

“POLINUCLEÓTIDOS, CEBADORES Y MÉTODOS PARA DETECCIÓN DE EVENTOS TRANSGÉNICOS, CONSTRUCCIÓN GENÉTICA, KIT PARA DETECCIÓN DE MATERIAL A PARTIR DE UNA MUESTRA DE PLANTA, EVENTO CTC91087-6, PLANTA DE CAÑA DE AZÚCAR RESISTENTE A INSECTOS Y MÉTODO PARA PRODUCIR UNA PLANTA DE CAÑA DE AZÚCAR RESISTENTE A INSECTOS, CÉLULA DE PLANTA, PARTE DE PLANTA O SEMILLA”.

Campo Técnico

[1] La presente invención se refiere al campo de la biotecnología. Más específicamente, se describe una construcción genética y un método para producir un evento vegetal transgénico, especialmente un evento de la caña de azúcar (*Saccharum spp.*), que expresa la toxina Cry1Ac que confiere resistencia a la infestación por la plaga *Diatraea saccharalis*, conocida popularmente como barrenador común, barrenador de la caña o simplemente barrenador. La invención describe un método para detectar el evento y el material derivado del evento resistente a la infestación del barrenador de la caña, así como polinucleótidos, cebadores, sondas y las regiones flanqueantes que identifican tal evento.

Antecedentes

[2] La caña de azúcar (*Saccharum spp.*) es una hierba perteneciente a la familia botánica Poaceae, originaria del sudeste asiático, más precisamente de la gran región central de Nueva Guinea e Indonesia. Es una de las especies vegetales más importantes que se cultivan en las regiones tropicales y subtropicales, con una superficie de más de 23 millones de hectáreas repartidas en 121 países (Anuario estadístico de la FAO 2012 p. 233).

[3] La caña de azúcar es una fuente de materia prima para la producción de azúcar, vino, melaza, ron, *cachaça* (destilado nacional de Brasil) y etanol como combustible. El bagazo que se produce después de la molienda de la caña de azúcar se puede utilizar para empacar, suministrar energía térmica, procesar en molinos, producir electricidad (que generalmente se vende a la red eléctrica del consumidor) o como materia prima para la producción de etanol de segunda generación de caña de azúcar. (BR 11 2014 02385-1). Así, la agroindustria de la caña de azúcar tiene una gran importancia económica y social al generar millones de puestos de trabajo en la zona y fomentar divisas a través de la comercialización de azúcar y etanol y el uso sostenible y óptimo de la biomasa vegetal.

[4] Más recientemente, con el advenimiento del calentamiento global y el subsecuente deseo de alternativas a los combustibles fósiles (biocombustibles), el interés mundial por la caña de azúcar ha aumentado significativamente. El uso de etanol a base de caña de azúcar como fuente de energía renovable se ha considerado extremadamente importante para reducir los gases de efecto invernadero y la dependencia de combustibles fósiles, por lo que es un elemento clave en los esfuerzos por controlar el cambio climático global (Savage, 2011).

[5] Debido a la importancia económica y social de la caña de azúcar, una cantidad creciente de investigación se ha dirigido a definir las mejores prácticas agrícolas para su cultivo y mejorar la calidad de las variedades cultivadas. Los esfuerzos para mejorar las características agronómicas de la caña de azúcar se han centrado en aumentar la producción y acumulación de azúcar, aumentar la tolerancia al estrés biótico y abiótico, la resistencia y tolerancia a plagas y patógenos, y desarrollar tecnologías alternativas para la producción de etanol de caña de azúcar a partir de biomasa lignocelulósica (PI 0802153-8; PI 0904538-4; PI 1101295-1).

[6] La complejidad del genoma poliploide y aneuploide de las variedades modernas de caña de azúcar, junto con su base genética relativamente restringida y baja fertilidad, imponen grandes dificultades y numerosas limitaciones en la selección de plantas con características agronómicas deseables mediante el mejoramiento genético convencional (Souza y col., 2011; D´Hont & Glaszmann, 2005, Basel, v. 109, no. 1-3, p. 27-33; Cheavegatti-Gianotto y col., 2011). Por lo tanto, los altos costos de producción, la necesidad de mano de obra y los plazos prolongados entre el producto y el mercado pueden impedir que la industria de la caña de azúcar satisfaga las crecientes demandas del mercado mundial.

[7] Debido a las limitaciones de los métodos convencionales de mejoramiento genético y la creciente necesidad de incorporar rápida y eficientemente rasgos deseables, el uso de la ingeniería genética (biotecnología) en los programas de mejoramiento de la caña de azúcar ha ganado prominencia, en particular debido al éxito comercial de incorporar rasgos agronómicos deseables a través de la ingeniería genética en otras especies de plantas (soja, maíz, raps, remolacha y algodón, por ejemplo).

[8] La ingeniería genética vegetal implica la transferencia de genes de interés a las células vegetales (transformación genética) de tal manera que una progenie fértil y agronómicamente superior mantenga y exprese de manera estable el gen responsable del rasgo deseado.

[9] A pesar del potencial de alteración genética de la caña de azúcar (incorporación de características deseables) por ingeniería genética [resistencia a virus (Guo y col., 2015; Zhu y col., 2011), insectos (Kalunke, Kolge, Babu, & Prasad, 2009; Weng y col., 2011) al., 2011), herbicidas (Enríquez-Obregon, Vazquez-Padron, Prieto-Samsonov, De la Riva y Selman-Housein, 1998; van der Vyver, Conradie, Kossmann y Lloyd, 2013), tolerancia a la sequía (Molinari y col., 2007; Reis y col., 2014), salinidad (Kumar, Uzma, Khan, Abbas, & Ali, 2014) y toxicidad del aluminio (Ribeiro, 2016), aumento de la producción y acumulación de azúcar (Bewg, Poovaiah, Lan, Ralph, & Coleman, 2016; Mudge y col., 2013)], este enfoque está limitado por las características intrínsecas de la caña de azúcar. A diferencia del maíz, el arroz, el trigo y otros cereales comerciales, la caña de azúcar presenta dificultades en la propagación del cultivo de tejidos, bajas tasas de inducción y regeneración de callos embriogénicos y la imposibilidad de utilizar el embrión cigótico como tejido diana en la transformación genética [(Anderson & Birch, 2012; Basnayake, Moyle y Birch, 2011; Molinari y col., 2007)]. Con frecuencia se observan bajas tasas de eficiencia de transformación y alta variabilidad entre los genotipos de la caña de azúcar, y aún quedan numerosos desafíos por superar para incorporar con éxito rasgos agronómicos deseables en la caña de azúcar mediante la ingeniería genética.

[10] La caña de azúcar es considerada una especie recalcitrante para la transformación genética, y aunque se han evaluado varios enfoques de ingeniería genética para esta especie, aún no existen protocolos estándar que garanticen la producción de eventos transgénicos (Smith et col. 1992; Rathius & Birch 1992.; Chen y col. 1987; Arencibia 1998; Manickavasagam y col. 2004; Elliott y col. 1998).

[11] Además de las limitaciones inherentes a las especies que impiden la aplicación de las técnicas de ingeniería genética existentes, la complejidad del genoma de la caña de azúcar (alto nivel de ploidía y aneuploidía) evita la introgresión de rasgos en cultivares específicos mediante retrocruzamiento (reconstitución de un genotipo específico), como se realiza comúnmente en otros cultivos de interés comercial.

[12] La complejidad genotípica de las especies también impacta significativamente en la caracterización de los eventos generados con el fin de asegurar las características necesarias para su comercialización. La identificación inequívoca de eventos transgénicos es fundamental para asegurar su trazabilidad y seguimiento, que es un requisito normativo para su comercialización. La alta poliploidía del genoma de la caña de azúcar y el elevado número de regiones repetidas,

sumado a la falta de información sobre su organización y estructura, dificultan aún más la caracterización de los eventos transgénicos generados.

[13] Hay varios desafíos técnicos que deben superarse en el campo del mejoramiento de la caña de azúcar para aumentar la predictibilidad de los resultados, incluso cuando se aplican técnicas convencionales y / o moleculares / genéticas ampliamente conocidas. A pesar de todos los desafíos técnicos para obtener variedades de caña de azúcar más productivas, no cabe duda de la urgencia de obtener variedades mejoradas que tengan características que impacten significativamente en la productividad de los cultivos y por ende en su mercado.

[14] Históricamente, las plagas agrícolas son uno de los principales factores que provocan pérdidas en la agricultura. En Brasil, la principal plaga de la caña de azúcar es la especie *Diatraea saccharalis* (descrita por primera vez por Fabricius en 1794), conocida popularmente como barrenador común, barrenador de la caña o simplemente barrenador. Es miembro de la familia *Crambidae* y del orden *Lepidoptera*. El barrenador se encuentra prácticamente en todos los lugares donde se desarrolla el cultivo, un área de aproximadamente 10 millones de hectáreas para la Temporada de Cosecha 2019/20 (CONAB, 2019).

[15] Después del apareamiento, la hembra del barrenador de la caña de azúcar pone de 200 a 400 huevos distribuidos a ambos lados de las hojas y de las vainas de las hojas. Después de la eclosión, las larvas recién nacidas se alimentan del parénquima foliar y migran a la región de la vaina en busca de refugio. Permanecen en esta región de 7 a 10 días, alimentándose raspando la vaina foliar o la corteza de los entrenudos jóvenes. Después de una ecdisis, las orugas perforan el tallo y penetran en el interior. El insecto crea túneles dentro del tallo, generalmente hacia arriba mientras se alimenta. Dentro del culmo, la oruga atraviesa aproximadamente seis ecdisis antes de convertirse en un adulto alado (DINARDO-MIRANDA, 2014). Esta es la etapa de desarrollo del insecto que causa daño económico al cultivo (Figura 1).

[16] El ataque del barrenador de la caña de azúcar también causa graves daños secundarios a la calidad de la materia prima utilizada para la producción de azúcar y alcohol, debido a que la perforación del tallo de la caña de azúcar por el barrenador crea condiciones favorables para la entrada de hongos y bacterias oportunistas, especialmente *Fusarium moniliform* y *Colletotrichum falcatum*, causando pudrición roja (Figura 2). Las bacterias asociadas con la materia prima de la pudrición roja producen fermentaciones indeseables, lo que da como resultado productos

ajenos a la fermentación alcohólica industrial. Además, estas bacterias también producen ácidos orgánicos y gomas (dextranos) a partir de los azúcares contenidos en el mosto, que afectan negativamente la viabilidad de las células de levadura, requiriendo su reposición en reactores de fermentación (Prececti y Terán 1983; 5 Prececti y col., 1988; BOTELHO y MACEDO, 2002). Otro problema que surge de la presencia de bacterias en los reactores de fermentación es la posibilidad de que se produzca la floculación de la levadura. En este caso, las bacterias contaminantes forman un mucílago que agrega las células de levadura, provocando su floculación. Finalmente, las plantas atacadas por el complejo barrenador / pudrición roja también 10 tienen altos niveles de compuestos fenólicos (METCALF y LUCKMANN, 1994; PRICE, 1997).

[17] Asumiendo un Índice de Infección por Infestación por barrenador del 4% (típico de los campos de caña de azúcar brasileños), pérdidas agrícolas promedio y costos de control de plagas, se estima que el barrenador causa pérdidas económicas 15 de más de R \$ 5 mil millones anuales a las industrias productoras de azúcar y etanol.

[18] El barrenador de la caña de azúcar es difícil de controlar con insecticidas químicos debido al comportamiento de alimentación de la larva en el tallo, lo que evita que el insecticida entre en contacto eficazmente con el insecto. Como alternativa a los insecticidas químicos, las proteínas insecticidas, identificadas principalmente a partir 20 de la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt), se han utilizado para controlar plagas agrícolas, incluida *Diatraea* sp. Entre las proteínas insecticidas derivadas de cepas de Bt, las proteínas cristalinas Cry destacan por su toxicidad específica para las larvas de especies de lepidópteros, dípteros y coleópteros comunes. Estas proteínas, producidas como protoxinas (65-149 KDa), se solubilizan y activan en el intestino de 25 insectos susceptibles por proteólisis y se unen a la membrana celular intestinal, induciendo la lisis osmótica del epitelio, lo que provoca la muerte del insecto.

[19] Las proteínas Cry se clasifican en varios grupos según la homología de secuencia, entre ellas, el grupo proteico clasificado como Cry1 presenta alta especificidad contra insectos lepidópteros, lo que la convierte en una excelente 30 candidata para su introducción en el germoplasma de la caña de azúcar para producir variedades resistentes al barrenador de la caña de azúcar. La expresión heteróloga de proteínas Cry1 en variedades de caña de azúcar, aunque desafiante, tiene un gran potencial para el control del barrenador de la caña de azúcar, reduciendo las pérdidas económicas para la industria de la caña de azúcar, así como la liberación de 35 insecticidas químicos en el medio ambiente.

[20] Por lo tanto, sigue siendo necesario desarrollar estrategias para mitigar el daño causado a los cultivos de caña de azúcar por la infestación de plagas, especialmente por la infestación por la plaga del barrenador de la caña de azúcar. Al ofrecer a los productores de caña de azúcar variedades con alto potencial de rendimiento y atributos de resistencia a los barrenadores, la biotecnología agrícola hace una contribución importante a la industria de la caña de azúcar y a los productores de caña de azúcar brasileños.

Formas de Realización

[21] En una primera forma de realización, la invención proporciona polinucleótidos que identifican de forma inequívoca el evento CTC91087-6.

[22] La invención también identifica pares de cebadores y sondas capaces de identificar polinucleótidos que caracterizan el evento CTC91087-6.

[23] En una tercera forma de realización, la invención proporciona métodos para detectar material vegetal derivado del evento CTC91087-6.

[24] Otra forma de realización de la invención define un kit para detectar la presencia del evento CTC91087-6 en una muestra de material vegetal.

[25] La quinta forma de realización de la presente invención es una construcción genética capaz de impartir a una planta de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) resistencia a la infestación por insectos, particularmente por la plaga *Diatraea saccharalis*.

[26] Además, la invención proporciona una caña de azúcar modificada genéticamente, una parte de la planta, una célula vegetal, un tejido vegetal o una semilla que comprende la construcción genética de interés ubicada en un sitio definido en el genoma de la planta de caña de azúcar transformada, caracterizada por secuencias flanqueantes específicas.

[27] La séptima forma de realización de la presente invención es proporcionar un producto básico.

[28] La octava forma de realización de la presente invención es un método para producir una planta resistente a insectos.

[29] Finalmente, las formas de realización novena y décima de la invención son para proporcionar un método para hacer y cultivar una planta de caña de azúcar resistente a insectos y / o célula vegetal, parte de planta o semilla.

Sumario de la Invención

[30] La primera forma de realización se logra proporcionando polinucleótidos que comprenden al menos 14 a 26 nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 5, la SEC ID Nro.: 12, la SEC ID Nro.: 13, la SEC ID nro.: 18, la SEC ID nro.: 19, y la SEC ID nro.: 22.

[31] La segunda forma de realización de la invención se logra proporcionando pares de cebadores en los que el cebador directo consiste de la SEC ID nro.: 6 y el cebador inverso consiste de la SEC ID nro.: 7 y / o el cebador directo consiste de la SEC ID nro.: 8 y el cebador inverso es la SEC ID nro.: 9.

[32] La tercera forma de realización se logra mediante un método de detección de material vegetal derivado del evento CTC91087-6 que comprende las etapas de:

- a) a) obtención de una muestra para análisis;
- b) b) extraer ADN de la muestra;
- 15 c) c) proporcionar pares de cebadores que comprenden al menos un cebador directo y uno inverso;
- d) d) amplificar una región entre el par de cebadores; y detectar la presencia de un producto por amplificación.

[33] Además, para lograr la tercera forma de realización, los pares de cebadores en la etapa c) se diseñan para unirse a un polinucleótido que comprende nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 22, y la SEC ID nro.: 29, en el que al menos un par de cebadores comprende nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 23, la SEC ID nro.: 24, la SEC ID nro.: 30, y la SEC ID nro.: 31.

[34] Aún para lograr la tercera forma de realización, la presente invención describe un método para detectar material vegetal derivado del evento CTC91087-6 que comprende las etapas de:

- a) a) obtener una muestra de material vegetal para su análisis;
- b) b) extraer ADN o ARN de la muestra;
- 30 c) c) proporcionar una sonda diseñada para unirse al complemento de un polinucleótido que comprende al menos 14 nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 18, la SEC ID nro.: 19, la SEC ID nro.: 32, y la SEC ID nro.: 33;

- d) d) hibridar dicha sonda con la muestra; y
- e) e) detectar la hibridación real de la sonda.

[35] La cuarta forma de realización de la invención se evidencia mediante un kit para detectar la presencia del evento CTC91087-6 en una muestra de planta, comprendiendo el kit un medio para detectar la presencia de un polinucleótido que comprende, al menos, 14 nucleótidos contiguos de la SEC ID nro.: 18, y/o de la SEC ID nro.: 19 y / o una proteína de cristal pesticida (Cry).

[36] La quinta forma de realización se logra proporcionando una construcción genética que comprende la SEC ID nro.: 1.

[37] La sexta forma de realización se logra a través de una planta de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) modificada genéticamente, una parte de la planta, una célula vegetal, un tejido vegetal o una semilla que comprende la SEC ID nro.: 18, o la SEC ID nro.: 19.

[38] La séptima forma de realización se logra proporcionando un producto básico producido a partir de la caña de azúcar modificada genéticamente de la presente invención.

[39] La octava forma de realización se logra mediante un método para producir una planta resistente a insectos que comprende la SEC ID nro.: 20, y la SEC ID nro.: 21.

[40] La novena forma de realización de la presente invención proporciona un método para generar una planta de caña de azúcar resistente a insectos que comprende introducir una modificación genética en una planta de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) que comprende la SEC ID nro.: 5, o la SEC ID nro.: 22 para producir una planta de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) modificada genéticamente del evento CTC91087-6.

[41] Finalmente, la décima forma de realización de la invención describe un método para cultivar una planta de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) modificada genéticamente del evento CTC91087-6, que comprende el cultivo de una planta de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) modificada genéticamente del evento CTC91087-6 que comprende la SEC ID nro.: 5, o la SEC ID nro.: 22 en condiciones que comprenden infestación de insectos.

Breve Descripción de las Figuras

[42] La Figura 1 ejemplifica el daño a los tallos de la caña de azúcar causado por *D. saccharalis* (barrenador de la caña de azúcar).

[43] La Figura 2 ejemplifica el complejo de la pudrición roja del barrenador debido al ataque de *D. saccharalis* (barrenador de la caña).

5 [44] La figura 3 representa el mapa del ADN-T introducido en el evento de la presente invención.

[45] La Figura 4 representa el plásmido usado como base para construir el plásmido usado en la presente invención.

10 [46] La Figura 5 representa el plásmido resultante utilizado para obtener el evento de interés.

[47] La Figura 6 es el gráfico de la amplificación de qPCR mediante Taqman® (fluorescencia relativa x ciclo) para el evento de interés.

15 [48] La Figura 7 es la curva de fusión de qPCR a través de SYBR GREEN™ (fluorescencia relativa x temperatura) para el evento de interés. Las flechas indican el pico de amplificación específico del evento de interés a una temperatura de 83,5° C y el pico inespecífico presentado por algunas muestras, así como las indicaciones basales de no amplificación para los otros eventos negativos y controles.

20 [49] La Figura 8 es el resultado de la comparación de los promedios de expresión de la proteína Cry1Ac en hojas del evento de la invención durante el ciclo de cultivo de la caña de azúcar. Análisis combinado para Barrinha, Piracicaba y Valparaíso (SP), Camamu-BA y Quirinópolis-GO. Las barras seguidas de la misma letra no difieren según la prueba de Tukey al nivel de probabilidad del 5%.

25 [50] La Figura 9 es el resultado de la comparación de los promedios de la expresión de Cry1Ac en hojas del evento de la invención en caña de azúcar a 60 y 120 DAP y luego a 240 y 300 DAP. Análisis combinado para Barrinha-SP, Piracicaba-SP, Quirinópolis-GO y Valparaíso-SP. Las barras seguidas de la misma letra no difieren según la prueba de Tukey al nivel de probabilidad del 5%.

[51] La Figura 10 es el resultado de la comparación de los promedios de la expresión de Cry1Ac en los tallos del evento de la invención a 330 DAP.

30 [52] La Figura 11 es el resultado de la comparación de los promedios de expresión de la proteína Pat en hojas del evento de la invención durante el ciclo de cultivo de la caña de azúcar. Análisis combinado para las localidades de Barrinha,

Piracicaba y Valparaíso (SP), Camamu (BA) y Quirinópolis (GO). Las barras seguidas de la misma letra no difieren según la prueba de Tukey al nivel de probabilidad del 5%.

[53] La Figura 12 es el resultado de la comparación de los promedios de la expresión de la proteína Pat en hojas del evento de la invención en caña de azúcar a 60 y 120 DAP y luego a 240 y 300 DAP. Análisis combinado para Barrinha-SP, Piracicaba-SP, Quirinópolis-GO y Valparaíso-SP. Las barras seguidas de la misma letra no difieren según la prueba de Tukey al nivel de probabilidad del 5%.

