17 1,25	66,59 26,22	1,95 0,77	15388,39 228,82	412,95 6,14	9,82	8,17
Evento 2 EL0 x EL3	154,33 60,76	3,17 1,25	64,54 25,41	1,95 0,77	15895,46 236,36	412,25 6,13	10,00	8,17
Evento 2 EL0 x EL4	156,13 61,47	3,17 1,25	62,99 24,80	1,95 0,77	15822,16 235,27	412,95 6,14	12,30	8,20
Evento 3 EL0 x EL1	158,80 62,52	3,17 1,25	61,51 24,22	1,95 0,77	15802,66 234,98	412,95 6,14	0,98	8,20
Evento 3 EL0 x EL2	155,75 61,32	3,17 1,25	67,05 26,40	1,95 0,77	15562,57 231,41	412,95 6,14	7,04	8,17
Evento 3 EL0 x EL3	152,22 59,93	3,17 1,25	62,05 24,43	1,95 0,77	15934,47 236,94	413,59 6,15	9,62	8,25
Evento 3 EL0 x EL4	154,71 60,91	3,17 1,25	62,81 24,73	1,95 0,77	16120,08 239,70	412,25 6,13	13,29	8,20
Evento 4 EL0 x EL1	157,22 61,90	3,17 1,25	60,62 23,87	1,95 0,77	15637,89 232,53	411,58 6,12	1,54	8,20
Evento 4 EL0 x EL2	153,87 60,58	3,17 1,25	65,17 25,66	1,95 0,77	15349,38 228,24	412,95 6,14	5,50	8,17
Evento 4 EL0 x EL3	148,74 58,56	3,17 1,25	61,39 24,17	1,95 0,77	15647,31 232,67	412,95 6,14	7,96	8,17
Evento 4 EL0 x EL4	154,00 60,63	3,17 1,25	61,41 24,18	1,95 0,77	15845,70 235,62	412,95 6,14	10,80	8,20
Evento 5 EL0 x EL1	159,63 62,85	3,17 1,25	62,76 24,71	1,95 0,77	15890,76 236,29	410,90 6,11	2,84	8,17
Evento 5 EL0 x EL2	154,68 60,90	3,17 1,25	65,86 25,93	1,95 0,77	15319,12 227,79	412,25 6,13	7,07	8,17
Evento 5 EL0 x EL3	151,76 59,75	3,17 1,25	62,61 24,65	1,95 0,77	16066,95 238,91	412,95 6,14	10,81	8,17
Evento 5 EL0 x EL4	155,21 61,11	3,17 1,25	62,78 24,72	1,95 0,77	15960,02 237,32	411,58 6,12	12,67	8,20