[54] La Figura 13 es el resultado de la comparación de los promedios de la expresión de la proteína Pat en los tallos del evento de la invención a 330 DAP en los ensayos PACE.

[55] La Figura 14 es el resultado de la metodología Western Blot para identificar la proteína Cry1Ac. M: marcador de peso molecular (kDa). R1 y R2: Evento de la Invención CN: cultivo parental. CP1: 50 ng de proteína Cry1Ac purificada, diluida en proteínas totales del cultivo parental. CP2: 5 ng de proteína Cry1Ac comercial diluida en tampón PBST. CP3: Maíz Bt11. CP4: Evento de caña de azúcar transgénica que expresa proteína Cry1Ac.

[56] La Figura 15 es el resultado de la metodología Western Blot para la identificación de Pat. Proteína M: marcador de peso molecular (kDa). R1, R2 y R3: repeticiones biológicas del evento de la invención. CP1 (control positivo 1): 1ng de proteína de barra diluida en proteína total extraída del cultivo parental. CP2 (control positivo 2): 1ng de barra de proteína diluida en tampón PBST.

[57] La Figura 16 representa la Intensidad de Infestación natural (II%) de *Diatraea saccharalis* en ensayos de campo en diferentes localidades (Piracicaba (SP), Barrinha (SP), Valparaíso (SP) y Quirinópolis (GO)). CTC91087-6: evento de la invención; 9001 TC: Cultivar parental con tratamiento de cultivo de tejidos; 9001 WT: Cultivar parental regular. El eje x representa el porcentaje de intensidad de la infestación (II%; análisis combinado - 4 localidades).

[58] La Figura 17 muestra resultados de ejemplificación del tamaño y desarrollo de las larvas después de siete días de alimentación en el ensayo de disco de hoja. A la izquierda (A) se encuentran larvas de ejemplificación que fueron alimentadas con material vegetal del evento CTC91087-6 resistente a insectos, y a la derecha (B) están larvas de ejemplificación que fueron alimentadas con material vegetal de la variedad convencional (parental - no transgénica) CTC9001.

[59] La Figura 18 muestra los resultados de los bioensayos de invernadero de malla fina / mosquitero (screenhouse) entre CTC91087-6 y su contraparte convencional CTC9001 (variedad parental - no transgénica). A la izquierda, I) muestra imágenes de ejemplificación de daño visible causado por *D. saccharalis* en A: tallo de CTC91087-6 y B: tallo de CTC9001a. El gráfico en I) muestra los resultados del daño del tallo (% de daño) en el invernadero de malla fina. A la derecha, II) muestra los resultados de Intensidad de Infestación (%) en el invernadero de malla fina.

[60] La Figura 19 muestra ejemplos de casetes para la generación del evento CTC91087-6 a través del enfoque de edición de genes. El casete A comprende un Cas9 optimizado con codón de caña de azúcar impulsado por el promotor pZmUbi y el terminador T-35s; El Casete B comprende crRNA para Cas9 impulsado por el promotor U3 de trigo y el Casete C comprende la plantilla HR que comprende la región 9001BADN-T-T con brazos homólogos de 1 kb para la integración dirigida al sitio.

[61] La Figura 20 representa un ejemplo de una construcción de edición de genes que comprende Cas 9 y casetes de crRNA.

[62] La Figura 21 muestra un ejemplo de una construcción de edición de genes que comprende la plantilla HR que comprende la región de ADN 9001BT-T con brazos homólogos de 1 kb para la integración dirigida al sitio.

[63] La Figura 22 representa una construcción de edición de genes que comprende todos los casetes para la generación del evento CTC91087-6: un codón optimizado Cas9 impulsado por el promotor pZmUbi y el terminador T-35s; un crRNA para Cas9 impulsado por el promotor de trigo U3 y la plantilla HR que comprende la región 9001BADN-T-T con brazos homólogos de 1 kb para la integración dirigida al sitio.

Descripción Detallada de la Invención

[64] Primero, el término "evento" se refiere a la planta transgénica producida mediante transformación genética que expresa de manera estable el rasgo deseado conferido por el transgén introducido. Más particularmente, en el presente caso, se considera que el término "evento" es la planta transgénica, preferiblemente una planta transgénica de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) que, después de la modificación genética, expresa la característica de resistencia a plagas, particularmente resistencia a la plaga *Diatraea saccharalis* (barrenador de la caña de azúcar). En una forma de realización preferida, la caña de azúcar transgénica producida mediante la

transformación genética se denomina "CTC91087-6" y puede denominarse alternativamente como "evento CTC91087-6".

[65] Además, para fines de referencia, a menos que se indique expresamente lo contrario, "región LB" significa el borde izquierdo (orilla) de la transferencia de ADN-T (5'), y "región RB" significa el borde derecho (orilla) de la transferencia de ADN-T (3').

[66] Además, todas las secuencias biológicas descritas en este documento, excepto que se indique explícitamente lo contrario, abarcan secuencias que tienen al menos 80%, preferiblemente 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% de identidad con las secuencias descritas.

[67] Finalmente, "material vegetal" significa cualquiera y todos los tejidos vegetales o derivados del mismo, tales como, pero sin limitarse a, semillas, tallos, tallos, hojas, pajitas, corteza, raíces, células, moléculas de origen vegetal, entre otros. Además, "material vegetal" puede incluir cualquier producto de una planta o derivado de la misma, por ejemplo, pero sin limitarse a, savia, azúcar, etanol, entre otros.

[68] La tecnología del ADN recombinante ha permitido el aislamiento de genes y su inserción estable en el genoma del huésped. Esta técnica, también llamada transformación genética, puede definirse como la introducción controlada de ácidos nucleicos ("ADN" o ADN) en un genoma receptor, excluida la introducción por fertilización. Es un proceso controlado en el que un fragmento de ADN definido se introduce en el genoma del huésped (o receptor) y debe integrarse en él. La inserción estable de estas moléculas en el genoma de un huésped da lugar a un individuo con el genoma igual o sustancialmente igual al receptor (huésped) de la molécula recombinante, pero con una característica nueva y particular. "Sustancialmente igual" significa un genoma con más del 80%, preferiblemente 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% de identidad en relación con el receptor.

[69] Existen varias técnicas de transformación genética vegetal agrupadas en dos categorías principales: transferencia genética indirecta y directa. La transferencia indirecta se produce cuando el ADN exógeno se inserta en el genoma por la acción de un vector biológico, mientras que la transferencia directa se basa en procesos físico-bioquímicos.

[70] Se podrían utilizar diferentes tejidos y / o células según la técnica de transformación genética y según la especie o genotipos a transformar. Generalmente, estos tejidos o células incluyen, sin limitación, callo embriogénico, callo, protoplastos,

embriones, embriones somáticos, tejidos meristemáticos, y cualquier otra parte, tejido o célula vegetales con capacidad regenerativa.

[71] La transformación indirecta se basa en el sistema mediado por bacterias del género *Agrobacterium* y ha sido el método más extensamente utilizado para la obtención de plantas transgénicas. Las ventajas de este método incluyen la capacidad de transferir segmentos de ADN relativamente largos sin reordenamiento mientras se mantiene la integración del número de copias bajo de los transgenes, asegurando así una mayor estabilidad genotípica para los eventos generados. Se han desarrollado y adaptado varias especies y cepas de *Agrobacterium*, plásmidos y protocolos para la transformación genética de varias especies de plantas. Las ventajas de estos métodos incluyen mayores probabilidades de eventos de copia única, integración estable y herencia genética de los rasgos genéticos introducidos, así como expresión génica constante a través de generaciones y tasas más bajas de silenciamiento de genes.

[72] *Agrobacterium tumefaciens* y *A. rhizogenes* son bacterias fitopatógenas gramnegativas del suelo pertenecientes a la familia *Rhizobiaceae* que causan enfermedades en las dicotiledóneas, conocidas como agallas de la corona y de la raíz pilosa, respectivamente. En esta interacción planta-patógeno hay un proceso de transferencia genética natural entre la agrobacteria y la célula vegetal en el que se transfieren fragmentos de ADN bacteriano a la célula vegetal (ADN-T), integrándose con el genoma nuclear. En su forma natural, la bacteria transfiere ADN-T ("ADN transferido"), que es parte del plásmido bacteriano llamado Ti ("inductor de tumores") y se integra en el genoma de las células vegetales infectadas. El fragmento de ADN-T que se transfiere a la célula vegetal está compuesto por genes implicados en la biosíntesis constitutiva de fitohormonas (auxinas y citoquininas), que alteran el programa de desarrollo normal del tejido infectado y provocan la formación de tumores. Además, también contiene oncogenes para la síntesis de azúcares y aminoácidos llamados 'opines', que sirven como fuentes de carbono y nitrógeno para las bacterias (Oger y col. 1997). Los extremos repetidos de 25 pares de bases (pb) en los bordes derecho e izquierdo delimitan el ADN-T y son esenciales para su transferencia. Los compuestos fenólicos liberados por los tejidos vegetales lesionados activan regiones específicas (regiones vir), iniciando el proceso de transferencia de ADN-T a la célula vegetal. *Agrobacterium* también tiene genes cromosómicos (chv) que promueven la unión entre las células bacterianas y huésped, lo que permite la formación del paso de los poros del complejo que contiene ADN-T (Sheng & Citovsky. 1996).

[73] Dado que el segmento a transferir está definido por sus bordes, cualquier secuencia flanqueada por los bordes puede transferirse a una planta mediante

agrobacterias, lo que permite manipular estas secuencias para transferir secuencias codificantes de interés. La sustitución o delección de las regiones codificantes del ADN-T de tipo salvaje (oncogenes) permite la generación de cepas de *Agrobacterium* no oncogénicas (desarmadas), que pueden portar las secuencias de interés. El ADN-T modificado es capaz de transferir las secuencias de interés a las plantas porque los genes de virulencia (región vir) permanecen intactos.

[74] Además, el sistema de transformación indirecta de *Agrobacterium* permite la transferencia de construcciones de plásmidos artificiales a las plantas siempre que las construcciones contengan tales bordes de ADN-T, lo que permite la flexibilidad de utilizar herramientas moleculares y materiales desarrollados para otras cepas bacterianas.

[75] Estas construcciones de plásmidos artificiales tienen promotores de diferentes orígenes, como, por ejemplo, promotores de plantas, promotores virales, promotores bacterianos y / o quiméricos, además de genes que confieren resistencia a antibióticos, resistencia o tolerancia a herbicidas o actividad enzimática (fosfomanosa isomerasa (PMI) / manosa (Man)), por lo que estos marcadores se pueden utilizar para la selección de células o plantas transformadas.

[76] Estas construcciones también pueden contener genes auxiliares que interfieren con las vías de señalización de morfogénesis relevantes, mejorando la eficiencia del proceso de transformación genética y la regeneración de tejidos vegetales. Incluido, sin limitaciones, LEAFY COTYLEDON1 (Lotan y col., 1998), Lec1 (Lowe y col., 2002), LEAFY COTYLEDON2 (Stone y col., 2001), WUSCHEL (WUS; Zuo y col., 2002), y BABY BOOM (BBM; Boutilier y col., 2002), entre otros.

[77] En un primer aspecto de la presente invención, el ADN extraño o exógeno que se va a introducir en la planta se clona en un plásmido binario entre las secuencias consenso del borde izquierdo y derecho (ADN-T). El plásmido binario se transfiere a una célula de *Agrobacterium*, que posteriormente se utiliza para infectar tejido vegetal. La región de ADN-T del vector que comprende el ADN exógeno se inserta en el genoma de la planta. El casete de expresión del gen marcador y el casete de expresión del gen característico pueden estar presentes en la misma región de ADN-T, en diferentes regiones de ADN-T en el mismo plásmido, o en diferentes regiones de ADN-T en diferentes plásmidos. En una forma de realización de la presente invención, los casetes están presentes en la misma región que el ADN-T. Un experto en la técnica está familiarizado con los métodos de transformación indirecta por *Agrobacterium*.

[78] Alternativamente, se puede utilizar la transferencia directa de ADN para introducir ADN directamente en una célula vegetal. Un método de transferencia directa de ADN es bombardear células vegetales con un vector que comprende ADN para su inserción usando una pistola de partículas (transformación biolística mediada por partículas). Otros métodos para la transformación de células vegetales incluyen la transformación de protoplastos (opcionalmente en presencia de polietilenglicoles); tratamiento por ultrasonidos de tejidos, células o protoplastos vegetales en un medio que comprende el polinucleótido o el vector; microinyección del polinucleótido o vector en material vegetal; microinyección, infiltración al vacío, sonicación, uso de carburo de silicio, transformación química con PEG, electroporación de células vegetales y similares. Entre las desventajas de la transformación directa se encuentran los desafíos relacionados con la regeneración del tejido vegetal y la baja expresión transgénica.

[79] Además, la transformación genética podría realizarse mediante inserción directa en el sitio mediante recombinación homóloga mediada por nucleasas (edición del genoma). En los últimos años, la tecnología de edición del genoma basada en el uso de nucleasas modificadas o quiméricas ha permitido la generación de organismos modificados genéticamente de una manera más precisa y específica. La introducción de genes exógenos o extraños se produce por recombinación homóloga mediante la introducción de una plantilla de Recombinación Homóloga (HR) que tiene el ADN exógeno unido a un fragmento de ADN homólogo al genoma del organismo receptor. Entre las herramientas disponibles se encuentran el sistema enzimático quimérico CRISPR (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas, regularmente espaciadas) - Cas, las nucleasas con dedos de Zinc (ZFN) y las nucleasas efectoras TAL (TALEN). Los sistemas Crispr-Cas son sistemas enzimáticos que comprenden dos componentes principales: una endonucleasa (Cas) y un ARN guía (ARN de guía única - ARNsg; una guía para el sitio de escisión específico de la endonucleasa Cas). El ARN guía también puede comprender dos componentes: un ARN Crispr (ARNcr): una secuencia de 17-20 mer complementaria a secuencias genómicas de ADN específicas y, opcionalmente, de un ARN tracr. La escisión específica realizada por la endonucleasa y la guía por el sgRNA se repararía mediante recombinación homóloga, insertando específicamente el ADN exógeno flanqueado por las secuencias homólogas en el sitio de escisión. La introducción de este sistema enzimático en la célula podría ocurrir de varias formas, utilizando plásmidos, mediante transformación directa o indirecta, o utilizando portadores como proteínas y otros agentes químicos. La expresión de los componentes del sistema se produciría de forma transitoria o estable, utilizando la maquinaria celular del organismo receptor o realizándose de

forma exógena, in vitro, entregando a la célula o tejido diana todos los componentes listos para usar (endonucleasas + sgRNA, transcrito in vitro y combinado antes de la entrega celular). La descripción aquí presentada no es exhaustiva y no debe limitar el uso de diferentes variaciones, sistemas y métodos de edición del genoma en el alcance de la presente invención, conocidos en el Estado de la Técnica e incluso los que aún no se han descubierto.

[80] Después de la transformación, las plantas transgénicas se regeneran a partir del tejido vegetal transformado y la progenie que tiene ADN exógeno se puede seleccionar usando un marcador apropiado, tal como kanamicina o resistencia al glufosinato de amonio. Un experto en la técnica está familiarizado con la composición de medios de regeneración adecuados.

[81] Alternativamente, podrían aplicarse otros métodos de selección, sin la inserción de ningún marcador genético en el genoma del huésped (organismo receptor) como se describió anteriormente.

[82] En una forma de realización preferida, la transformación genética está mediada por una bacteria del género *Agrobacterium*.

[83] En una forma de realización aún más preferida, la transformación genética está mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

[84] El evento CTC91087-6 exhibe un nuevo genotipo que comprende dos casetes de expresión. El primer casete de expresión comprende un promotor adecuado para la expresión vegetal unido operativamente a un gen que codifica una toxina insecticida Cry1Ac útil para controlar plagas de insectos lepidópteros y una señal de poliadenilación adecuada. El segundo casete de expresión comprende un promotor adecuado para la expresión vegetal operativamente unido a un gen que codifica una proteína usada como marcador selectivo para obtener el evento de la presente invención.

[85] Los promotores adecuados para la expresión de plantas pueden aislarse de plantas o de otros organismos. Se han aislado o desarrollado varios promotores que incluyen promotores constitutivos, promotores de activación y desactivación y promotores que responden a tensiones abióticas específicas de tejido, entre otros. Muchos de estos promotores tienen secuencias intrónicas descritas como relevantes para la expresión génica adecuada. En un aspecto preferido de la invención, los promotores son promotores constitutivos y pueden seleccionarse del grupo no limitante que consiste en CaMV 35S, CoYMV (virus del moteado amarillo de

Commelina), FMV 35S, Ubiquitina, Promotor de arroz de actina (Act-1), Act -2, promotor de nopalina sintasa (NOS), promotor de octopina sintasa (OCS), promotor de alcohol deshidrogenasa de maíz (Adh-1), PvUbi1, entre otros.

5 [86] En una forma de realización de la invención, el promotor es el promotor del gen de ubiquitina de maíz (pUBI). En una forma de realización aún más preferida, el promotor de ubiquitina de maíz contiene un intrón en la secuencia 5' del ARN líder.

[87] La región promotora de la presente invención (UBI-1) tiene 1992 pares de bases que se subdividen en: fragmento promotor (899 bases), primer exón del gen de poliubiquitina-1 (83 bases) y primer intrón (1.010 bases).

10 [88] Elementos adicionales como secuencias potenciadoras y transportadoras (transportadores) también pueden incorporarse en el casete de expresión con el propósito de mejorar los niveles de expresión génica, por ejemplo, potenciadores transcripcionales o de traducción como potenciadores CaMV 35S, FMV 35S, Nos, supP, entre otros.

15 [89] Las secuencias de terminador también se contemplan en el casete de expresión. Ejemplos de señales de poliadenilación de plantas adecuadas y funcionales incluyen las del gen de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens* (nos), el gen del inhibidor de proteinasa II rbcS (subunidad pequeña de ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa de guisante), Lhcb1 (proteínas de unión a clorofila a / b del tabaco).), CaMV 35S, octopina sintasa, gen de la alfa-tubulina, entre otros.

20

[90] En una forma de realización de la presente invención, la señal de poliadenilación es la derivada del gen de nopalina sintasa (nos) de *Agrobacterium tumefaciens*.

[91] Preferiblemente, la expresión de los genes cry1Ac y bar está regulada por el promotor del gen de ubiquitina del maíz, UBI-1 (que tiene un intrón endógeno). Ambos casetes de expresión utilizan el terminador de nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens* - NOS.

25

[92] El gen cry1Ac codifica una toxina de 615 aminoácidos con un peso molecular estimado de 68 kDa, procedente de *Bacillus thuringiensis serovar kустaki* (cepa HD73), que confiere resistencia a *Diatraea saccharalis* (barrenador de la caña). La presente invención contempla modificaciones génicas para la expresión del núcleo tróptico activo de la proteína Cry1Ac nativa únicamente. Por tanto, en una forma de realización preferida de la presente invención, el polinucleótido que codifica la proteína

30

Cry1Ac está truncado y codifica el núcleo del insecticida tríptico 52 kDa. En una forma de realización más preferida, la proteína Cry1Ac es la SEC ID nro. 34. La presente invención también contempla secuencias que tienen al menos 80%, preferiblemente 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% de identidad con la SEC ID nro.: 34. El núcleo tríptico es responsable de la actividad insecticida de la proteína, al unirse a proteínas específicas del intestino del insecto, lo que provoca la alteración de la integridad funcional y anatómica de este órgano. La ingestión de la proteína Cry1Ac por parte del insecto objetivo provoca una absorción de nutrientes alterada, lo que conduce a una rápida toxicidad y posterior muerte del insecto.

[93] Según la invención, el polinucleótido que codifica la proteína Cry1Ac puede tener codones optimizados (o alterados de otro modo) para mejorar la expresión en material vegetal. Tal optimización de codones puede usarse para alterar la estructura secundaria predicha del producto de transcripción de ARN producido en cualquier célula transformada o para destruir los elementos de inestabilidad de ARN crípticos presentes en el producto de transcripción inalterado, mejorando así la estabilidad y / o disponibilidad del producto de transcripción en la célula transformada.

[94] Preferiblemente, el gen cry1Ac presente en el evento de la invención corresponde a una secuencia de ADN sintético truncado optimizado con codones de caña de azúcar preferidos. En un aspecto aún más preferido de la presente invención, el gen cry1Ac tiene la secuencia SEC ID nro.: 20. La invención también contempla secuencias que tienen al menos 80%, preferiblemente 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% de identidad con la SEC ID nro.: 20.

[95] Ya se han caracterizado varios genes marcadores para la selección de eventos de plantas, incluidos algunos que confieren tolerancia a los antibióticos y otros que confieren resistencia a los herbicidas. Los ejemplos de genes marcadores que pueden seleccionarse para su uso en la presente invención incluyen aquellos que confieren resistencia o tolerancia a higromicina, kanamicina, gentamicina, glifosato, glufosinato de amonio o resistencia a toxinas tales como eutipina. También se encuentran disponibles otras formas de selección como los sistemas de selección basados en hormonas, selección visual a través de la expresión de proteínas fluorescentes, manosa isomerasa, xilosa isomerasa, entre otras. En una forma de realización de la presente invención, el gen marcador de selección de eventos es uno que confiere tolerancia al glufosinato de amonio.

[96] En una forma de realización preferida de la invención, el gen marcador usado en el segundo casete de expresión es el gen de resistencia al bialafos (bar),

que codifica la enzima fosfinotricina acetiltransferasa (Pat) de 183 aminoácidos que tiene un peso molecular estimado de 22 kDa. En un aspecto aún más preferido de la presente invención, el gen bar tiene la secuencia SEC ID nro.: 21. La fosfinotricina acetiltransferasa confiere resistencia al herbicida glufosinato de amonio, que se utilizó en el proceso de selección inicial de transformantes. El gen bar usado como marcador selectivo para obtener el evento de la presente invención se deriva de *Streptomyces hygroscopicus*. La proteína PAT también se puede expresar a partir del gen pat de *Streptomyces viridochromogenes*.

[97] El uso de genes marcadores de selección, como el gen bar, es esencial para seleccionar células transformadas durante el proceso de transformación (HORSCH y col., 1985). El propósito de la inserción del gen bar en el evento de la presente invención fue, por tanto, la selección de células transformadas con el gen cry1Ac. En particular, se eligió este gen porque el herbicida glufosinato de amonio no se usa para el control de malezas en el cultivo de caña de azúcar y no puede usarse en el manejo del evento de la invención en condiciones de campo.

[98] Además de los casetes de expresión descritos, también pueden usarse casetes de expresión adicionales en el evento CTC91087-6.

[99] Los casetes de expresión primero y segundo comprendidos en el evento de CTC91087-6 pueden introducirse en la planta en el mismo plásmido o en plásmidos diferentes. Si los casetes de expresión primero y segundo están ubicados en el mismo plásmido y se introducen en la planta mediante un método de transformación mediado por *Agrobacterium*, pueden estar presentes dentro de la misma o diferentes regiones de ADN-T. En una forma de realización de la presente invención, el primer y segundo casetes de expresión están presentes en la misma región que el ADN-T.

[100] Más particularmente, el evento de la presente invención se obtuvo mediante transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* con una construcción genética que comprende un fragmento de ADN (ADN-T) que contiene los casetes de expresión del gen cry1Ac y bar. Preferiblemente, la construcción genética de la presente invención comprende el nucleótido de secuencia SEC ID nro.: 1.

[101] El evento de la presente invención se obtuvo mediante transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* que contenía el fragmento de ADN-T como se definió anteriormente (SEC ID nro.: 1).

[102] Este fragmento de ADN-T se insertó en un plásmido binario que contiene en su espectro de hospedadores las bacterias *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens*. Los elementos genéticos específicos y los orígenes de los componentes del plásmido binario original de la presente invención se muestran en la Figura 4. El plásmido binario que comprende la construcción de la presente invención se representa en la Figura 5.

[103] En una forma de realización preferida, la construcción genética de la presente invención comprende la secuencia SEC ID nro.: 14.

[104] Dicha construcción se transfiere a una cepa de *Agrobacterium tumefaciens* (vector) mediante técnicas conocidas por un experto en la técnica, tales como electroporación o choque térmico, entre otras.

[105] En una forma de realización aún más preferida, el vector es una cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens*.

[106] Se describe además un método para producir el evento de interés. En una realización preferida, dicho método comprende las etapas de:

- a) a) introducir una construcción genética en una cepa de *Agrobacterium*;
- b) b) obtención de callos embriogénicos a partir de rollos de hojas inmaduras o tallos superiores de caña de azúcar (*Saccharum spp.*);
- c) c) co-cultivo de callos embriogénicos con un cultivo de *Agrobacterium*;
- d) d) seleccionar células transformadas que contienen el fragmento funcional en medio de cultivo que contiene glufosinato de amonio; y
- e) e) regeneración de plantas de caña de azúcar transformadas.

[107] En una forma de realización, la etapa a) del método de producción de una planta de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) modificada genéticamente del evento CTC91087-6 comprende la introducción de una construcción genética que comprende la SEC ID nro.: 20, y la SEC ID nro.: 21 en una cepa de *Agrobacterium*. Además, la etapa e) de dicho método comprende regenerar plantas de caña de azúcar transformadas, en donde las plantas de caña de azúcar modificadas genéticamente comprenden la SEC ID nro.: 20, y la SEC ID nro.: 21. La invención también contempla una parte de la planta, una célula vegetal, un tejido vegetal o una semilla de las plantas de caña de azúcar modificadas genéticamente producidas por el método descrito en el presente documento.

[108] Los expertos en la técnica están familiarizados con la composición de medios de cultivo adecuados para la generación de callos embriogénicos (etapa b),

así como con los medios de las etapas de co-cultivo (etapa c: co-cultivo + reposo), selección (etapa d) y regeneración (etapa e; regeneración + alargamiento). Preferiblemente, los medios de cultivo usados se basan en composiciones que comprenden ingredientes tales como sales MS (Murashige y Skoog, 1962), sacarosa y vitaminas B5. Opcionalmente, también se puede añadir lo siguiente: aminoácidos seleccionados del grupo que comprende prolina y asparagina; hidrolizado de caseína; ácido cítrico; manitol; sulfato de cobre; glicina; agente gelificante; auxinas; antibióticos acetosiringona; y agentes de selección. El uso de auxinas es especialmente importante en la generación, co-cultivo y selección de callos embriogénicos, así como glufosinato de amonio en el medio de selección.

[109] La etapa de "co-cultivo" se refiere a la incubación de tejido vegetal que ha sido infectado o puesto en contacto con *Agrobacterium* para permitir la transferencia del ADN-T de *Agrobacterium* a las células vegetales. Esta etapa corresponde al período desde el momento inmediatamente posterior a la inoculación (contacto de *Agrobacterium* con tejido vegetal) hasta el momento en que se elimina o inactiva la bacteria.

[110] El tejido inoculado puede co-cultivarse durante aproximadamente 1 a 30 días, preferiblemente de 1 a 20 días, o más preferiblemente de 1 a 10 días.

[111] Durante la etapa de co-cultivo, la temperatura puede ser cualquier temperatura adecuada conocida en la técnica para la planta objetivo. De manera ilustrativa, para la caña de azúcar, la temperatura puede oscilar entre aproximadamente 15° C y aproximadamente 30° C y entre aproximadamente 16° C y aproximadamente 29° C. En algunas formas de realización, la etapa de co-cultivo se produce en ausencia de luz.

[112] Después del co-cultivo con *Agrobacterium*, el medio se retira y las células se transfieren a un medio de cultivo que carece de *Agrobacterium*. A continuación, las células se incuban en la oscuridad a una temperatura entre aproximadamente 20° C y aproximadamente 26° C durante un período de 1 a 20 días.

[113] El método proporcionado en el presente documento incluye además seleccionar células que comprenden al menos una copia de la secuencia genética de interés. "Seleccionar", como se usa en este documento, significa la situación en la que se usa un agente selectivo para transformantes, en donde dicho agente selectivo permitirá el crecimiento preferencial de células vegetales que contienen al menos una copia del gen marcador posicionado dentro del ADN-T. Considerando que, aquellas células que no fueron transformadas no contendrán el gen marcador que permite la

supervivencia en el agente selectivo. Como se indicó anteriormente, se puede usar cualquier marcador de selección adecuado. Preferiblemente, el gen marcador de selección utilizado es el gen bar, que codifica una enzima que confiere resistencia al glufosinato de amonio.

- 5 [114] En algunas formas de realización, también se agrega un agente que inhibe el crecimiento de *Agrobacterium*.

10 [115] La selección puede ocurrir en condiciones de luz u oscuridad, dependiendo de la especie de planta que se está transformando y del genotipo, por ejemplo. En algunos casos, el callo embriogénico u otros tejidos en transformación pueden subcultivarse a intervalos regulares o irregulares en el mismo medio. En el caso de la transformación de callos, los callos individuales pueden mantenerse separados para asegurar que solo una planta sea regenerada por cada callo (asegurando así que todas las plantas regeneradas se deriven de eventos de transformación independientes). En una forma de realización preferida, la etapa de selección se produce en la oscuridad utilizando glufosinato de amonio como agente de selección durante aproximadamente 1 a 10 semanas. Más preferiblemente, el paso de selección ocurre durante aproximadamente 2 a 5 semanas.

20 [116] Después del período de selección, el tejido vegetal que ha seguido creciendo en presencia del agente de selección y, por lo tanto, ha sido modificado genéticamente, puede manipularse y regenerarse colocándolo en medios de cultivo y condiciones de crecimiento adecuados. Las plantas transgénicas así obtenidas se pueden analizar para determinar la presencia del ADN de interés. Para el propósito de esta invención, el término "regenerar" se refiere a la formación de una planta que comprende tanto una parte aérea como raíces. Las plantas regeneradas se pueden plantar en un sustrato adecuado (como suelo) y transferirse al invernadero de malla fina. Como se usa en el presente documento, "modificado genéticamente" o "transgénico" o "transformado de manera estable" significa una célula vegetal, parte de la planta, tejido vegetal o planta que comprende una secuencia de ADN de interés que se introduce en su genoma por transformación.

- 30 [117] En una forma de realización, la bacteria es del género *Agrobacterium*.

 [118] En una forma de realización más preferida, la bacteria es *Agrobacterium tumefaciens*.

 [119] En una forma de realización aún más preferida, la bacteria es una cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens*.

[120] La presente invención también se refiere a la caracterización del evento seleccionado (CTC91087-6) y métodos para detectar material vegetal derivado del mismo. Los métodos analíticos para la detección y caracterización de plantas transgénicas incluyen métodos indirectos (métodos de detección basados en proteínas) o métodos directos (métodos de detección basados en ADN).

[121] La definición del sitio de integración estable del ADN-T en el genoma de la célula huésped y la caracterización de sus secuencias flanqueantes es necesaria para el desarrollo y validación de metodologías para la identificación y caracterización inequívoca del evento.

[122] Para identificar las regiones flanqueantes en los extremos del inserto de ADN-T en el evento CTC91087-6, se realizaron varios experimentos de secuenciación y amplificación de ADN. Se realizaron ensayos de PCR inversa (iPCR) en ambos extremos del ADN-T para aislar y clonar las regiones flanqueantes del inserto. Posteriormente, los fragmentos obtenidos y aislados fueron secuenciados mediante el método de Sanger para validar los resultados obtenidos por iPCR. El mapa de inserción genética presente en el evento CTC91087-6 resultante de los datos generados por estos experimentos se muestra en la Figura 3 y la SEC ID nro.: 2. Las secuencias flanqueantes del evento CTC91087-6 se muestran en la SEC ID nro.: 23, y la SEC ID nro.: 24.

[123] Según un aspecto de la invención, se proporciona un polinucleótido que comprende al menos 14 nucleótidos contiguos de la secuencia de 26 nucleótidos de la SEC ID nro.: 18. En una forma de realización, se proporciona un polinucleótido que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de la secuencia de 26 nucleótidos de la SEC ID nro.: 18. En una forma de realización, se proporciona un polinucleótido que comprende al menos 16 nucleótidos contiguos de los 26 nucleótidos de la SEC ID nro.: 18. En una forma de realización, dicho polinucleótido comprende al menos 17 nucleótidos contiguos de los 26 nucleótidos de la SEC ID nro.: 18. En una forma de realización, dicho polinucleótido comprende al menos 18 nucleótidos contiguos de la secuencia de 26 nucleótidos de la SEC ID nro.: 18. En una forma de realización, dicho polinucleótido comprende al menos 19 nucleótidos contiguos de la secuencia de 26 nucleótidos de la SEC ID nro.: 18. En una forma de realización, dicho polinucleótido comprende al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia de 26 nucleótidos de la SEC ID nro.: 18. En una forma de realización, dicho polinucleótido comprende al menos 21 nucleótidos contiguos de la secuencia de 26 nucleótidos de la SEC ID nro.: 18. En una forma de realización, dicho polinucleótido comprende al menos 22 nucleótidos contiguos de la secuencia de 26 nucleótidos de la SEC ID nro.: 18. En una

forma de realización, dicho polinucleótido comprende al menos 23 nucleótidos contiguos de la secuencia de 26 nucleótidos de la SEC ID nro.: 18. En una forma de realización, dicho polinucleótido comprende al menos 24 nucleótidos contiguos de la secuencia de 26 nucleótidos de la SEC ID nro.: 18. En una forma de realización, dicho polinucleótido comprende al menos 25 nucleótidos contiguos de la secuencia de 26 nucleótidos de la SEC ID nro.: 18. En una forma de realización, dicho polinucleótido comprende la SEC ID NO: 18. En otro aspecto de la invención, dicho polinucleótido comprende la SEC ID nro.: 13.

[124] Según un aspecto de la invención, se proporciona un polinucleótido que comprende al menos 14 nucleótidos contiguos de la secuencia de 26 nucleótidos de SEC ID nro. 19. En una forma de realización, se proporciona un polinucleótido que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de la secuencia de 26 nucleótidos de SEC ID nro. 19. Según un aspecto de la invención, se proporciona un polinucleótido que comprende al menos 16 nucleótidos contiguos de la secuencia de 26 nucleótidos de SEC ID nro. 19. En una forma de realización, se proporciona un polinucleótido que comprende al menos 17 nucleótidos contiguos de la secuencia de 26 nucleótidos de la SEC ID nro.: 19. En una forma de realización, se proporciona un polinucleótido que comprende al menos 18 nucleótidos contiguos de la secuencia de 26 nucleótidos de la SEC ID nro.: 19. En una forma de realización, se proporciona un polinucleótido que comprende al menos 19 nucleótidos contiguos de la secuencia de 26 nucleótidos de la SEC ID nro.: 19. En una forma de realización, se proporciona un polinucleótido que comprende al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia de 26 nucleótidos de la SEC ID nro.: 19. En una forma de realización, se proporciona un polinucleótido que comprende al menos 21 nucleótidos contiguos de la secuencia de 26 nucleótidos de la SEC ID nro.: 19. En una forma de realización, se proporciona un polinucleótido que comprende al menos 22 nucleótidos contiguos de la secuencia de 26 nucleótidos de la SEC ID nro.: 19. En una forma de realización, se proporciona un polinucleótido que comprende al menos 23 nucleótidos contiguos de la secuencia de 26 nucleótidos de la SEC ID nro.: 19. En una forma de realización, se proporciona un polinucleótido que comprende al menos 24 nucleótidos contiguos de la secuencia de 26 nucleótidos de la SEC ID nro.: 19. De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un polinucleótido que comprende al menos 25 nucleótidos contiguos de la secuencia de 26 nucleótidos de la SEC ID nro.: 19. En una forma de realización, se proporciona un polinucleótido que comprende la SEC ID NO: 19. En un aspecto de la invención, se proporciona un polinucleótido que comprende la SEC ID NO: 12.

[125] En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un polinucleótido que comprende la secuencia de SEC ID nro.: 5. En otro aspecto más de la invención, se proporciona un polinucleótido que comprende la secuencia SEC ID nro.: 22.

5 [126] Según un aspecto de la invención, se proporciona una planta que comprende al menos 14 nucleótidos contiguos de la secuencia de 26 nucleótidos de la SEC ID nro.: 18. En una forma de realización, se proporciona una planta que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de la secuencia de 26 nucleótidos de la SEC ID nro.: 18. Según un aspecto de la invención, se proporciona una planta que
10 comprende al menos 16 nucleótidos contiguos de la secuencia de 26 nucleótidos de la SEC ID nro.: 18. En una forma de realización, se proporciona una planta que comprende al menos 17 nucleótidos contiguos de la secuencia de 26 nucleótidos de la SEC ID nro.: 18. En una forma de realización, se proporciona una planta que comprende al menos 18 nucleótidos contiguos de la secuencia de 26 nucleótidos de
15 la SEC ID nro.: 18. En una forma de realización, se proporciona una planta que comprende al menos 19 nucleótidos contiguos de la secuencia de 26 nucleótidos de la SEC ID nro.: 18. En una forma de realización, se proporciona una planta que comprende al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia de 26 nucleótidos de la SEC ID nro.: 18. En una forma de realización, se proporciona una planta que
20 comprende al menos 21 nucleótidos contiguos de la secuencia de 26 nucleótidos de la SEC ID nro.: 18. En una forma de realización, se proporciona una planta que comprende al menos 22 nucleótidos contiguos de la secuencia de 26 nucleótidos de la SEC ID nro.: 18. En una forma de realización, se proporciona una planta que comprende al menos 23 nucleótidos contiguos de la secuencia de 26 nucleótidos de
25 la SEC ID nro.: 18. En una forma de realización, se proporciona una planta que comprende al menos 24 nucleótidos contiguos de la secuencia de 26 nucleótidos de la SEC ID nro.: 18. En una forma de realización, se proporciona una planta que comprende al menos 25 nucleótidos contiguos de la secuencia de 26 nucleótidos de la SEC ID nro.: 18. En una forma de realización, se proporciona una planta que
30 comprende la SEC ID nro.: 18. En una forma de realización adicional, se proporciona una planta que comprende la SEC ID nro.: 13.

[127] De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona una planta que comprende al menos 14 nucleótidos contiguos de la secuencia de 26 nucleótidos de la SEC ID nro.: 19. En una forma de realización, se proporciona una planta que
35 comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de la secuencia de 26 nucleótidos de la SEC ID nro.: 19. En una forma de realización, se proporciona una planta que

comprende al menos 16 nucleótidos contiguos de la secuencia de 26 nucleótidos de la SEC ID nro.: 19. En una forma de realización, se proporciona una planta que comprende al menos 17 nucleótidos contiguos de la secuencia de 26 nucleótidos de la SEC ID nro.: 19. En una forma de realización, se proporciona una planta que

5 comprende al menos 18 nucleótidos contiguos de la secuencia de 26 nucleótidos de la SEC ID nro.: 19. En una forma de realización, se proporciona una planta que comprende al menos 19 nucleótidos contiguos de la secuencia de 26 nucleótidos de la SEC ID nro.: 19. En una forma de realización, se proporciona una planta que comprende al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia de 26 nucleótidos de

10 la SEC ID nro.: 19. En una forma de realización, se proporciona una planta que comprende al menos 21 nucleótidos contiguos de la secuencia de 26 nucleótidos de la SEC ID nro.: 19. En una forma de realización, se proporciona una planta que comprende al menos 22 nucleótidos contiguos de la secuencia de 26 nucleótidos de la SEC ID nro.: 19. En una forma de realización, se proporciona una planta que

15 comprende al menos 23 nucleótidos contiguos de la secuencia de 26 nucleótidos de la SEC ID nro.: 19. En una forma de realización, se proporciona una planta que comprende al menos 24 nucleótidos contiguos de la secuencia de 26 nucleótidos de la SEC ID nro.: 19. En una forma de realización, se proporciona una planta que comprende al menos 24 nucleótidos contiguos de la secuencia de 26 nucleótidos de

20 la SEC ID nro.: 19. En una forma de realización, se proporciona una planta que comprende al menos 25 nucleótidos contiguos de la secuencia de 26 nucleótidos de la SEC ID nro.: 19. En una forma de realización, se proporciona una planta que comprende la SEC ID NO: 19. En una forma de realización adicional, se proporciona una planta que comprende la SEC ID nro.: 12.

25 [128] En una forma de realización de la presente invención, dicha planta es una planta de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) genéticamente modificada. Además, dicha planta es resistente a insectos y comprende la secuencia SEC ID nro.: 5. Aún en un aspecto adicional, la planta resistente a insectos de la presente invención comprende la SEC ID nro.: 22. En una forma de realización adicional, dicha planta es

30 una planta de caña de azúcar resistente a insectos del evento CTC91087-6 o una planta derivada de la misma.

[129] En un aspecto de la invención, el evento CTC91087-6 es una planta de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) que comprende la SEC ID NO: 5. En un aspecto adicional, el evento CTC91087-6 comprende la SEC ID NO: 22.

35 [130] En otra forma de realización, se proporciona un método específico para la detección e identificación del evento CTC91087-6.

[131] Según la presente invención, se proporciona un método para detectar material vegetal derivado de la caña de azúcar modificada genéticamente del evento CTC91087-6 que comprende las etapas de:

- a) a) obtener una muestra de material vegetal para su análisis;
- 5 b) b) extraer ADN de la muestra;
- c) c) proporcionar pares de cebadores que comprenden al menos un cebador directo y uno inverso;
- d) d) amplificar una región entre los pares de cebadores; y
- e) e) detectar la presencia de un producto a partir de la amplificación.