Evento 6 EL0 x EL1	159,00 62,60	3,17 1,25	62,83 24,74	1,95 0,77	15845,02 235,61	412,95 6,14	3,14	8,17
Evento 6 EL0 x EL2	156,97 61,80	3,17 1,25	66,54 26,20	1,95 0,77	15195,38 225,95	412,25 6,13	8,07	8,17
Evento 6 EL0 x EL3	151,89 59,80	3,17 1,25	62,81 24,73	1,95 0,77	15884,70 236,20	412,25 6,13	7,44	8,17
Evento 6 EL0 x EL4	154,50 60,83	3,17 1,25	63,06 24,83	1,95 0,77	16045,43 238,59	412,95 6,14	10,01	8,20
Evento 7 EL0 x EL1	160,02 63,00	3,17 1,25	61,39 24,17	1,95 0,77	15748,86 234,18	412,95 6,14	2,31	8,17
Evento 7 EL0 x EL2	156,23 61,51	3,17 1,25	66,01 25,99	1,95 0,77	15189,33 225,86	412,95 6,14	9,60	8,17
Evento 7 EL0 x EL3	153,36 60,38	3,17 1,25	62,73 24,70	1,95 0,77	19042,14 238,15	412,25 6,13	12,23	8,17
Evento 7 EL0 x EL4	155,98 61,41	3,17 1,25	64,18 25,27	1,95 0,77	15961,37 237,34	412,25 6,13	12,99	8,20
Evento 8 EL0 x EL1	158,57 62,43	3,17 1,25	62,45 24,59	1,95 0,77	16124,79 239,77	412,95 6,14	2,98	8,20
Evento 8 EL0 x EL2	157,40 61,97	3,17 1,25	66,77 26,29	1,95 0,77	15556,52 231,32	412,25 6,13	6,33	8,17
Evento 8 EL0 x EL3	152,32 59,97	3,17 1,25	62,28 24,52	1,95 0,77	15972,80 237,51	412,95 6,14	9,86	8,20
Evento 8 EL0 x EL4	156,00 61,42	3,17 1,25	62,76 24,71	1,95 0,77	16190,02 240,74	412,25 6,13	13,82	8,17
Evento 9 EL0 x EL1	155,06 62,05	3,17 1,25	60,17 23,69	1,95 0,77	15565,93 231,46	412,95 6,14	4,03	8,17
Evento 9 EL0 x EL2	156,03 61,43	3,17 1,25	66,77 26,29	1,95 0,77	15424,71 229,36	413,59 6,15	8,47	8,20
Evento 9 EL0 x EL3	153,67 60,50	3,17 1,25	62,76 24,71	1,95 0,77	16005,08 237,99	411,58 6,12	7,92	8,20
Evento 9 EL0 x EL4	154,45 60,81	3,17 1,25	62,78 24,72	1,95 0,77	15986,92 237,72	413,59 6,15	10,16	8,20

Control EL0 x EL1	242,51 95,48	3,14 1,24	112,42 44,26	1,87 0,74	15509,44 230,62	400,82 5,96	9,50	8,01
Control EL0 x EL2	245,82 96,78	3,14 1,24	118,82 46,78	1,87 0,74	15327,86 227,92	401,49 5,97	11,76	8,00
Control EL0 x EL3	235,81 92,84	3,14 1,24	110,97 43,69	1,87 0,74	15598,21 231,94	401,49 5,97	18,15	8,00
Control EL0 x EL4	250,41 98,59	3,14 1,24	118,51 46,66	1,87 0,74	15795,26 234,87	400,82 5,96	26,48	8,01

Tabla 9. Características agronómicas para endogámicos del evento ZM_BCS216090 en relación con controles no transgénicos en el año uno.

	Altura de la planta (cm) (pul)		Altura de la mazorca (pul)		50 % Desprendimiento de polen (DAP)		50 % Maduración (DAP)	
	Media	SE	Media	SE	Media	SE	Media	SE
ZM_BCS216090	155,37 61,17	7,79 3,07	50,59 19,92	2,36 0,93	64,10	3,70	64,60	3,45
Evento 2	150,69 59,33	7,79 3,07	51,00 20,08	2,36 0,93	64,50	3,70	64,70	3,45
Evento 3	146,71 57,76	7,84 3,09	46,55 18,33	2,36 0,93	63,20	3,70	63,60	3,45
Evento 4	146,05 57,50	7,79 3,07	46,99 18,50	2,36 0,93	63,60	3,70	64,00	3,45
Evento 5	149,63 58,91	7,87 3,10	50,36 19,83	2,54 1,00	63,70	3,70	64,40	3,45
Evento 6	150,92 59,42	7,79 3,07	48,69 19,17	2,36 0,93	63,80	3,70	64,70	3,45
Evento 7	151,68 59,72	7,84 3,09	47,14 18,56	2,46 0,97	63,80	3,70	64,70	3,45
Evento 8	148,38 58,42	7,79 3,07	47,62 18,75	2,36 0,93	64,00	3,70	64,30	3,45
Evento 9	145,61	7,79	45,28	2,36	63,20	3,70	63,50	3,45