10 [132] En una forma de realización, los pares de cebadores en la etapa (c) están diseñados para unirse a un polinucleótido que comprende nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 22, y de la SEC ID nro.: 29, en el que al menos un par de cebadores comprende secuencias de nucleótidos contiguas seleccionadas del grupo que consiste de la SEC
15 ID nro.: 23, SEC ID nro.: 24, SEC ID nro.: 30, y SEC ID nro.: 31.

[133] En una forma de realización, los pares de cebadores anteriores en la etapa (c) están diseñados para unirse a un polinucleótido que comprende nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 22, y la SEC ID nro.: 29, donde al menos un par de cebadores comprende al menos 3
20 nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 23, la SEC ID nro.: 24, la SEC ID nro.: 30, y la SEC ID nro.: 31. En una forma de realización, los pares de cebadores están diseñados para unirse a un polinucleótido que comprende al menos 14 nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 22, y la SEC ID nro.: 29, en
25 el que al menos un par de cebadores comprende al menos 7 nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 23, la SEC ID nro.: 24, la SEC ID nro.: 30, y la SEC ID nro.: 31. Además, los pares de cebadores están diseñados para unirse a un polinucleótido que comprende al menos 14 nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC
30 ID nro.: 22, y la SEC ID nro.: 29, en el que al menos un par de cebadores comprende al menos 14 nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 23, la SEC ID nro.: 24, la SEC ID nro.: 30, y la SEC ID nro.: 31.

[134] Además, los pares de cebadores de acuerdo con el método de detección descrito están diseñados para unirse a un polinucleótido que comprende nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 22, y la SEC ID nro.: 29, donde al menos un par de cebadores consiste en un primer
5 cebador que comprende nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 23, la SEC ID nro.: 24, la SEC ID nro.: 30, y la SEC ID nro.: 31 y un segundo cebador que comprende nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 2, y la SEC ID nro.: 36.

[135] En una forma de forma de realización, los pares de cebadores de acuerdo con el método de detección descrito están diseñados para unirse a un polinucleótido que comprende al menos 14 nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 22, y la SEC ID nro.: 29, donde al menos un par de cebadores consiste en un primer cebador que comprende
15 al menos 3 nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 23, la SEC ID nro.: 24, la SEC ID nro.: 30, y la SEC ID nro.: 31 y un segundo cebador que comprende al menos 3 nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 2, y la SEC ID nro.: 36. En una forma de forma de realización adicional, los pares de cebadores están diseñados para unirse a un polinucleótido que comprende al menos 14 nucleótidos contiguos de
20 secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 22, y la SEC ID nro.: 29, donde al menos un par de cebadores consiste en un primer cebador que comprende al menos 7 nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 23, la SEC ID nro.: 24, la SEC ID nro.: 30, y la SEC
25 ID nro.: 31 y un segundo cebador que comprende al menos 7 nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 2, y la SEC ID nro.: 36. Además, pares de cebadores están diseñados para unirse a un polinucleótido que comprende al menos 14 nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 22, y la SEC ID nro.: 29,
30 donde al menos un par de cebadores consiste en un primer cebador que comprende al menos 14 nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 23, la SEC ID nro.: 24, la SEC ID nro.: 30, y la SEC ID nro.: 31 y un segundo cebador que comprende al menos 14 nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 2 y la SEC ID
35 nro.: 36.

[136] En una forma de realización, los pares de cebadores de acuerdo con el método de detección descrito están diseñados para unirse a un polinucleótido que comprende nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 5 y la SEC ID nro.: 37, en el que al menos un par de cebadores comprende nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 3, la SEC ID nro.: 4, la SEC ID nro.: 38, y SEC ID nro.: 39. En una forma de realización, los pares de cebadores de acuerdo con el método de detección descrito están diseñados para unirse a un polinucleótido que comprende al menos 14 nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 5, y la SEC ID nro.: 37, en el que al menos un par de cebadores comprende al menos 3 nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 3, la SEC ID nro.: 4, la SEC ID nro.: 38, y la SEC ID nro.: 39. En una forma de realización, los pares de cebadores están diseñados para unirse a un polinucleótido que comprende al menos 14 nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 5, y la SEC ID nro.: 37, en el que al menos un par de cebadores comprende al menos 7 nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 3, la SEC ID nro.: 4, la SEC ID nro.: 38, y la SEC ID nro.: 39. Además, pares de cebadores están diseñados para unirse a un polinucleótido que comprende al menos 14 nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 5, y la SEC ID nro.: 37, en el que al menos un par de cebadores comprende al menos 14 nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 3, la SEC ID nro.: 4, la SEC ID nro.: 38, y la SEC ID nro.: 39.

[137] En una forma de realización, los pares de cebadores de acuerdo con el método de detección descrito están diseñados para unirse a un polinucleótido que comprende nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 5, y la SEC ID nro.: 37, en el que al menos un par de cebadores consiste en un primer cebador que comprende nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 3, la SEC ID nro.: 4, la SEC ID nro.: 38, y la SEC ID nro.: 39 y un segundo cebador que comprende nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 2, y la SEC ID nro.: 36. En una forma de realización, los pares de cebadores de acuerdo con el método de detección descrito están diseñados para unirse a un polinucleótido que comprende al menos 14 nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 5, y la SEC ID nro.: 37, en el que al menos un par de cebadores consiste en un primer cebador que comprende al

menos 3 nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 3, la SEC ID nro.: 4, la SEC ID nro.: 38, y la SEC ID nro.: 39 y un segundo cebador que comprende al menos 3 nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 2, y la SEC ID nro.: 36. En una forma de realización, los pares de cebadores están diseñados para unirse a un polinucleótido que comprende al menos 14 nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 2, la SEC ID nro.: 5, la SEC ID nro.: 36, y la SEC ID nro.: 37, en el que al menos un par de cebadores consiste en un primer cebador que comprende nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 3, la SEC ID nro.: 4 la SEC ID nro.: 38, y la SEC ID nro.: 39 y un segundo cebador que comprende al menos 7 nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 2, y la SEC ID nro.: 36. Además, pares de cebadores están diseñados para unirse a un polinucleótido que comprende al menos 14 nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 5, y la SEC ID nro.: 37, donde al menos un par de cebadores consiste en un primer cebador que comprende al menos 14 nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 3, la SEC ID nro.: 4, la SEC ID nro.: 38, y la SEC ID nro.: 39 y un segundo cebador que comprende al menos 14 nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 2, y la SEC ID nro.: 36.

[138] Es bien sabido, especialmente para los expertos en la técnica, que la molécula de ADN (o DNA) está formada por dos cadenas (de nucleótidos) que se mantienen juntas mediante puentes de hidrógeno entre las bases de nucleótidos. El emparejamiento se produce según la complementariedad de las bases, siguiendo la regla general de: Adenina con Timina y Citosina con Guanina. Por tanto, aunque la representación de secuencias de nucleótidos se realiza solo para una de las cadenas, su cadena complementaria o secuencia complementaria se incluye dentro del alcance de esta invención y se considera para la definición de cebadores y sondas descritas en el presente documento.

[139] Los métodos para obtener muestras para la extracción de ADN son ampliamente conocidos por los expertos en la técnica e incluyen la recolección de cualquier material vegetal derivado del evento transgénico CTC91087-6 tal como tallos, raíces y hojas. Preferiblemente, las muestras se obtienen de hojas intactas. Los métodos de extracción de ADN vegetal incluyen, sin limitación, aquellos basados en el uso de detergente CTAB (Alianabi y col., 1999), (opcionalmente) seguido de una

purificación adicional de la muestra con cloruro de cesio o acetato de amonio, así como otros métodos disponibles comercialmente.

[140] Los pares de cebadores adecuados para su uso en este método de detección pueden diseñarse utilizando parámetros bien conocidos por los expertos en la técnica de la biología molecular ahora que las SEC ID nro.s: 2, 3, 4, 5, 22, 23, 24, 29, 30, 31, 36, 37, 38 y 39 ya están disponibles. Por ejemplo, uno o ambos cebadores del par pueden diseñarse para que sean específicos de la construcción, específicos del gen de rasgo, específicos del promotor, específicos de la secuencia para la unión entre el ADN insertado y el ADN genómico, y / o específicos de la secuencia flanqueante.

[141] Hay muchos métodos de amplificación que pueden usarse de acuerdo con este aspecto de la invención. Una de las técnicas de amplificación más comunes conocidas por los expertos en la técnica es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El producto de amplificación de una reacción de PCR se puede visualizar tiñendo la cadena de nucleótidos con una etiqueta fluorescente como bromuro de etidio y luego excitándola con luz ultravioleta (normalmente después de la separación por tamaños usando electroforesis en gel de agarosa).

[142] Una forma de realización de la presente invención emplea variaciones del principio de PCR tales como PCR cuantitativa en tiempo real, PCR anidada, PCR inversa (iPCR), PCR digital, PCR larga, PCR Touchdown, PCR Hot Start, PCR Multiplex, entre otras. El producto de amplificación también puede ser detectado por diferentes metodologías que se contemplan en la presente invención, como el sistema SYBR Green™ que emite fluorescencia cuando este reactivo se une a ADN bicatenario y el sistema Taqman® donde la detección se basa en la interacción de fluorescentes sondas. La metodología Taqman® utiliza una sonda que es complementaria al segmento de producto de PCR previsto ubicado entre los cebadores de reacción. Durante la etapa de hibridación del ciclo de PCR, la sonda se une al ADN diana, y durante la extensión de la polimerasa Taq, a través de su actividad 5'-exonucleasa, retira la sonda, liberando el fluorocromo y emitiendo fluorescencia. Realizaciones adicionales de este aspecto de la presente invención incluyen, pero no se limitan a: amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), electroforesis en gel capilar (CGE), tecnología de micromatrices Luminex, "DNA walking" y Next Generation Sequencing (NGS) [Secuenciación de Próxima Generación], método Sanger, Illumina, entre otros.

[143] La presente invención describe una metodología de detección específica basada en la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) conocida como “Más-Menos” o “Presencia - Ausencia”, presentando dos variaciones de la metodología: Tecnología SYBR GREEN [™] y Taqman [®].

5 [144] En una forma de realización de la presente invención, se proporcionan pares de cebadores en los que el cebador directo consiste de la SEC ID nro.: 6 y el cebador inverso consiste de la SEC ID nro.: 7 y / o el cebador directo es la SEC ID nro.: 8 y el cebador inverso es la SEC ID nro.: 9.

10 [145] En una forma de realización adicional, los pares de cebadores usados en la etapa (c) del método de detección de material vegetal a partir de caña de azúcar modificada genéticamente del evento CTC91087- 6 comprenden cebador directo que consta de la SEC ID nro.: 6 y el cebador inverso consiste de la SEC ID nro.: 7 y / o el cebador directo es la SEC ID nro.: 8 y el cebador inverso es la SEC ID nro.: 9. Además, el amplicón (producto de la amplificación) producido por los cebadores de la SEC ID
15 nro.: 6, y la SEC ID nro.: 7 se ve a través de una sonda etiquetada de la SEC ID nro.: 10. Alternativamente, el amplicón producido por los cebadores de la SEC ID nro.: 8, y la SEC ID nro.: 9 se visualiza a través de una sonda marcada de la SEC ID nro.: 11. Por tanto, es un aspecto de la presente invención que la detección del producto a partir de la amplificación, obtenido mediante el uso de cebadores de la SEC ID nro.:
20 6, y SEC ID nro.: 7, e/o SEC ID nro.: 8, y SEC ID nro.: 9 se realiza mediante la hibridación de una sonda que comprende la SEC ID nro.: 10 o SEC ID nro.: 11.

[146] En una forma de realización de la presente invención, la región amplificada por dicho método (el amplicón o producto de la amplificación) tiene una longitud de entre 80 y 1000 pares de bases. En una forma de realización adicional, el
25 amplicón tiene una longitud de entre 100 y 300 pares de bases. En una forma de realización preferida, el amplicón obtenido usando los cebadores de la SEC ID nro.: 6, y SEC ID nro.: 7 tiene una longitud de 117 pares de bases, como se define en la SEC ID nro.: 12. En otra forma de realización preferida, el amplicón obtenido mediante el uso de cebadores de la SEC ID nro.: 8, y SEC ID nro.: 9 tiene 149 pares de bases
30 de longitud, como se define en la SEC ID nro.: 13.

[147] Las Figuras 6 (reacción de detección de eventos específicos de la invención a través de Taqman[®]) y 7 (ensayo SYBR GREEN[™]) representan la validación de ambos métodos.

[148] Los cebadores y las sondas descritos en la presente invención pueden
35 usarse en combinación para detectar el evento CTC91087-6. Por tanto, una forma de

realización adicional de la presente invención implica el uso de PCR multiplex para identificar material vegetal del evento CTC91087-6.

[149] En la invención se incluyen cebadores y sondas alternativos para la detección y caracterización del evento CTC91087-6. Estas y otras variaciones pueden usarse con, pero no se limitan a, cualquiera de los métodos de detección directa descritos anteriormente.

[150] Además, el evento CTC91087-6 se puede detectar a partir de material vegetal hibridando muestras de ADN con las sondas. Específicamente, la presente invención describe un método para detectar material del evento de caña de azúcar modificado genéticamente CTC91087-6 que comprende los pasos de:

- a) obtener una muestra de material vegetal para su análisis;
- b) Extracción de ADN o ARN de la muestra;
- c) proporcionar una sonda diseñada para unirse a un polinucleótido que comprende 14 o más nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 18, la SEC ID nro.: 19, la SEC ID nro.: 32, y la SEC ID nro.: 33, cuando el polinucleótido es monocatenario;
- d) hibridar dicha sonda con la muestra, y
- e) detectar la hibridación real de la sonda.

[151] Según un aspecto de la invención, se proporciona una sonda diseñada para unirse a un polinucleótido que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 18, la SEC ID nro.: 19, la SEC ID nro.: 32, y la SEC ID nro.: 33. En una forma de realización, se proporciona una sonda diseñada para unirse a un polinucleótido que comprende al menos 16 nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 18, la SEC ID nro.: 19, la SEC ID nro.: 32, y la SEC ID nro.: 33. Según un aspecto de la invención, se proporciona una sonda diseñada para unirse a un polinucleótido que comprende al menos 17 nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 18, la SEC ID nro.: 19, la SEC ID nro.: 32, y la SEC ID nro.: 33. En una forma de realización, dicho polinucleótido comprende al menos 18 nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 18, la SEC ID nro.: la 19, la SEC ID nro.: 32, y la SEC ID nro.: 33. En una forma de realización, dicho polinucleótido comprende al menos 19 nucleótidos contiguos de secuencias

seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 18, la SEC ID nro.: 19, la SEC ID nro.: 32, y la SEC ID nro.: 33. En una forma de realización, dicho polinucleótido comprende al menos 19 nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 18, la SEC ID nro.: 19, la SEC ID nro.: 32, y la SEC ID nro.: 33. En una forma de realización, dicho polinucleótido comprende al menos 20 nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 18, la SEC ID nro.: 19, la SEC ID nro.: 32, y la SEC ID nro.: 33. En una forma de realización, dicho polinucleótido comprende al menos 21 nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 18, la SEC ID nro.: 19, la SEC ID nro.: 32, y la SEC ID nro.: 33. En una forma de realización, dicho polinucleótido comprende al menos 22 nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 18, la SEC ID nro.: 19, la SEC ID nro.: 32, y la SEC ID nro.: 33. En una forma de realización, dicho polinucleótido comprende al menos 23 nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 18, la SEC ID nro.: 19, la SEC ID nro.: 32, y la SEC ID nro.: 33. En una forma de realización, dicho polinucleótido comprende al menos 24 nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 18, la SEC ID nro.: 19, la SEC ID nro.: 32, y la SEC ID nro.: 33. Según un aspecto de la invención, se proporciona un polinucleótido que comprende al menos 25 nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 18, la SEC ID nro.: 19, la SEC ID nro.: 32, y la SEC ID nro.: 33. Según un aspecto de la invención, se proporciona un polinucleótido que comprende al menos 26 nucleótidos contiguos de las secuencias del grupo que consta de la SEC ID nro.: 18, la SEC ID nro.: 19, la SEC ID nro.: 32, y la SEC ID nro.: 33.

[152] La sonda puede ser, por ejemplo, un producto de PCR o un fragmento de digestión por restricción. En una forma de realización adicional, la sonda como se describe en el presente documento puede marcarse con un marcador fluorescente, radiactivo, enzimático o de otro tipo adecuado para permitir que se detecte la hibridación. El experto en la técnica sabrá ahora cómo diseñar sondas adecuadas dada la ventaja de la presente divulgación.

[153] En una forma de realización adicional, se proporciona un método de hibridación de sonda para la muestra en condiciones estrictas (alta especificidad). Los expertos en la técnica conocen bien las condiciones de hibridación estrictas. Ejemplos de condiciones estrictas incluyen: hibridación a una temperatura de aproximadamente 65° C en una solución que contiene 6x SSC, 0.01% SDS y 0.25% de leche desnatada

en polvo seguida de lavado a la misma temperatura en una solución que contiene 0.2 x SSC y 0.1% SDS.

[154] Las técnicas adecuadas para detectar material vegetal derivado del evento CTC91087-6 basadas en el principio de hibridación incluyen, pero no se limitan a, Southern Blots e hibridación in situ. Un experto en la materia está familiarizado con tales técnicas.

[155] Normalmente, estas técnicas implican incubar una sonda con una muestra, lavar para eliminar la sonda no unida y detectar si la sonda se ha hibridado. Dicho método de detección depende del tipo de etiqueta adherida a la sonda. Por ejemplo, una sonda radio-marcada se puede detectar mediante la exposición y el revelado de una película de rayos X. Alternativamente, se puede detectar una sonda marcada enzimáticamente convirtiendo un sustrato para efectuar un cambio de color.

[156] Adicionalmente, otro aspecto de la invención contempla un método para detectar material vegetal derivado del evento CTC91087-6, que comprende: obtener una muestra para análisis; proporcionar un anticuerpo diseñado para unirse a una proteína Cry o Pat contenida dentro de una planta que comprende al menos 14 nucleótidos contiguos de la SEC ID nro.: 18, e/o la SEC ID nro.: 19; incubar dicho anticuerpo con la muestra; y detectar si el anticuerpo se une. En una forma de realización de la presente invención, dicha proteína Cry está codificada por la secuencia de nucleótidos de la SEC ID nro.: 20 y dicha proteína Pat está codificada por la secuencia de nucleótidos de la SEC ID nro.: 21. En una forma de realización adicional, dicha proteína Cry comprende la SEC ID nro.: 34 y dicha proteína Pat comprende la SEC ID nro.: 35.

[157] Los métodos adecuados para detectar material vegetal derivado del evento CTC91087-6 basados en dicha unión de anticuerpos incluyen (pero no se limitan a): Western Blots, ELISA (Ensayos Inmunoabsorbentes Ligados a Enzimas) y espectrometría de masas (por ejemplo, desorción / ionización a láser de superficie mejorada (SELDI)). Un experto en la materia está familiarizado con estas técnicas inmunológicas. Las etapas típicas incluyen incubar una muestra con un anticuerpo que se une a la proteína Cry o Pat, lavar para eliminar el anticuerpo no unido y detectar si el anticuerpo se ha unido. Muchos de estos métodos de detección se basan en reacciones enzimáticas: por ejemplo, el anticuerpo puede unirse con una enzima como la peroxidasa y, tras la aplicación de un sustrato adecuado, se detecta un cambio de color. Dichos anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales.

[158] Otro aspecto de la invención contempla un método para detectar material vegetal derivado del evento CTC91087-6, que comprende: obtener una muestra para análisis; proporcionar un extracto de proteína de la muestra; proporcionar tiras reactivas diseñadas para detectar la presencia de una proteína Cry o Pat en una planta que comprende al menos 14 nucleótidos contiguos de la SEC ID nro.: 18, e/o SEC ID nro.: 19; incubar las tiras reactivas con la muestra; y detectar. En una forma de realización de la presente invención, dicha proteína Cry está codificada por la secuencia de nucleótidos SEC ID nro.: 20 y a proteína Pat está codificada por la secuencia de nucleótidos SEC ID nro.: 21. En una forma de realización adicional, dicha proteína Cry comprende la SEC ID NO: 34 y dicha proteína Pat comprende la SEC ID nro.: 35.

[159] En una forma de realización de la invención se proporciona un método para detectar material vegetal derivado del evento CTC91087-6, comprendiendo dicho método: obtención de una muestra derivada del evento CTC91087-6 y de una muestra de una variedad de caña de azúcar no transgénica para su análisis (control); someter uno o más insectos de la especie *Diatraea saccharalis* (susceptibles a Cry1Ac) a las muestras; detectando un efecto insecticida sobre los insectos. En este aspecto de la invención, "insecticida" se refiere a cualquier efecto inhibidor sobre el insecto (que incluye, pero no se limita a): alimentación reducida, crecimiento retardado, fecundidad reducida, parálisis y muerte.

[160] El método para detectar material vegetal del evento CTC91087-6 incluye, pero no se limita a, ensayos biológicos de alimentación de hojas donde una hoja u otra parte adecuada de la planta del evento CTC91087-6, o cualquier material vegetal derivado del evento CTC91087-6, está infestado con una o más plagas de insectos. La medición de dicha detección puede incluir: evaluar el daño de las hojas o plantas después de períodos de tiempo ajustados, evaluar la mortalidad o evaluar otros efectos insecticidas. Dichos ensayos biológicos se pueden realizar en el campo o en invernaderos de malla y pueden implicar una infestación de insectos natural o artificial.

[161] En otro aspecto de la invención, se proporciona un kit para detectar en una muestra de planta la presencia del evento CTC91087-6, comprendiendo dicho kit: un medio para detectar la presencia de un polinucleótido que comprende al menos 14 nucleótidos contiguos de la secuencia de SEC ID nro.: 18, e/o SEC ID nro.: 19 y / o una proteína de cristal pesticida (Cry). En una forma de realización de la presente invención, dicho kit puede comprender tecnología de detección de amplificación de ADN tal como PCR, qPCR o Taqman®. En una forma de realización adicional de la presente invención, dicho kit puede comprender tecnología de detección de

hibridación de sonda tal como Southern Blots o hibridación in situ. En un aspecto, el medio para detectar material de caña de azúcar transgénica que comprende una proteína Cry1Ac (evento CTC91087-6) comprende pares de cebadores diseñados para unirse a un polinucleótido que comprende nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 22, y SEC ID nro.: 29, en el que al menos un par de cebadores comprende secuencias de nucleótidos contiguas seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 23, SEC ID nro.: 24, SEC ID nro.: 30, y SEC ID nro.: 31. Además, los medios comprenden pares de cebadores, en los que el cebador directo comprende SEC ID nro.: 6 y el cebador inverso comprende SEC ID nro.: 7 y el cebador directo es SEC ID: 8 y el cebador inverso comprende SEC ID nro.: 9. En una forma de realización adicional, el medio para detectar material de caña de azúcar transgénica que comprende una proteína Cry1Ac (evento CTC91087-6) comprende una sonda que comprende SEC ID nro.: 10 o SEC ID nro.: 11. En otra forma de forma de realización de la presente invención, dicho kit puede comprender tecnología de detección de unión de anticuerpos tal como Western blots, ELISA, espectrometría de masas (SELDI) o tiras reactivas. En una forma de realización adicional de la presente invención, dicho kit puede comprender tecnología de detección mediante pruebas biológicas de insectos tales como ensayos biológicos de alimentación de hojas o ensayos de mortalidad biológica. En una forma de realización adicional de la presente invención, dicho kit puede comprender cualquier combinación de las tecnologías de detección mencionadas anteriormente.

[162] El evento transgénico como se describe en la presente invención afecta a insectos de una o más especies del grupo que comprende insectos del orden Lepidoptera. Como resultado, se requiere un número reducido de pulverizaciones insecticidas durante el cultivo de dicha planta en comparación con una planta de caña de azúcar no transgénica de la misma variedad.

[163] La presente invención no está ligada en sí misma al evento CTC91087-6; más bien, se extiende además para incluir cualquier material vegetal derivado del mismo, incluida la semilla, siempre que contenga al menos una de las secuencias de polinucleótidos de la presente invención. En una forma de realización, la presente invención comprende una parte de la planta, una célula vegetal, un tejido vegetal o una semilla de la planta de caña de azúcar modificada genéticamente (*Saccharum spp.*), en la que dicha parte de la planta, célula vegetal, tejido vegetal o semilla comprende la SEC ID nro.: 18 o SEC ID nro.: 19. En otra forma de realización, la invención contempla parte de la planta, célula vegetal, tejido vegetal o semilla que comprende la SEC ID nro.: 12 o SEC ID nro.: 13. Además, la invención incluye una

parte de la planta, una célula vegetal, un tejido vegetal o una semilla que comprende la SEC ID nro.: 5 o SEC ID nro.: 22. La presente invención también incluye, pero no se limita a, plantas que se derivan de linajes cruzados con el evento CTC91087-6 o un derivado del mismo mediante métodos de cruzamiento convencionales u otros; por lo tanto, una forma de realización de la presente invención se refiere al uso de una planta, célula vegetal, parte de la planta o semilla de la planta de caña de azúcar modificada genéticamente (*Saccharum spp.*) como se describe en este documento, que se usa para regenerar una planta, plantación, cultivo de un campo de plantas, o la producción de un producto vegetal. La presente invención también contempla un cultivo de tejido de una planta de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) modificada genéticamente que comprende la SEC ID nro.: 18 o SEC ID nro.: 19. En otra forma de realización, la invención incluye un cultivo de tejidos de una planta de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) modificada genéticamente que comprende la SEC ID NO: 12 o SEC ID nro.: 13. La presente invención también contempla un cultivo de tejido de una planta de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) modificada genéticamente que comprende la SEC ID nro.: 5 o SEC ID nro.: 22. Además, una planta de caña de azúcar modificada genéticamente (*Saccharum spp.*) regenerada a partir del cultivo de tejidos descrito anteriormente también se incluye en la presente invención, en la que la planta regenerada comprende la SEC ID nro.: 18 o SEC ID nro.: 19. Los ejemplos de células vegetales y partes de plantas incluyen, pero no se limitan a: células en suspensión, callos, embriones somáticos, tejido meristemático, tallos superiores, tallos, hojas, discos de hojas, tallos, brotes. Otro aspecto contempla un método para producir una planta de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) resistente a insectos, que comprende cruzar una primera planta de caña de azúcar con una segunda planta de caña de azúcar, donde la segunda planta de caña de azúcar es una planta que comprende el evento CTC91087-6, y produce descendencia de plantas de caña de azúcar derivadas de ella. La planta que comprende el evento CTC91087-6 es una planta de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) modificada genéticamente que comprende la SEC ID NO: 18 o SEC ID nro.: 19. La presente invención también contempla una planta de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) y partes de plantas, células de plantas, tejidos de plantas o semillas de las mismas producidas por el método para producir una caña de azúcar resistente a insectos descrito anteriormente.

[164] En una forma de realización adicional, la presente invención proporciona un producto básico, producido a partir de una planta de caña de azúcar que comprende el evento CTC91087-6. Por tanto, la invención incluye un producto básico, producido a partir de una planta de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) modificada genéticamente que comprende la SEC ID nro.: 18 o SEC ID nro.: 19. En una forma de

realización, la invención contempla un producto básico, producido a partir de una planta de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) modificada genéticamente que comprende la SEC ID NO: 12 o SEC ID nro.: 13. Además, la invención incluye un producto básico, producido a partir de una planta de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) modificada genéticamente que comprende la SEC ID nro.: 5 o SEC ID nro.: 22. Ejemplos de productos básicos incluyen, entre otros: bagazo, jugo de caña de azúcar, jarabe, etanol de primera generación (producido a partir de jugo de caña de azúcar), etanol de segunda generación (etanol celulósico; producido a partir de biomasa), biomasa, azúcar, azúcar en bruto, azúcar refinado, melaza, vinaza y fibra.

[165] La presente invención proporciona además un material vegetal del evento CTC91087-6 que comprende secuencias de polinucleótidos adicionales, modificadas o más pequeñas que CTC91087-6, o exhibe otras características fenotípicas. Por ejemplo, el evento CTC91087-6 del material vegetal podría transformarse para producir un nuevo evento que comprenda características adicionales, como un segundo gen de resistencia a insectos. Este proceso se conoce como apilamiento de genes. Dicho segundo gen de resistencia a insectos codifica, por ejemplo, lectinas insecticidas, inhibidores de proteasas insecticidas y otras proteínas insecticidas derivadas de *Bacillus thuringiensis*.

[166] La presente invención proporciona además un método de control de insectos que comprende proporcionar material vegetal derivado del evento CTC91087-6 en un lugar donde se alimentan dichos insectos. La invención proporciona además un método de control de insectos que comprende proporcionar el material vegetal derivado de CTC91087-6 en el sitio donde se alimentan dichos insectos y aplicar otros reactivos agroquímicos a dicho material vegetal (por ejemplo, herbicidas, fungicidas y similares).

[167] En otra forma de realización, la invención describe un método paragenerar una planta de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) modificada genéticamente del evento CTC91087-6, que comprende introducir una modificación genética a una planta de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) que comprende la SEC ID NO: 5 o SEC ID nro.: 22 para producir una planta de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) modificada genéticamente del evento CTC91087-6, en la que la planta de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) modificada genéticamente tiene una resistencia mejorada a los insectos en comparación con una planta de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) sin la modificación genética. En una forma de realización adicional, la invención proporciona un método para cultivar una planta de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) modificada genéticamente del evento CTC91087-6, que comprende el cultivo de una

planta de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) modificada genéticamente del evento CTC91087-6 que comprende la SEC ID NO: 5 o SEC ID nro.: 22 bajo condiciones que comprenden infestación de insectos, en las que la planta de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) modificada genéticamente tiene un aumento en la resistencia a los insectos en comparación con una planta de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) sin la modificación genética cultivada en las mismas condiciones. La invención también proporciona una planta de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) modificada genéticamente del evento CTC91087-6 que comprende la SEC ID NO: 5 o SEC ID nro.: 22.

10 Descripción de la caña de azúcar transgénica 'CTC91087-6'

[168] Las plantas híbridas transgénicas de caña de azúcar "CTC91087-6" son genética y fenotípicamente sustancialmente iguales al receptor (huésped) de la molécula recombinante, la variedad vegetal parental "CTC9001", una variedad comercial de caña de azúcar brasileña (Número de registro de protección de variedades vegetales (SNPC): 20130226), pero con una característica nueva y particular (expresión Cry1Ac), que garantiza la resistencia a insectos contra el barrenador de la caña de azúcar *D. saccharalis* (Lepidoptera). Como su variedad parental 'CTC9001', 'CTC91087-6' es un híbrido moderno de caña de azúcar que posee varias características agronómicas deseables, como la adaptabilidad al sistema de cosecha mecanizada adoptado por la mayoría de los productores de caña de azúcar brasileños, el potencial genético para el vigor de brotación de la caña de azúcar alta, alto rendimiento de caña, excelente rebrotaje, bajo contenido de fibra y alto contenido de sacarosa. "CTC91087-6" demuestra madurez temprana y, además de la resistencia a los insectos, el evento también es resistente a las enfermedades de las quemaduras de las hojas, el tizón, la roya parda y la naranja.

[169] Brevemente, las plantas 'CTC91087-6' se caracterizan por tener tallos de color púrpura con matices verdosos cuando se exponen a la luz solar y por tallos de color verde amarillento debajo de las pajitas. Las plantas 'CTC91087-6' exhiben entrenudos de forma curva de tamaño mediano y anillos de crecimiento amarillo verdoso de anchura estrecha. Los internodos eran lisos con pocos, si alguno, parches corchosos o grietas, sin surcos y con una capa de cera alta. Las plantas 'CTC91087-6' exhiben una forma de cogollo redondo con un poro apical. La arquitectura de las hojas es erecta con hojas anchas. La forma de la aurícula promedio es lanceolada con distribución asimétrica, presentando una lígula en forma de medialuna.

[170] La altura media del tallo maduro (330 Días de Cosecha después de la siembra - DAP; medido desde la copa hasta la inserción de la hoja +1), diámetro del tallo (5º tallo; promedio de 10 cañas), número de macollos (a 120 DAP y 330 DAP) , peso (330 DAP; 10 macollos), contenido de azúcar (% BRIX; 330 DAP; del jugo extraído), floración (330 DAP) y estado fenológico (medido por el número de macollos por retoño) se evaluaron en cinco lugares diferentes en comparación con la variedad parental 'CTC9001'.

[171] Para cada conjunto de datos, los datos de todos los sitios se combinaron para el análisis estadístico. El análisis combinado del sitio se realizó utilizando el siguiente modelo estadístico:

$$y_{ijk} = \mu + S_i + B(S)_{ij} + G_k + (SG)_{ik} + \varepsilon_{ijk}$$

, donde y_{ijk} es la medida de la réplica j en el sitio i para el tratamiento k ; μ es el promedio general; S_i es el efecto del sitio i ($i = 1$ a 5); B_j es el efecto de replicar j ($j = 1$ a 4); $B(S)_{ij}$ es el efecto de replicar j en el sitio i ($j = 1$ a 4); G_k es el efecto del tratamiento k ($k = 1$ a 7 u 8); $(SG)_{ik}$ es la interacción entre el sitio i y el tratamiento k ; ε_{ijk} es el error residual experimental.

[172] El análisis de efectos principales y la interacción del modelo se realizaron según lo descrito por Kuznetsova y col. (2017). Todos los datos se analizaron utilizando un modelo lineal mixto por paquete lme4 (Bates y col., 2015).

[173] Los resultados del análisis de las características agronómicas y fenotípicas se muestran en la tabla a continuación y corroboran la conclusión de que "CTC91087-6" es sustancialmente equivalente a su variedad parental no transgénica ("CTC9001").

Tabla 01 Promedio de las características agronómicas y fenotípicas de las variedades parentales (no transgénicas) "CTC91087-6" y "CTC9001". Análisis combinado de cinco localidades: Barrinha-SP, Camamu-BA, Piracicaba-SP, Quirinópolis-GO y Valparaíso-SP.

	Parámetro	Promedio		SE	Rango*	
		CTC91087-6	CTC9001		Mín	Máx
Análisis	Altura (m)	2,2.	2,1.	0,16.	1,9.	2,1.
	Diámetro (cm)	2,9.	3,0.	0,32.	2,7.	3,4.

Macollos (120 DAP)	81,4.	72,8.	17,9.	57,2.	95,5.
Macollos (330 DAP)	75,8.	66,8.	20,2.	66,8.	88,4.
Peso (Kg)	11,2.	12,4.	1,31.	9,3.	12,9.
BRIX (%)	17,3.	17,2.	0,70.	14,8.	18,1.
Estado fenológico ***	13,3**	11,1.	3,33.	11,5.	14,6.
Floración	0.	0.	-	0.	0.

* Estimado en base a los valores mínimos y máximos observados para 4 diferentes variedades comerciales de referencia cultivadas en las mismas condiciones experimentales. ** Diferencia estadística (prueba T; $p \leq 0,05$). *** Estado fenológico: se midió el promedio de macollos por retoño cada 30 días (11 evaluaciones durante el ciclo). El número promedio de macollos / retoño fue mayor para el evento CTC91087-6 en comparación con CTC9001 (13.30 vs. 11.0 un.), pero aún se encuentra dentro del rango de las referencias comerciales.

[174] Se han realizado otros estudios de composición que también han demostrado que 'CTC91087-6' es sustancialmente equivalente a su homólogo convencional (no transgénico) 'CTC9001' [parámetros de composición relacionados con la nutrición y el uso de la caña de azúcar en la dieta, tal como se define en la Guía de la OCDE Documento (OCDE, 2011)]. Con base en los resultados del análisis de datos combinados (cinco localidades representativas en las regiones productoras de caña de azúcar brasileñas), no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) en ninguna comparación de componentes nutricionales entre 'CTC91087-6' y la contraparte convencional 'CTC9001' (Tabla 02). Los resultados también indican que "CTC91087-6" expresa Cry1Ac preferentemente en las hojas a los niveles requeridos para controlar el barrenador durante todo el ciclo de cultivo de la caña de azúcar y que no se han producido efectos no deseados de la modificación genética que influyan en el metabolismo de la planta.

Tabla 02 Valores promedios de los parámetros de composición medidos en el evento modificado genéticamente "CTC91087-6" y la contraparte convencional "CTC9001".

	Analito	Promedio		Rango*	
		CTC91087-6	CTC9001	Mín	Máx
◁ ⊆	Materia seca	23.48 ± 1.06	22.73 ± 1.06	20,20.	22,77.

	Humedad	76.29 ± 0.81	76.33 ± 0.81	76,05.	78,96.
	Proteína cruda ¹	3.38 ± 0.23	3.56 ± 0.23	2,79.	4,65.
	Grasa bruta ¹	1.19 ± 0.11	1.10 ± 0.11	0,63.	1,27.
	Ceniza	3.05 ± 0.41	3.26 ± 0.41	3,02.	4,34.
	Fibra cruda ¹	25.82 ± 0.79	27.33 ± 0.79	23,91.	31,32.
	NDF ¹	47.79 ± 1.27	50.91 ± 1.27	46,07.	56,89.
	ADF ¹	31.10 ± 0.77	32.95 ± 0.77	29,30.	37,29.
	Sacarosa ²	11.63 ± 0.84	12.17 ± 0.84	9,20.	12,28.
	Glucosa ²	0.91 ± 0.12	0.91 ± 0.12	0,62.	1,11.
	Fructosa ²	0.75 ± 0.09	0.76 ± 0.09	0,55.	0,84.

¹ Los resultados se expresan en peso seco; ²Valores expresados en base al tallo de la caña de azúcar; ³Valores medios mínimos y máximos de cuatro cultivares comerciales de referencia; SEM: Error Estándar del Promedio. No hay diferencia significativa entre "CTC91087-6" y su contraparte convencional "CTC9001" según la prueba t ap ≤ 0.05.

Ejemplos

Ejemplo 1. Generación de eventos CTC91087- 6 - Transformación de *Agrobacterium*

[175] El evento CTC91087-6 se obtuvo mediante la transformación genética del cultivar CTC9001 mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

[176] El cultivar CTC9001 es un híbrido comercial desarrollado por CTC y es el genotipo donante del trasfondo genético del evento CTC91087-6; es decir, representa la contraparte no transformada del evento CTC91087-6. Este cultivar tiene maduración temprana y se recomienda para plantío en los estados brasileños de São Paulo, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Goiás y Noreste de Brasil (BRASIL, 2012). Al igual que con otros híbridos comerciales de caña de azúcar, es un material de alta ploidía con numerosos cromosomas derivados de sus dos variedades parentales: *S. officinarum* y *S. spontaneum* (DANIELS & ROACH, 1987; SREENIVASAN y col., 1987).

[177] El evento CTC91087-6 tiene el gen cry1Ac, que expresa una toxina para controlar *D. saccharalis*, y el gen bar, utilizado como marcador de selección durante el proceso de modificación genética. La expresión de los genes cry1Ac y bar está

regulada por el promotor del gen de ubiquitina del maíz UBI-1, que tiene un intrón endógeno. Ambos casetes de expresión utilizan el terminador de nopalina sintasa (nos) de *Agrobacterium tumefaciens*.

1.1 Desarrollo de construcciones utilizando genes cry1Ac y bar (Figura 5; SEC ID nro. 14).

[178] Se utilizaron técnicas convencionales de clonación de genes que utilizan plásmidos bacterianos comerciales, digestión con enzimas de restricción y ligación de fragmentos (con ligasas) para desarrollar la construcción de la presente invención (Figura 5).

[179] La construcción de la presente invención se desarrolló uniendo los casetes UBI-cry1Ac-NOS y UBI-bar-NOS. El ADN-T que contenía ambos casetes se transfirió de un plásmido de clonación al plásmido base (Figura 4: vector plásmido binario, que contiene en su espectro de hospedador las bacterias *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens*) utilizando enzimas de restricción, generando la construcción de la presente invención (Figura 5; SEC ID NO: 14).

[180] Después del paso de clonación final, la construcción (SEC ID nro.: 14) se insertó en la cepa DH5 α de *Escherichia coli* usando electroporación. Se inoculó una colonia aislada que contenía la construcción en medio LB líquido suplementado con 150 μ g / ml de espectinomicina y se incubó a 37°C mientras se agitaba a 250 rpm durante un período de 16 horas. Luego se prepararon reservas que contenían suspensión bacteriana y glicerol al 10% (v/v), que se almacenaron en un ultracongelador a -80° C.

[181] La construcción de la presente invención se transfirió luego de *E. coli* a la cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens* mediante aislamiento y purificación de ADN plasmídico y transformación de *Agrobacterium* mediante electroporación. Al igual que con la cepa de *E. coli*, las reservas que contenían la suspensión bacteriana de *Agrobacterium* y glicerol al 10% (v/v) se almacenaron en un ultracongelador a -80° C.

1.2 Transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*

[182] Para obtener callos embriogénicos, se recolectaron hojas jóvenes de palma de caña de azúcar CTC9001, cultivadas en campo o invernadero de malla fina por hasta 12 meses, para aislamiento de los explantes iniciales.

[183] Después de la desinfección de la superficie, se cortaron secciones transversales de aproximadamente 0,05-5 mm de espesor a partir de encima del meristemo en condiciones asépticas. Las secciones se colocaron en la superficie del medio de cultivo de inducción de callos [Sales MS - Murashige y Skoog, 1962; 5 sacarosa, vitaminas B5, aminoácidos seleccionados del grupo que comprende prolina, hidrolizado de caseína, ácido cítrico, manitol, sulfato de cobre, glicina, agente gelificante, 2,4D]. Los cultivos se mantuvieron en la oscuridad a 26 ± 2 ° C y se subcultivaron cada 15 días durante tres a cinco ciclos de 7-28 días cada uno. Una semana antes de la transformación, los callos se seleccionaron nuevamente por sus 10 características embriogénicas (nodulares, compactos, opacos y ligeramente amarillentos).