	57,33	3,07	17,83	0,93				
Control	211,63	7,54	83,51	1,77	63,77	3,69	64,77	3,44
	83,32	2,97	32,88	0,70				

[164] Como se puede ver en la Tabla 8, las medidas de rendimiento fueron relativamente iguales o mejores para los híbridos del evento de maíz ZM_BCS216090 en relación con los controles respectivos, y la altura de la planta, la altura de la mazorca y el acame se redujeron en relación con los controles híbridos respectivos. Los aumentos en el rendimiento de los híbridos que comprendían el evento de maíz ZM_BCS216090 en comparación con los controles respectivos pueden deberse a la reducción del acame de las raíces. Además, la Tabla 9 demuestra que el momento del 50 % de desprendimiento de polen y el 50 % de maduración son relativamente similares para las plantas endogámicas que comprenden el evento de maíz ZM_BCS216090 en comparación con las plantas de control endogámicas, y la altura de la planta y la altura de la mazorca se reducen en relación con el control endogámico.

[165] Durante el año siguiente de pruebas, se realizaron ensayos de campo con híbridos que comprendían el evento de maíz ZM_BCS216090 y los otros 9 eventos (Eventos 2–9) en comparación con controles híbridos no transformados. La Tabla 10 muestra que el rendimiento de los híbridos del evento de maíz ZM_BCS216090 fue generalmente similar o mejor que los rendimientos observados en las plantas de control, mientras que la altura de la planta, la altura de la mazorca y el acame de las raíces disminuyeron en las plantas que comprendían el evento ZM_BCS216090 en comparación con los controles respectivos. Una disminución en el acame de raíces puede explicar, al menos en parte, cualquier mejora en el rendimiento observada en las plantas que comprendían el evento ZM_BCS216090 en comparación con las plantas de control.

Tabla 10. Rendimiento y características agronómicas para híbridos del evento ZM_BCS216090 en relación con controles no transgénicos (año dos de la temporada de cultivo).

	Altura de la planta (cm) (pul)		Altura de la mazorca (cm) (pul)		Rendimiento (kg/ha) (bu/acre)		Acame de raíz, %	
	Media	SE	Media	SE	Media	SE	Media	SE

ZM_BCS216090 x EL1	169,39 66,69	3,55 1,40	66,72 26,27	1,90 0,75	14784,48 219,84	410,23 6,10	13,11	13,38
ZM_BCS216090 x EL2	170,33 67,06	3,55 1,40	70,61 27,80	1,90 0,75	14701,08 218,60	411,58 6,12	17,25	13,41
ZM_BCS216090 x EL3	164,38 64,72	3,55 1,40	64,56 25,42	1,90 0,75	14695,03 218,51	412,25 6,13	21,00	13,38
ZM_BCS216090 x EL4	173,25 68,21	3,55 1,40	65,88 25,94	1,90 0,75	15330,55 227,96	412,92 6,14	10,16	13,38
Control EL0 x EL1	252,32 99,34	3,55 1,40	115,59 45,51	1,90 0,75	14510,09 215,76	413,59 6,15	31,68	12,85
Control EL0 x EL2	256,33 100,92	3,55 1,40	123,59 48,66	1,90 0,75	14482,52 215,35	415,61 6,18	42,32	12,87
Control EL0 x EL3	243,78 95,98	3,55 1,40	114,17 44,95	1,90 0,75	14317,08 212,89	416,28 6,19	45,53	12,85
Control EL0 x EL4	261,89 103,11	3,55 1,40	122,37 48,18	1,90 0,75	14524,21 215,97	413,59 6,15	40,46	12,85

[166] Para resumir las observaciones de dos años consecutivos de ensayos de campo, las plantas que comprenden el evento de maíz ZM_BCS216090 demuestran un rendimiento de híbridos similar o mejor, una floración de endogámicos similar, y una altura y un acame de la planta reducidos en comparación con los controles no transformados.