[184] El cultivo de *Agrobacterium*, que comprende la cepa EHA105 transformada con la construcción de la presente invención, se inició a partir de una reserva de glicerol y se mantuvo en la oscuridad a 28°C durante dos o tres días. La 15 suspensión de *Agrobacterium* para infectar material vegetal se preparó resuspendiendo el cultivo en medio líquido MS más acetosiringona, ajustando a una DO600 final de 0,1-1,0 (sales MS, sacarosa y vitaminas B5).

[185] Los callos con características embriogénicas se seleccionaron visualmente y se transfirieron directamente a la suspensión de *Agrobacterium*, donde 20 permanecieron durante 30 minutos en la oscuridad con agitación constante a 50 rpm.

[186] Después de este período, los callos se separaron de la suspensión de *Agrobacterium* y se eliminó el exceso de suspensión. A continuación, los callos se cultivaron durante 1-5 días en semisólido (sales MS, sacarosa, vitaminas B5, ácido cítrico, agente gelificante, 2,4D y acetosiringona) a 22° C en la oscuridad.

25 [187] Después del co-cultivo, el callo se transfirió al medio de reposo DT (sales MS; sacarosa, vitaminas B5, aminoácidos seleccionados del grupo que comprende prolina y asparagina, hidrolizado de caseína, ácido cítrico, sulfato de cobre, glicina, agente gelificante, 2,4D, timentin) y se mantuvo durante 5-14 días a 26° C en la oscuridad.

30 [188] Las células transformadas se seleccionaron mediante subcultivos sucesivos en medio de cultivo de selección que contenía fitorreguladores y el agente selectivo glufosinato de amonio. (Medio de selección con glufosinato de amonio: Sales MS, sacarosa, vitaminas B5, aminoácidos seleccionados del grupo que comprende prolina y asparagina, hidrolizado de caseína, sulfato de cobre, glicina, gelificante, 2,4D, 35 timentin). Los callos permanecieron en esta condición durante 21 días a 26° C en la

oscuridad, luego los callos se transfirieron al medio de regeneración (equivalente a medio de selección sin 2,4D) y luego al medio de elongación (sales MS, sacarosa, vitaminas B5, hidrolizado de caseína, gelificante, timentin). Los callos se expusieron a un fotoperiodo de 16 horas a 4.000 lux en presencia del herbicida utilizado como agente selectivo, luego se multiplicaron, enraizaron y aclimataron antes de transferirlos al invernadero de malla fina. Este proceso se utilizó para generar el clon que finalmente creó el evento CTC91087-6.

Ejemplo 2. Caracterización molecular del evento CTC91087-6

2.1 Extracción de ADN.

[189] Se utilizaron aproximadamente 10 mg de tejido foliar del evento CTC91087-6. La extracción de ADN genómico se realizó en el extractor de ácidos nucleicos BioSprint 96 (Quiagen, GER) con el kit de extracción del kit de plantas de ADN BioSprint 96 (Quiagen, GER) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN se normalizó a una concentración de 10 ng / µL en un espectrómetro Multiskan GO (Thermo Scientific, EE. UU.).

2.2 Determinación del número de copias transgénicas insertadas en el germoplasma de la planta hospedante.

[190] El número de copias de los genes cry1Ac y bar insertados en el evento CTC91087-6 se evaluó inicialmente mediante PCR Taqman® cuantitativa (qPCR / Taqman®), y los resultados se confirmaron mediante Southern blot y / o secuenciación.

[191] Las reacciones de PCR en tiempo real de Taqman® se realizaron con el sistema de PCR en tiempo real 7500 (Applied Biosystems, EUA) en el modo rápido. Los pares de cebadores y las sondas utilizadas se muestran en la Tabla 03. Como control endógeno de las reacciones cry1Ac y bar para confirmar la presencia y calidad del ADN utilizado, así como la efectividad de la reacción, se utilizó el gen de la poliubiquitina de la caña de azúcar (cebador directo: 5' ACCATTACCCTGGAGGTTGAGA 3'; iniciador antisentido: 5' GTCCTGGATCTTCGCCTTCA 3'; sonda: VIC -5' CTCTGACACCATCGAC 3'-MGB) en modo multiplex.

Tabla 03: Se utilizan cebadores y sondas (Taqman®) para determinar el número de copias mediante qPCR.

Ensayo	Cebadores / sonda	Secuencia	Objetivo	Amplificación
--------	-------------------	-----------	----------	---------------

UBI-cry	Ubi.BAR.CN.F w	GCTCACCTGTTGTTTGGTGT T (SEC ID nro.: 40)	cry1Ac	69 bp
	CRY.4- ubi.CN.Rv	TCGTTGATGTTTGGGTTGTTG T (SEC ID nro.: 41)		
	Ubi.BAR_probe	FAM- CTTCTGCAGGTCGACTC-MGB (SEC ID nro.: 42)		
cry-cry	CRY.571.CN.F w	AGCCGCTACAACGACCTGA (SEC ID nro.: 43)	cry1Ac	79 bp
	CRY.649.CN.R v	GCTCCAGGCCGGTGTG (SEC ID nro.: 44)		
	CRY_probe	FAM- GGCAACTACACCGACCACGC -MGB (SEC ID nro.: 45)		
UBI- bar	Ubi.BAR.CN.F w	GCTCACCTGTTGTTTGGTGT T (SEC ID nro.: 46)	bar	62 bp
	Ubi.BAR.CN.Rv	CGTCGTTCTGGGCTCATTCT (SEC ID nro.: 47)		
	Ubi.BAR_probe	FAM- CTTCTGCAGGTCGACTC-MGB (SEC ID nro.: 48)		

[192] Las reacciones de qPCR utilizaron 1X TaqMan® Fast PCR Master Mix II (Applied Biosystems, EE. UU.), 300 nM de cada cebador y 200 nM de las sondas correspondientes. El ciclo utilizado fue: un ciclo de 50° C durante 2 minutos para la activación de uracil N-glicosilasa, un ciclo de 95° C durante 20 segundos para la activación de la ADN polimerasa, 40 ciclos de 95° C durante 3 segundos (desnaturalización) y 60° C durante 30 segundos (recocido y extensión).

[193] El análisis de datos se realizó ingresando manualmente el umbral en la fase exponencial de la curva de amplificación. Para los genes cry1Ac y bar, el número de copias se infirió del análisis DeltaCt (dCt), en el que el Ct (ciclo en el que la señal de fluorescencia emitida por el producto de amplificación alcanza el umbral) del gen endógeno se resta del Ct de la diana gene. En este tipo de análisis, se asume que el número de ejemplares duplica cada Ct y se toma como referencia el número de referencia de ejemplares de control de la misma variedad cuyo valor se conoce.

[194] Como resultado, ambos ensayos señalaron la presencia de 1 copia del gen cry1Ac en el genoma del evento CTC91087-6. Se detectó el mismo número de

copias (es decir, 1 copia) para el gen bar, cuyo ensayo se basa en la detección del promotor del gen.

2.3 Definición de secuencias flanqueantes.

[195] Para aislar las regiones flanqueantes en los extremos del inserto de ADN-T presente en el evento CTC91087-6, se realizaron varios experimentos de secuenciación de ADN. El mapa de la inserción genética del evento CTC91087-6 generado a partir de los datos de estos experimentos se muestra en la FIGURA 3.

[196] Se realizaron ensayos de PCR inverso (iPCR) para ambos extremos del ADN-T para aislar y clonar las regiones flanqueantes del inserto. La metodología iPCR se basa en la digestión del ADN genómico utilizando enzimas que escinden la secuencia de ADN-T y una secuencia del genoma de evento aleatorio. Los productos de escisión se circularizan y se someten a múltiples ciclos de PCR anidados utilizando cebadores para regiones de ADN-T conocidas (Tabla 04). A continuación, los fragmentos aislados se aislaron, clonaron y secuenciaron mediante metodología Sanger. Finalmente, se ensambló una secuencia de consenso de las regiones flanqueantes (SEC ID nro.: 23, y SEC ID nro.: 24).

Tabla 04 Enzimas de restricción y secuencias de cebadores utilizadas para llevar a cabo reacciones iPCR y condiciones de reacción de amplificación.

Borde de ADN-T	Enzima de Restricción		Secuencia de Oligonucleótidos
Izquierda	BsrGI	PCR1 Anidado	5'-TGCAATGCTCATTATCTCTAG -
			3' (SEC ID nro.: 49)
			5'-AGCATCACCATCTACACCGAC
			-3' (SEC ID nro.: 50)
		PCR2 Anidado	5'-TGCACTGCAGGCATCGATC
			-3' (SEC ID nro.: 51)
			5'-AGCATCACCATCTACACCGAC
			-3' (SEC ID nro.: 50)
		PCR3 Anidado	5'-GATATCAGTACTAATTCAGTAC
			-3' (SEC ID nro.: 52)
			5'-AGCATCACCATCTACACCGAC
			-3' (SEC ID nro.: 50)
Izquierda	NdeI	PCR1 Anidado	5'-TGCACTGCAGGCATCGATC
			-3' (SEC ID nro.: 53)

Derecha	KpnI		5'- ACGGATGCGACCTGTACG - 3'(SEC ID nro.: 54)
			5'- TGCAGTGCAGGCATCGATC -3' (SEC ID nro.: 55)
		PCR2 Anidado	5'- ACGGATGCGACCTGTACG - 3' (SEC ID nro.: 54)
			5'- GATATCAGTACTAATTCAGTAC -3' (SEC ID nro.: 56)
			5'- ACGGATGCGACCTGTACG - 3 '(SEC ID nro.: 54)
		PCR1 Anidado	5'- AATTATACATTTAATACGCG -3' (SEC ID nro.: 57)
			5'- AATAACGTCATGCATTACATG - 3' (SEC ID nro.: 58)
		PCR2 Anidado	5'- CGCGGTGTCATCTATGTTAC - 3' (SEC ID nro.: 59)
			5'- TGCAGTGCAGGCATCGATC -3' (SEC ID nro.: 60)
		PCR3 Anidado	5'- TCGTCGACTCTAGACTCGAG - 3 '(SEC ID nro.: 61)
			5'- CGATCTCAGATCTCGGTGAC - 3 '(SEC ID nro.: 62)

Número de Ciclo	Desnaturalización	Anillar	Extensión
1^{er}	94°C, 5 min	-	-
2 - 36°	94°C, 30 sec	50°C 45 sec	72°C, 3 min
37th	-	-	72°C, 7 min

[197] Paralelamente, como actualmente no existe un genoma completamente secuenciado que pueda usarse como referencia para el germoplasma CTC9001, se adoptó una metodología de secuenciación de captura como un esfuerzo adicional para aislar el ADN-T insertado en el evento CTC91087-6 y sus regiones flanqueantes. En esta estrategia, se desarrollaron pequeños fragmentos de polinucleótidos superpuestos (sondas) para cubrir toda la secuencia de ADN-T. Estas sondas se hibridaron con el ADN genómico fraccionado de los cultivares CTC9001 y CTC91087-

6 y se aislaron las secuencias híbridas. A continuación, los fragmentos aislados se secuenciaron utilizando tecnología Illumina® de acuerdo con el protocolo estándar. Los datos obtenidos se alinearon con la secuencia de ADN-T presente en el vector de transformación y, junto con los datos de iPCR mencionados anteriormente, la
 5 secuencia de consenso de ADN-T completa (SEC ID nro.: 2) del evento CTC91087-6 y se obtuvieron sus secuencias flanqueantes (SEC 22, SEC ID nro.: 5, SEC ID nro.: 23, SEC ID nro.: 24).

2.4 Método para la detección y caracterización del evento CTC91087-6 (ensayo específico del evento)

10 [198] Para la validación de la metodología, se utilizaron muestras de hojas de eventos de cuatro localidades diferentes (Piracicaba, Barrinha y Valparaíso (São Paulo); y Quirinópolis (Goiás). Tanto las plantas de control sin tratar (WT) como otros eventos modificados genéticamente que tienen la misma construcción se usaron como controles del experimento. La extracción de ADN se produjo como se describió
 15 anteriormente.

[199] Se diseñaron y validaron ensayos de PCR en tiempo real para la identificación del evento CTC91087-6 basándose en la caracterización molecular de las secuencias flanqueantes genómicas de inserción de ADN-T. Para el desarrollo de la metodología de detección específica se eligió la técnica de PCR en tiempo real
 20 (qPCR) conocida como “Plus-Minus” o “Presencia - Ausencia”, validando las dos variantes de la metodología: vía SYBR GREENTM y vía tecnología Taqman®. Se han diseñado pares de cebadores específicos para generar información sobre la inserción de ADN-T en ambas metodologías, de modo que un cebador se une en la construcción y el segundo cebador se une en el genoma del huésped. Para el uso de la tecnología
 25 Taqman®, se diseñaron sondas específicas entre los cebadores.

[200] En una realización preferida, la sonda empleada en la tecnología de PCR Taqman® consta de SEC ID nro.: 10 en la región RB y / o SEC ID nro.: 11 en la región de LB.

30 [201] Las reacciones de PCR en tiempo real Taqman® se realizaron utilizando el sistema de PCR en tiempo real 7500 (Applied Biosystems, EE. UU.) en su modo rápido.

[202] El gen de la poliubiquitina de la caña de azúcar (gen endógeno) se utilizó como control de reacción interno para confirmar la presencia y la calidad del ADN utilizado. Los siguientes reactivos se multiplexaron con el ensayo desarrollado para el

evento: cebador directo (SEC ID nro.: 15); cebador inverso (SEC ID nro.: 16 ; sonda SEC ID nro.: 17).

[203] Las reacciones de qPCR utilizaron 1X TaqMan® Fast PCR Master Mix II (Applied Biosystems, EE. UU.), 150 nM de cada cebador específico del evento y 100 nM de la sonda correspondiente, 300 nM de los cebadores para el gen de la poliubiquitina endógena y 300 nM de su sonda, 100 -200ng de ADN y suficiente agua para completar el volumen de 20 µL. El ciclo utilizado fue: un ciclo de 50° C durante 2 minutos para la activación de uracil N-glicosilasa, un ciclo de 95° C durante 20 segundos para la activación de la polimerasa ADN, 40 ciclos de 95° C durante 3 segundos (desnaturalización) y 60° C durante 30 segundos (recocido y extensión).

[204] Las reacciones de qPCR utilizando SYBR GREENTM también se realizaron utilizando el Sistema de PCR en Tiempo Real 7500 (7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, EE. UU.)) en su modo estándar para este tipo de ensayo. Las reacciones se realizaron utilizando 1 X QuantiFast SYBR GreenTM PCR Kit (QIAGEN™), cebador directo RB 40 nM y cebador inverso RB 28 nM, 100-200 ng de ADN y agua suficiente para un volumen final de 25 µl. Las reacciones se realizaron utilizando el evento de la invención, los otros eventos transformados con la misma construcción que el evento de la invención (controles negativos), muestras de caña de azúcar silvestre (WT) y controles experimentales (extracción y blanco de reacción).

[205] Se utilizó el siguiente programa de PCR: un ciclo de desnaturalización de ADN a 95°C durante 5 minutos, 35 ciclos de hibridación de cebadores y amplificación a 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto y un ciclo de disociación para el pico de fusión de generación (95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 min, 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 15 segundos). La reacción con SYBR safe no permite el uso de multiplex; por lo tanto, es necesario preparar una reacción separada de amplificación de genes endógenos, utilizando el mismo ADN, para eliminar los falsos negativos.

[206] Como resultado, fue posible validar la reacción de detección de eventos específicos de la invención mediante Taqman® de alta precisión, como se ilustra en la Figura 6.

[207] Las muestras correspondientes al evento de la invención mostraron una amplificación específica: con una formación de curva de amplificación bien definida y una forma sigmoidea característica; mientras que las muestras de otros eventos, WT y los blancos de extracción y reacción no mostraron amplificación específica del evento. Como era de esperar, el control endógeno presentó amplificación para todas

las muestras excepto los blancos de extracción y reacción, demostrando tanto la calidad del ADN utilizado en la reacción como la calidad de la reacción y el ciclo.

[208] El ensayo SYBR GREEN™ mostró una amplificación específica de las muestras del evento a la temperatura de fusión esperada (83,5° C). Las muestras de los otros eventos, así como WT y blancos no alcanzaron su pico a esta temperatura, aunque algunas muestras del evento de interés mostraron una curva de menor intensidad antes del pico específico (Figura 7). Dicha curva es característica de la formación del dímero de cebadores durante la reacción de PCR, lo que sería de esperar porque la tecnología se basa en la unión de un agente intercalante a cualquier molécula de ADN bicatenario, ya sea que se derive de la amplificación específica o de la unión entre los cebadores. Por el contrario, las sondas de tecnología Taqman® se unen específicamente al ADN y se liberan durante la amplificación del ADN, generando así la señal de fluorescencia capturada por el equipo durante este proceso.

Ejemplo 3. Evento CTC91087-6 Generación - Edición del genoma (GE)

[209] El evento de la invención, CTC91087-6, se genera usando un enfoque de edición del genoma (GE), recreando así el evento generado usando los métodos preferidos de transformación mediada por *Agrobacterium* descritos en este documento.

[210] De esta manera, el evento CTC91087-6 se recrea con la inserción del gen cry1Ac en la misma ubicación del genoma que el evento CTC91087-6. La expresión del gen Cry1Ac está regulada por un promotor o una región promotora y un terminador capaz de impulsar la expresión de la proteína Cry1Ac a niveles suficientes para controlar la infestación de la plaga diana. Además, también se inserta un gen marcador o un sistema de selección (de forma transitoria o estable) para permitir la selección de eventos. Preferiblemente, el ADN-T de la invención reivindicada (SEC ID nro.: 2) se inserta en la misma localidad del genoma como el evento CTC91087-6. Por tanto, el evento CTC91087-6 se recrea con la inserción del gen cry1Ac, que expresa una toxina para controlar *D. saccharalis*, y el gen bar. La expresión de los genes cry1Ac y bar está regulada por el promotor del gen de ubiquitina del maíz UBI-1, que tiene un intrón endógeno. Ambos casetes de expresión utilizan el terminador de nopalina sintasa (nos) de *Agrobacterium tumefaciens*.

[211] En el caso de que los enfoques de edición del genoma antes mencionado para generar el evento CTC91087-6 den como resultado una integración de baja eficiencia del ADN-T en el sitio objetivo, se podrían administrar genes de desarrollo u otros elementos reguladores junto con los reactivos de GE para mejorar la eficiencia de la integración.

3.1 Desarrollo de construcciones.

[212] Se utilizan técnicas convencionales de clonación de genes que utilizan plásmidos comerciales, digestión con enzimas de restricción, ligación de fragmentos (con ligasas) y otras metodologías conocidas para desarrollar las construcciones (plásmidos) de la presente invención.

[213] Los reactivos de GE se pueden administrar en múltiples plásmidos, cada uno compuesto por un elemento del complejo enzimático (endonucleasa, crRNA o RNA guía, y la plantilla de recombinación homóloga (HR); Figura 21).

[214] En una realización, las construcciones de molde HR comprenden el ADN-T (SEC ID nro.: 2) de la invención reivindicada flanqueada por aproximadamente 1 kb de ADN homólogo a las secuencias flanqueantes descritas para CTC91087-6 (SEC ID nro.s: 23 y 24) ubicados a ambos lados del ADN-T. En una realización preferida, las construcciones de plantilla HR comprenden la SEC ID nro.: 26 (Figura 21). La invención también comprende una segunda construcción que comprende un casete de expresión de endonucleasa. En una forma de realización preferida, el casete de expresión de endonucleasa comprende una secuencia de endonucleasa Cas9. En una forma de realización más preferida, la secuencia de Cas9 tiene un codón optimizado para la expresión de la caña de azúcar. En una forma de realización, la construcción Cas 9 comprende adicionalmente la secuencia guía / crRNA. Preferiblemente, la construcción Cas 9 comprende la secuencia de crRNA SEC ID nro.: 28. En una forma de realización más específica, la construcción Cas 9 comprende la SEC ID nro.: 27 (Figura 20). Una tercera construcción que comprende el casete de expresión de ARN guía aislado también se contempla en la presente invención y comprende la SEC ID NO: 28.

[215] En una forma de realización adicional, la construcción de edición del genoma comprende la plantilla HR, la nucleasa y los casetes de expresión del ARN guía, que administran todos los reactivos de GE en una única construcción. En una forma de realización, la construcción única comprende el ADN-T (SEC ID nro.: 2) de la invención reivindicada flanqueada por aproximadamente 1 kb de ADN homólogo a las secuencias flanqueantes descritas para CTC91087-6 (SEC ID nro.s: 23 y 24) ubicados a ambos lados del ADN-T. En una forma de realización preferida, la construcción comprende la SEC ID nro.: 25 (Figura 22).

[216] Opcionalmente, las construcciones también comprenden marcadores fluorescentes / de selección y / u otros sistemas de ingeniería genética para eliminar genes marcadores y / o casetes de nucleasas, tales como un sistema de

recombinación Cre / loxP del bacteriófago P1. En este caso, el casete del gen marcador / nucleasa, que debe eliminarse, está flanqueado por las regiones loxP, mientras que la Cre recombinasa elimina este fragmento durante una expresión transitoria.

5 3.2 Entrega directa

[217] En una forma de realización, el evento de la invención se genera usando metodologías para el suministro directo de proteínas, ARN o plásmidos. Las metodologías para el suministro directo se seleccionan del grupo que consiste en bombardeo de partículas, electroporación, lipofección y transfección de protoplastos; sin embargo, también se podrían utilizar otras metodologías de administración conocidas por los expertos en la técnica.

3.2.1 Entrega directa - Enfoque RNP

[218] En una forma de realización, el evento de la invención se genera usando la administración de ribonucleoproteína (RNP). Las metodologías preferidas para la administración de RNP se seleccionan del grupo que consiste en el bombardeo de partículas de callos de caña de azúcar y la transfección de protoplastos. Además, también se pueden usar otros tipos de células de la caña de azúcar para la transformación, que incluyen (pero no se limitan a): disco de hoja, meristemo y células en suspensión derivadas de callos.

[219] Utilizando el enfoque de RNP para la edición del genoma, la endonucleasa y el crRNA o el RNA guía se administran en forma de RNP, separados de la plantilla HR, que se administra a través de un plásmido.

[220] El ARN guía puede producirse preliminarmente mediante transcripción *in vitro* o sintetizarse químicamente como ribooligonucleótido, mientras que la nucleasa correspondiente puede producirse *in vivo* con purificación adicional (expresión bacteriana) o adquirirse de cualquier fabricante de tales productos. En una forma de realización preferida, el ARN guía comprende la SEC ID NO: 28. En otra forma de realización, la nucleasa es la nucleasa Cas9.

[221] Un complejo de ribonucleoproteína lista (RNP) que consta de la nucleasa correspondiente y el ARN guía, y el plásmido plantilla HR se absorben en partículas doradas y se administran directamente a las células o tejidos.

3.2.2 Entrega directa: plásmido

[222] En otra forma de realización de la invención, el evento de la invención se genera usando la liberación de plásmidos, donde los reactivos de GE se expresarán de manera transitoria, logrando así la integración dirigida al sitio de CTC91087-6 sin la integración de transgenes adicionales asociados con el Enfoque de GE.

5 [223] Las metodologías para el suministro de plásmidos se seleccionan del grupo que consiste en bombardeo de partículas (biolístico) de callos de caña de azúcar o transformación de protoplastos con polietilenglicol; sin embargo, también se podrían utilizar otras metodologías conocidas por los expertos en la técnica. Además, también se pueden usar otros tipos de células de la caña de azúcar para la
10 transformación, que incluyen (pero no se limitan a): protoplasto, disco de hoja, meristemo y células en suspensión derivadas de callos.

[224] En otra forma de realización más de la invención, el evento de la invención se genera usando suministro de plásmido, donde los reactivos GE se expresan de manera estable, requiriendo así la escisión de los reactivos GE
15 integrados y el marcador seleccionable usando, por ejemplo, un sistema Cre / Lox. Con este enfoque, los sitios LoxP permanecerán en el genoma de la planta del evento CTC91087-6. También pueden usarse otros enfoques de escisión de ADN conocidos por los expertos en la técnica para eliminar el ADN reactivo de GE del genoma de la planta del evento CTC91087-6.

20 3.3 Entrega Indirecta

[225] En una forma de realización, el evento de la invención se genera utilizando metodologías para la liberación indirecta de plásmidos, como transformación de *Agrobacterium*. Se pueden utilizar *Agrobacterium tumefaciens* y *Agrobacterium rhizogenes*. Los virus vegetales también se pueden usar para la
25 administración indirecta de plásmidos a células y tejidos vegetales. Por ejemplo, los geminivirus de plantas modificados genéticamente permiten lograr una mayor eficiencia de transformación, especialmente sin una inserción estable en un genoma. Además, también se pueden usar diferentes tipos de tejidos y células para la transformación que incluyen (pero no se limitan a): callos, protoplasto, disco foliar,
30 meristemo y células en suspensión derivadas de callos.

[226] En una forma de realización preferida, la transformación de *Agrobacterium* se realiza como se describe en el Ejemplo 1.

[227] En otra forma de realización preferida, el evento de la invención se genera usando el suministro de plásmido por transformación de *Agrobacterium*, donde

los reactivos de GE se expresarán de manera transitoria, logrando así la integración dirigida al sitio de CTC91087-6 sin la integración de transgenes adicionales asociados con el Enfoque de GE.

[228] Los reactivos GE se pueden administrar en múltiples plásmidos, pero preferiblemente en un solo plásmido. En una forma de realización preferida, las construcciones son SEC ID nro.: 25 y comprende un marcador seleccionable, una nucleasa, crRNA o RNA guía y plantilla de recombinación homóloga (HR) (Figura 22). La plantilla HR comprende ADN-T (SEC ID nro.: 2) de la invención reivindicada flanqueada por aproximadamente 1 kb de ADN homólogo a las secuencias flanqueantes descritas para CTC91087-6 (SEC ID nro.s: 23 y 24) ubicados a ambos lados de los casetes de expresión.

[229] En una realización preferida, el evento de la invención se genera usando suministro de plásmido, donde los reactivos GE se expresan de manera estable, requiriendo así la escisión de los reactivos GE integrados y el marcador seleccionable usando, por ejemplo, un sistema Cre / Lox. Con este enfoque, los sitios LoxP permanecerán en el genoma de la planta del evento CTC91087-6. También pueden usarse otros enfoques de escisión de ADN conocidos por los expertos en la técnica para eliminar el ADN reactivo de GE del genoma de la planta del evento CTC91087-6.

[230] Con todos los procesos de transformación descritos anteriormente, las células transformadas resultantes se regenerarán para formar una planta que contenga el evento de la invención.

3.4 Caracterización molecular.

[231] El evento CTC91087-6, generado usando la edición del genoma, se evalúa para la inserción precisa del ADN-T en el sitio diana del genoma usando los cebadores de la invención (SEC ID nro.: 6-9) como se describe en la presente memoria descriptiva.

[232] Además, un par de cebadores diseñados para amplificar secuencias próximas a la región de 1 Kb de las secuencias flanqueantes del evento CTC91087-6 se validan para evaluar la integridad del sitio de recombinación (Tabla 05).

Tabla 05 Par de cebadores diseñados para secuencias flanqueantes de CTC91087-6 (región de 1 Kb).

Oligonucleótidos	Tamaños esperados
------------------	-------------------

		de amplicones
Nombre	Secuencia	región flanqueante
FS RB	5'- CAACAACCCAAACATCAACG -3' (SEC ID nro.: 63)	
	FS_C91- 087_RB_1,4k.a	5'- TAACATTTAGGGTGCCTTG -3' (SEC ID nro.: 64) 1394.
		5'- GTTCTTGGGTGGCGGTAGTA -3' (SEC ID nro.: 65)
FS LB	FS_C91- 087_LB_2k.a	5'- CGTCGGTGTAGATGGTGATG -3' (SEC ID nro.: 66) 2054.
		5'- TTGGGTGGCGGTAGTAGTTG -3' (SEC ID nro.: 67)
	FS_C91- 087_LB_2k.b	5'- CGTCGGTGTAGATGGTGATG -3' (SEC ID nro.: 66) 2050.

Número de ciclo	Desnaturalización	Anillar	Extensión
1 ^{er}	94°C, 1 min	-	-
2-30 ^o	98°C, 10 seg	68°C 9 min	-
31 th	-	-	72°C, 10 min

Ejemplo 4. Evaluación del producto de expresión génica insertado en el evento de la invención.

- 5 [233] El producto de expresión génica en el evento de la presente invención se ha caracterizado en detalle usando ELISA para determinar la concentración de proteínas Cry1Ac y Pat y Western blot para confirmar las identidades de estas proteínas heterólogas.

(ELISA) Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas

[234] Para evaluar la expresión de los genes cry1Ac y bar mediante ELISA, se estudiaron diferentes tejidos de caña de azúcar en diferentes etapas del desarrollo del cultivo. Para producir muestras de tejido del evento de la invención y el control parental, se realizaron tres tipos de pruebas experimentales: PACE, EB y AGROPHENO.

5 [235] En conjunto, los ensayos PACE y AGROPHENO se realizaron en cinco sitios representativos del área de cultivo de control parental, tres en el estado de São Paulo (Barrinha, Piracicaba y Valparaíso), uno en el estado de Goiás (Quirinópolis) y uno en el estado. de Bahía (Camamu). Los experimentos se realizaron en un diseño de bloques completos al azar con 4 repeticiones. Las parcelas estaban compuestas
10 por cuatro filas de 12 metros (Barrinha, Piracicaba, Valparaíso y Quirinópolis) o de cuatro filas de 7 metros (Camamu). En todos los casos, el espacio entre filas fue de 1,5 metros.

[236] Los ensayos de EB se realizaron en cuatro sitios, tres en el estado de São Paulo (Barrinha, Piracicaba y Valparaíso) y uno en el estado de Goiás
15 (Quirinópolis). Los experimentos se realizaron en un diseño de bloques al azar con 4 repeticiones. Las parcelas constaban de 4 hileras de 4 metros cada una. En todos los casos, el espacio entre filas fue de 1,5 metros. La Tabla 06 presenta detalles de las pruebas realizadas en las respectivas localidades.

Tabla 06: Información de ensayo utilizada para la recogida de muestras para el
20 análisis de la expresión del gen cry1Ac y bar producida por el evento de la invención. (El número de días después del plantío (DAP) representa el tiempo de recolección de la muestra para el análisis).

Tipo de ensayo	Ensayo	Localidad	Tejido	DAP
PACE AGROPHENO	PACE CTC91-BA	Barrinha-SP	hoja tallo raíz	100, 200, 300 330. 330.
	PACE CTC91-PI	Piracicaba-SP	hoja tallo raíz	100, 200, 300 330. 330.
	PACE CTC91-VP	Valparaíso-SP	hoja tallo raíz	100, 200, 300 330. 330.
	PACE CTC91-QS	Quirinópolis- GO	hoja tallo raíz	100, 200, 300 330.

Tipo de ensayo	Ensayo	Localidad	Tejido	DAP
				330.
	AGROPHENO CTC91-CA	Camamu-BA	hoja tallo raíz	100, 200, 300 330. 330.
EB	EB-BIO-BA	Barrinha-SP	hoja	60, 120, 240, 300
	EB-BIO-PI	Piracicaba-SP	hoja	60, 120, 240, 300
	EB-BIO-VP	Valparaíso-SP	hoja	60, 120, 240, 300
	EB-BIO-QS	Quirinópolis-GO	hoja	60, 120, 240, 300

[237] El análisis de expresión de las proteínas Cry1Ac y Pat producidas por el evento de la invención se investigó en diferentes períodos del desarrollo de la planta de caña de azúcar. Las condiciones evaluadas fueron:

- 5 • Expresión de proteínas heterólogas en hojas durante un ciclo de cultivo del evento de la invención (100, 200 y 300 DAP);
- Expresión de proteínas heterólogas en hojas a lo largo del ciclo de la caña de azúcar a 60 y 120 DAP, luego a 240 y 300 DAP;
- 10 • Expresión de proteínas heterólogas en tallos y raíces a 330 DAP del ciclo de la caña de azúcar.

[238] Se recolectaron muestras de hojas en parcelas de tratamiento experimental (invención y control parental) en los ensayos PACE / AGROPHENO a 100, 200 y 300 DAP. En los ensayos de EB, las muestras se recolectaron a 60, 120, 240 y 300 DAP. Las muestras de paja y raíces se recolectaron solo a 330 DAP en los
15 ensayos PACE / AGROPHENO. Después de la recolección, las muestras se enviaron para análisis ELISA para determinar los niveles de expresión de proteínas Cry1Ac y Pat.

[239] Muestras de Hojas: Se recolectaron 30 cm de tejido de la punta de 5 a 10 hojas “diagnósticas” en las líneas en zigzag 2 y 3 evitando hojas enfermas.

Después de retirar la nervadura central, las hojas se cortaron en trozos, se homogeneizaron y se empaclaron en bolsas ziplock previamente identificadas.

[240] Muestras de Tallo: Se recolectaron 10 cañas de azúcar enteras. Después de retirar las hojas secas y los punteros, las cañas se cortaron en pequeñas
5 colas, se homogeneizaron y se empaquetaron en paquetes etiquetados.

[241] Muestras de Raíz: Se recogió un grupo representativo de las filas 2 y 3 de la parcela experimental. La tierra se trituró y las raíces se lavaron con agua limpia para eliminar el exceso de tierra. Luego, las raíces limpias se trituraron en trozos, se homogeneizaron y se empaquetaron en bolsas de plástico etiquetadas.

10 [242] Todas las muestras (de los tejidos de la hoja, el tallo y la raíz) se transfirieron a hielo seco en una caja de espuma de poliestireno dentro de los 15 minutos posteriores a la recolección. La identidad genética de todos los grupos muestreados se confirmó mediante un ensayo específico de evento como se describe anteriormente.

15 [243] Se maceraron 30 mg de hoja, 60 mg de tallo y 200 mg de tejido radicular (congelado en hielo seco o nitrógeno líquido) utilizando equipo TissueLyser. Al tejido de la hoja macerada se le añadieron 750 µl de tampón de extracción de fosfato salino (PBS) suplementado con Tween 20 (NaCl 0,138 M; KCl 0,027 mM; Tween 20 al 0,05%, pH 7,4) diluido según las instrucciones del fabricante (Envirologix™, EE. UU.). Para el
20 tallo y la raíz, se utilizaron 375 µL del mismo tampón. Después de la adición del tampón, se realizó la homogeneización en vórtice y luego se centrifugó durante 20 minutos a la velocidad máxima. Se recogió el sobrenadante resultante y se cuantificó la proteína total usando el ensayo de Bradford.

[244] La cuantificación de las proteínas Cry1Ac y Pat se realizó de acuerdo
25 con las recomendaciones del kit de ensayo de proteínas ThermoScientific™ Coomassie Plus (Bradford) (23236) - Procedimiento de microplaca. Por tanto, los estándares utilizados para obtener la curva de calibración fueron los estándares comerciales de BSA (Albúmina de Suero Bovino) ya diluidos suministrados con el kit descrito anteriormente. Se utilizaron los calibradores 2000, 1000, 500, 250, 125 y 0 µg
30 / mL (preparados en tampón PBST). Se añadieron 10 µl de cada calibrador estándar por triplicado a los pocillos de la placa. En total, se generaron 6 curvas a partir de diluciones independientes. Para las muestras, se utilizaron 10 µL de las 3 extracciones de proteínas individuales en cada pocillo. Luego, se agregaron 200 µl de solución de reactivo Coomassie Plus a cada pocillo que contenía los calibradores y las muestras.
35 Las placas se taparon y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. La

absorbancia se leyó a 595 nanómetros (nm) usando el software SoftmaxPro 7.0 (Dispositivo Molecular).

[245] Las proteínas totales se obtuvieron por triplicado para cada muestra estudiada. Después de la cuantificación de la proteína total de cada réplica, se eligió para el análisis ELISA la muestra con la variación más pequeña del valor de cuantificación medio. Estas muestras se normalizaron siguiendo el procedimiento operativo estándar de la pipeta automática Qiagility (QIAGEN). La normalización se realizó a una concentración final de 150 µg / ml de proteína total. Posteriormente, las muestras se diluyeron para asegurar que las concentraciones de proteína a identificar estuvieran dentro del rango de cuantificación confiable. Para el análisis de la presencia de proteína Cry1Ac, se hizo la dilución para tener 1.000 ng / mL. Para el análisis de la presencia de proteína Pat, la dilución fue de 30.000 ng / mL. Se utilizaron muestras estándar como se describió anteriormente para el análisis ELISA.

[246] Los resultados se obtuvieron mediante lectura de espectrometría de placa de 96 pocillos a dos longitudes de onda diferentes: 450 nm y 630 nm para Cry1Ac y 450 nm para Bar en un lector de Placas SpectraMax (Dispositivos Moleculares). Para Cry1Ac, se utiliza el kit Envirologix AP003 CRBS para la detección y cuantificación de proteínas. Para Pat (bar) se utilizó el kit Envirologix AP013 BAR. En todos los casos, se siguieron las recomendaciones de los fabricantes.

[247] El análisis se basó en la asociación de los valores de absorbancia de las muestras de prueba con los valores predichos en una ecuación estimada midiendo la absorbancia de una curva estándar. Las proteínas sintéticas se diluyeron a las concentraciones deseadas en tampón PBST. Los análisis se realizaron por duplicado experimental para cada muestra. Las concentraciones de proteína Cry1Ac y Pat se presentaron basadas en proteína total (µg / mg), tejido fresco (µg / g) y tejido seco (µg / g).

[248] Los datos de expresión de la proteína Cry1Ac de las hojas del evento de la invención durante un año de cultivo (110, 200 y 300 DAP) en cada uno de los cinco sitios evaluados se muestran en la Tabla 07 a continuación.

Tabla 07: Expresión promedio de Cry1Ac en hojas del evento de la invención durante un año de cultivo de caña de azúcar. Análisis estadístico individual y combinado para los 5 sitios probados a 100, 200 y 300 DAP (SE: error estándar).

Localidad	Tiempo	Evento de la Invención					
	DAP / Comparación	μg Cry1Ac / mg de proteína total	SE	μg Cry1Ac / g Tejido Fresco	SE	μg Cry1Ac / g Tejido Seco	SE
Barrinha-SP	100.	3,3.	0,19.	24,6.	3,32.	83,5.	10,80.
	200.	3,1.	0,19.	32,8.	3,32.	99,0.	10,80.
	300.	3,5.	0,19.	44,1.	3,32.	143,8.	10,80.
Camamu-BA	100.	3,2.	0,12.	30,3.	1,96.	127,2.	6,62.
	200.	3,1.	0,12.	32,9.	1,96.	99,3.	6,62.
	300.	2,4.	0,12.	27,5.	1,96.	89,5.	6,62.
Piracicaba-SP	100.	3,5.	0,17.	31,1.	2,84.	119,6.	10,40.
	200.	3,0.	0,17.	35,8.	2,84.	119,0.	10,40.
	300.	3,7.	0,17.	39,1.	2,84.	123,0.	10,40.
Quirinópolis-GO	100.	4,3.	0,19.	24,2.	1,57.	91,8.	5,24.
	200.	2,8.	0,19.	22,1.	1,57.	65,9.	5,24.
	300.	2,8.	0,19.	28,1.	1,57.	89,8.	5,24.
Valparaíso-SP	100.	3,6.	0,24.	24,3.	2,52.	91,7.	8,49.
	200.	3,3.	0,24.	25,5.	2,52.	85,2.	8,49.
	300.	3,7.	0,24.	27,7.	2,52.	91,9.	8,49.
Análisis Combinado	100.	3,6.	0,11.	26,9.	1,76.	102,8.	5,91.
	200.	3,0.	0,11.	29,8.	1,76.	93,7.	5,91.
	300.	3,2.	0,11.	33,3.	1,76.	107,6.	5,91.

[249] Los datos de expresión de Cry1Ac (hojas) del análisis combinado de las 5 localidades del evento de la invención durante un año de cultivo de caña (Tabla 07) se muestran en la Figura 8 (en μg de proteína / g de tejido seco).

[250] Los datos de expresión de la proteína Cry1Ac en hojas del evento de la invención durante un ciclo de caña 60 y 120 DAP y caña 240 y 300 DAP se presentan en la Tabla 08.

Tabla 08: Comparación de promedios de expresión de Cry1Ac en hojas del evento de la invención sobre un ciclo de caña 60 y 120 DAP y caña 240 y 300 DAP.

Localidad	Tiempo	Evento de la Invención					
	DAP / Comparación	μg Cry1Ac / mg de proteína total	SE	μg Cry1Ac / g Tejido Fresco	SE	μg Cry1Ac / g Tejido Seco	SE
Barrinha-SP	60.	3,2.	0,14.	37,4.	1,41.	142,7.	4,96.
	120.	3,3.	0,14.	46,7.	1,41.	148,6.	4,96.

Localidad	Tiempo	Evento de la Invencción					
	DAP / Comparación	$\mu\text{g Cry1Ac}$ / mg de proteína total	SE	$\mu\text{g Cry1Ac}$ / g Tejido Fresco	SE	$\mu\text{g Cry1Ac}$ / g Tejido Seco	SE
	240.	2,3.	0,14.	20,9.	1,41.	72,8.	4,96.
	300.	2,8.	0,14.	30,6.	1,41.	104,0.	4,96.
	60.	3,8.	0,29.	40,8.	5,05.	179,9.	15,40.
	120.	3,3.	0,29.	68,4.	5,05.	118,3.	15,40.
Piracicaba-SP	240.	3,4.	0,29.	34,4.	5,05.	107,1.	15,40.
	300.	3,0.	0,29.	27,4.	5,05.	95,0.	15,40.
	60.	3,3.	0,15.	34,0.	2,39.	129,8.	7,89.
	120.	3,0.	0,15.	51,2.	2,39.	163,7.	7,89.
Quirinópolis-GO	240.	2,0.	0,15.	20,2.	2,39.	75,7.	7,89.
	300.	2,4.	0,15.	28,0.	2,39.	87,9.	7,89.
	60.	3,0.	0,18.	32,8.	2,91.	143,7.	10,2.
	120.	2,3.	0,18.	38,1.	2,91.	122,1.	10,2.
Valparaiso-SP	240.	2,0.	0,18.	16,7.	2,91.	62,0.	10,2.
	300.	2,7.	0,18.	30,6.	2,91.	97,3.	10,2.
	60.	3,3.	0,16.	36,3.	2,14.	147,0.	5,17.
	120.	3,0.	0,16.	50,3.	2,14.	139,5.	5,17.
Análisis Combinado	240.	2,4.	0,16.	22,7.	2,14.	77,5.	5,17.
	300.	2,8.	0,16.	29,7.	2,14.	96,1.	5,17.

[251] Los datos de expresión de Cry1Ac (hojas) del análisis combinado de 4 localizaciones del evento de la invención en un ciclo de cultivo de caña 60 y 120 DAP y caña 240 y 300 DAP (Tabla 4) se muestran en la Figura 9 (en μg proteína / g tejido seco).

[252] Los datos de expresión de la proteína Cry1Ac en tallos maduros del evento de la invención cosechados a 330 DAP se muestran en la Tabla 09.

Tabla 09: Comparación de la expresión promedio de Cry1Ac en tallos maduros del evento de la invención cosechados a 330 DAP.

Localidad / Comparación	Evento de la Invencción		
	$\mu\text{g Cry1Ac}$ / mg de Proteína Total	$\mu\text{g Cry1Ac}$ / g Tejido Fresco	$\mu\text{g Cry1Ac}$ / g Tejido Seco
Barrinha-SP	10,0.	3,9.	16,2.
Camamu-BA	7,4.	3,6.	17,1.
Piracicaba-SP	7,1.	2,5.	10,0.
Quirinópolis-GO	9,7.	3,9.	16,0.

Valparaíso-SP	10,0.	4,3.	17,6.
Error Estándar	1,1.	0,5.	2,3.

[253] Los datos de expresión de Cry1Ac en tallos maduros del evento de la invención a 330 DAP (Tabla 09) se muestran en la Figura 10 (en µg de proteína / g de tejido seco).

[254] Los datos de expresión de la proteína Pat en hojas del evento de la invención durante un año de cultivo (110, 200 y 300 DAP) para las cinco localidades evaluadas se presentan en la Tabla 10.

Tabla 10: Comparación de la expresión de Pat promedio de las hojas del evento de la invención sobre un ciclo de cultivo de caña (100, 200 y 300 DAP).

Localidad	Tiempo	Evento de la Invención					
	DAP / Comparación	µg Pat / mg de Proteína Total	SE	µg Pat/ g Tejido fresco	SE	µg Pat / g Tejido Seco	SE
Barrinha-SP	100.	0,03.	0.001.	0,20.	0.009.	0,69.	0.030.
	200.	0,01.	0.001.	0,12.	0.009.	0,37.	0.030.
	300.	0,01.	0.001.	0,16.	0.009.	0,53.	0.030.
Camamu-BA	100.	0,01.	0.001.	0,11.	0.006.	0,45.	0.022.
	200.	0,01.	0.001.	0,10.	0.006.	0,29.	0.022.
	300.	0,01.	0.001.	0,06.	0.006.	0,20.	0.022.
Piracicaba-SP	100.	0,03.	0.001.	0,26.	0.013.	0,98.	0.048.
	200.	0,01.	0.001.	0,16.	0.013.	0,52.	0.048.
	300.	0,01.	0.001.	0,14.	0.013.	0,44.	0.048.
Quirinópolis-GO	100.	0,03.	0.001.	0,15.	0.009.	0,59.	0.034.
	200.	0,01.	0.001.	0,10.	0.009.	0,30.	0.034.
	300.	0,01.	0.001.	0,11.	0.009.	0,35.	0.034.
Valparaíso-SP	100.	0,08.	0.002.	0,12.	0.011.	0,47.	0.039.
	200.	0,01.	0.002.	0,10.	0.011.	0,35.	0.039.
	300.	0,01.	0.002.	0,10.	0.011.	0,33.	0.039.
Análisis Combinado	100.	0,03.	0.003.	0,17.	0.012.	0,64.	0.045.
	200.	0,01.	0.003.	0,12.	0.012.	0,37.	0.045.
	300.	0,01.	0.003.	0,11.	0.012.	0,37.	0.045.

[255] Los datos de expresión de Pat (hojas) del evento de la invención a partir del análisis combinado de las 5 localidades durante un año de cultivo de plantas de caña (Tabla 10) se muestran en la Figura 11 (en µg de proteína / g de tejido seco).

[256] Los datos de expresión de la proteína Pat de las hojas del evento de la invención durante un ciclo de caña 60 y 120 DAP y caña 240 y 300 DAP en las cuatro localidades evaluadas se presentan en la Tabla 11.

5 Tabla 11: Comparación de la expresión de Pat foliar promedio del evento de la invención durante un ciclo de caña (60 y 120 DAP y 240 y 300 DAP).

Localidad	Tiempo	Evento de la Invención					
	DAP / Comparación	µg Pat / mg de Proteína Total	SE	µg Pat / g Tejido Fresco	SE	µg Pat / g Tejido Seco	SE
Barrinha-SP	60.	0.011.	0.001.	0,13.	0.010.	0,45.	0.033.
	120.	0.016.	0.001.	0,24.	0.010.	0,76.	0.033.
	240.	0.017.	0.001.	0,15.	0.010.	0,53.	0.033.
	300.	0.018.	0.001.	0,19.	0.010.	0,64.	0.033.
Piracicaba-SP	60.	0.013.	0.002.	0,14.	0.014.	0,52.	0.041.
	120.	0.016.	0.002.	0,21.	0.014.	0,68.	0.041.
	240.	0.023.	0.002.	0,23.	0.014.	0,70.	0.041.
	300.	0.021.	0.002.	0,19.	0.014.	0,67.	0.041.
Quirinópolis-GO	60.	0.011.	0.001.	0,12.	0.010.	0,39.	0.034.
	120.	0.009.	0.001.	0,16.	0.010.	0,52.	0.034.
	240.	0.015.	0.001.	0,14.	0.010.	0,52.	0.034.
	300.	0.017.	0.001.	0,19.	0.010.	0,60.	0.034.
Valparaíso-SP	60.	0.013.	0.001.	0,14.	0.013.	0,46.	0.045.
	120.	0.008.	0.001.	0,12.	0.013.	0,40.	0.045.
	240.	0.015.	0.001.	0,12.	0.013.	0,45.	0.045.
	300.	0.018.	0.001.	0,20.	0.013.	0,64.	0.045.
Análisis Combinado	60.	0.012.	0.001.	0,13.	0.009.	0,46.	0.031.
	120.	0.012.	0.001.	0,18.	0.009.	0,59.	0.031.
	240.	0.017.	0.001.	0,16.	0.009.	0,54.	0.031.
	300.	0.018.	0.001.	0,19.	0.009.	0,64.	0.031.

10 [257] Los datos del análisis combinado de las 4 localidades de expresión foliar evaluadas del evento de la invención durante un ciclo de cultivo de caña 60 y 120 DAP y caña 240 y 300 DAP (Cuadro 11) se muestran en la Figura 12 (en µg proteína / g tejido seco).

[258] Los datos de expresión de la proteína Pat de los tallos maduros del evento de la invención recolectados a 330 DAP se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12: Comparación de la expresión de Pat promedio de los tallos maduros del evento de la invención cosechados a 330 DAP.

Localidad / Comparación	Evento de la Invención		
	$\mu\text{g Pat} / \text{mg de proteína total}$	$\mu\text{g Pat} / \text{g Tejido Fresco}$	$\mu\text{g Pat} / \text{g Tejido Seco}$
Barrinha-SP	0.035.	0.014.	0.058.
Camamu-BA	0.028.	0.013.	0.061.
Piracicaba-SP	0.059.	0.022.	0.087.
Quirinópolis-GO	0.021.	0.009.	0.035.
Valparaíso-SP	0.034.	0.015.	0.062.
Error Estándar	0.005.	0.002.	0.006.

[259] La expresión de bar en el tallo maduro del evento de la invención a 330 DAP (Tabla 12) se muestra en la Figura 13 (en μg de proteína / g de tejido seco).

[260] Todas las muestras de raíces, de todas las parcelas y de todas las localidades, tenían valores de expresión de la proteína Cry1Ac por debajo del límite de cuantificación (<LOQ) para el protocolo de análisis previamente validado, excepto para el sitio de Quirinópolis donde una repetición experimental contenía 0.053 μg de Cry1Ac por gramo de tejido. Para la proteína Pat, los resultados mostraron que todas las muestras de todas las parcelas y localidades, sin excepción, estaban por debajo del límite de detección (<LOD) del método previamente validado.

Tabla 13: Valores de expresión de las proteínas Cry1Ac y Pat en los tejidos de la raíz del evento de la invención ($\mu\text{g} / \text{g}$ de tejido fresco).

	Tejido	Localidad	Pat
Raíz	Barrinha-SP	<LOQ	<LOD
	Piracicaba-SP	<LOQ	<LOD
	Valparaíso-SP	<LOQ	<LOD
	Quirinópolis-GO	0,053 ¹	<LOD
	Camamu-BA	<LOQ	<LOD

¹ una repetición por encima del LOQ.

[261] Los resultados obtenidos para hoja, tallo y raíces indican que el evento de la invención tiene niveles de expresión de la proteína Cry1Ac mucho más altos que la expresión de Pat. Por ejemplo, en las hojas, la expresión media de Cry1Ac durante los tiempos / sitios muestreados osciló entre 26,9 y 33,3 $\mu\text{g} / \text{g}$ de tejido fresco, mientras que la expresión media de Pat osciló entre 0,11 y 0,18 $\mu\text{g} / \text{g}$ de tejido fresco. La concentración promedio de Cry1Ac de las hojas del evento de la invención a lo largo del ciclo de la caña de azúcar se mantuvo constante (o disminuyó levemente)

durante los tiempos de recolección de 100, 200 y 300 DAP, con concentraciones de 26,9, 29,8 y 33,3 $\mu\text{g} / \text{g}$ de tejido fresco, respectivamente. Los niveles de expresión de Pat fueron mayores a 100 DAP (0,17 $\mu\text{g} / \text{g}$ de tejido fresco) y disminuyeron estadísticamente a 200 y 300 DAP con una media de 0,12 y 0,11 $\mu\text{g} / \text{g}$ de tejido fresco, respectivamente.

[262] El análisis de expresión de las hojas no reveló diferencias proteicas relevantes en relación con los sitios de plantío. Por ejemplo, la expresión promedio de Cry1Ac en caso de que se abandone la invención en las cinco localidades varió de 24,2 a 31,1 $\mu\text{g} / \text{g}$ de tejido fresco (100 DAP), 22,1 a 35,8 $\mu\text{g} / \text{g}$ de tejido fresco (200 DAP) y 27,5 a 44,1 $\mu\text{g} / \text{g}$ de tejido fresco (300 DAP). Los valores correspondientes para la expresión de Pat fueron: 0,11 a 0,25 $\mu\text{g} / \text{g}$ de tejido fresco (100 DAP), 0,10 a 0,16 $\mu\text{g} / \text{g}$ de tejido fresco (200 DAP) y 0,06 a 0,16 $\mu\text{g} / \text{g}$ de tejido fresco (300 DAP).

[263] Los datos de expresión del tallo recogidos a 330 DAP mostraron que los niveles de expresión de Cry1Ac y Pat eran 3,65 $\mu\text{g} / \text{g}$ de tejido fresco y 0,01 $\mu\text{g} / \text{g}$ de tejido fresco, respectivamente. La expresión promedio de Cry1Ac a 330 DAP en las cinco localidades osciló entre 2,53 y 4,27 $\mu\text{g} / \text{g}$ de tejido fresco.

[264] Los datos de expresión de las proteínas Cry1Ac y Pat en las raíces del evento de la invención indican que estas proteínas están muy poco expresadas en este tejido y no pueden identificarse / cuantificarse con precisión. Solo se estimó la concentración de una Cry1Ac repetida en Quirinópolis (0,053 μg de Cry1Ac por gramo de raíz fresca). Todas las demás muestras estaban por debajo del LOD y / o LOQ según la metodología ELISA empleada.

[265] También se evaluó el efecto del recorte sobre los niveles de expresión. Se recolectaron muestras de hojas a 60 y 120 DAP, los tallos se cortaron para imitar un cultivo a 180 DAP y se volvieron a muestrear a los 60 y 120 días después del corte (o 240 y 300 DAP). Las concentraciones promedio combinadas de Cry1Ac en todos los sitios durante estos períodos de recolección fueron 36,2 y 51,1 $\mu\text{g} / \text{g}$ (60 y 120 DAP) y 23,1 y 29,2 $\mu\text{g} / \text{g}$ de tejido fresco (240 y 300 DAP). Los niveles de expresión de Pat fueron 0,11 y 0,18 (60 y 120 DAP) y 0,16 y 0,19 (240 y 300 DAP). Tomados en conjunto, los rangos de expresión de la proteína Cry1Ac y Pat (bar) son consistentes con los datos de expresión del experimento discutido anteriormente (100, 200 y 300 DAP) y sugieren que los niveles de expresión después del cizallamiento son similares a los niveles de expresión antes del corte.

[266] La aparente caída en los niveles de expresión de Cry1Ac después del cizallamiento, en comparación con las concentraciones de Cry1Ac antes del

cizallamiento, probablemente se deba a la variabilidad de la muestra. Es importante señalar que los niveles de expresión de Cry1Ac en el experimento descrito anteriormente (100, 200 y 300 DAP), que se realizó en paralelo con este experimento (en el campo y en el laboratorio), oscilaron entre 26,9 y 29,8 µg / g. tejido fresco. Sin embargo, los niveles de expresión de Cry1Ac en este experimento fueron numéricamente más altos, 36,2 y 51,1 µg / g de tejido fresco (60 y 120 DAP), dando la impresión de una disminución de la expresión después del corte. Se sabe que los valores de expresión en varias culturas pueden variar en diferentes momentos de muestreo debido a la variabilidad experimental. La conclusión general de los datos de expresión a 100, 200 y 300 DAP (26,9 a 33,3 µg / g de tejido fresco) se replicó en los puntos de recogida después del corte, 240 a 300 DAP (22,7 a 29,7 µg / g de tejido fresco). Los valores de expresión más altos a 60 y 120 DAP del experimento de evaluación de caña de azúcar pueden atribuirse a la variabilidad experimental y probablemente no indican una reducción significativa de los niveles de expresión de Cry1Ac después de cortar el evento de la invención.

[267] Por tanto, se concluye que los niveles de expresión de las proteínas Cry1Ac y Pat del evento de la invención se caracterizaron en diferentes momentos, tejidos y sitios de plantío representativos de su cultivo en Brasil. Los niveles de expresión de la proteína Cry1Ac en las hojas del evento de la invención permanecen altos durante todo el ciclo de cultivo, asegurando el efecto pretendido de resistencia a *Diatraea saccharalis*. Los niveles de expresión de las proteínas Cry1Ac y Pat en los tallos del evento de la invención son muy bajos y, por tanto, la exposición alimentaria a través del consumo de caldo o productos derivados a proteínas heterólogas será mínima.

25 **Western blot**

[268] Para la identificación de las proteínas heterólogas expresadas por el evento de la invención se utilizaron 50 mg de hoja congelada en nitrógeno líquido. La maceración se realizó en el equipo TissueLyser durante 10 minutos a 25Hz, con la adición de tres perlas de acero (3mm - Qiagen). Al tejido macerado, se le añadieron 750 µl de tampón de extracción de fosfato salino (PBS) suplementado con Tween 20 (NaCl 0,138 M; KCl 0,027 mM; Tween 20 al 0,05%, pH 7,4) diluido según las instrucciones del fabricante (Envirologix™, EE. UU.). Después de la adición del tampón, se realizó la homogeneización en vórtice y la mezcla se centrifugó durante 10 minutos a 9.500 RPM a 4°C. Se recogió el sobrenadante resultante y se cuantificó la proteína total.

[269] La cuantificación adoptada para el análisis de las proteínas Cry1Ac y Pat se realizó de acuerdo con las recomendaciones del kit de ensayo de proteínas ThermoScientific™ Coomassie Plus (Bradford) (23236) - Procedimiento de microplaca. Por tanto, los estándares utilizados para obtener la curva de calibración fueron los estándares comerciales de BSA (Albúmina de Suero Bovino) ya diluidos suministrados con el kit descrito anteriormente. Se utilizaron los calibradores 2000, 1000, 500, 250, 125 y 0 µg/ml preparados en tampón PBST. Se añadieron 10 µl de cada calibrador estándar a los pocillos de la placa por triplicado. Las placas se taparon y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia se leyó a 595 nanómetros (nm) usando el software SoftmaxPro 7.0 (Dispositivo Molecular). Después de la extracción de proteína total, se mezclaron 2,5 µg de extracto de proteína con tampón de muestra 2X Laemmli (Bio-Rad, EE.UU.) y se sometió a desnaturalización mediante calentamiento a 100°C durante 5 minutos.

[270] Como control negativo de la presencia de proteínas heterólogas se utilizaron 2,5 µg de extracto proteico de la variedad parental convencional (WT). Además, se prepararon controles positivos para detectar proteínas Cry1Ac y Pat. El primer control positivo se preparó utilizando 50 ng de proteína Cry1Ac sintetizada internamente purificada de CTC o 1 ng de proteína de barra purificada disponible comercialmente (Novoprotein, EE. UU.), diluida en una solución de proteína total extraída de hojas de variedades parentales convencionales (WT). El segundo control positivo se preparó diluyendo 5 ng de proteína Cry1Ac purificada (GenScript, EE. UU.) O 1 ng de proteína de barra (Novoprotein, EE. UU.) En tampón de extracción PBST. Alternativamente, se agregaron otros controles positivos al ensayo, como maíz Bt11 comercial y otro evento de caña de azúcar modificado genéticamente que contenía las mismas proteínas en el análisis.

[271] Las muestras se desnaturalizaron y aplicaron en gel de poliacrilamida al 4-20% (Mini-PROTEAN® TGXTM Precast Gel) sumergido en tampón de ejecución Tris / glicina / SDS (Bio-Rad, EE. UU.) Y se separaron por electroforesis a 50 V durante 5 minutos y luego a 120 V durante aproximadamente 90 minutos. A continuación, los geles de poliacrilamida se equilibraron en Tris / Glycine Transfer Buffer (Bio-Rad, EE.UU.), que se añadió con metanol al 20% durante 10-15 minutos. La membrana de PVDF se trató con metanol absoluto. El sistema de transferencia se montó en un recipiente lleno con el Tampón de Transferencia frío para la transferencia por inmersión ("transferencia húmeda") a un voltaje constante de 50 V durante 3 horas. Una vez completada la transferencia, la membrana se bloqueó durante 16 horas a 4° C, bajo agitación constante, en solución de bloqueo [5% de leche desnatada en polvo

(Bio-Rad, EE. UU.) Y TBS / T (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% Tween20)] para evitar una posible unión inespecífica a la membrana.

[272] En el siguiente paso, la membrana se incubó con el anticuerpo primario durante 90 minutos para detectar y confirmar la presencia e integridad de las proteínas Cry1Ac y Pat. Los anticuerpos policlonales usados en este ensayo fueron de conejo Anti-Cry1Ab (Fitzgerald, EE.UU.), que se unen a las proteínas Cry1Ac y Cry1Ab; y Anti-Bar de conejo (Abcam, EE. UU.), que reacciona con la proteína PAT / Bar, diluida 1: 100 en TBS / T (v/v).

[273] La membrana se lavó en 3 ciclos de 5 minutos (3x5) en TBS/T y se incubó con anticuerpo secundario anti-conejo (Sigma) conjugado con HRP producido en cabra a una concentración de 1: 20.000 o en una concentración de 1:5.000 - v/v (Fitzgerald) durante 60 minutos. Después de las incubaciones, la membrana se lavó de nuevo con TBS / T (3 x 5 minutos) y el inmunoensayo ligado a enzima se verificó en películas de rayos X Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare, EE. UU.) mediante la reacción del sustrato del kit Clarit Western ECL Substrate Kit (Biorad, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La exposición de la película de rayos X a la membrana osciló entre 15 segundos y 3 minutos.

[274] Los resultados revelaron que el perfil de expresión de la proteína Cry1Ac aparece como dos bandas inmunorreactivas de peso molecular casi idénticas de ~ 69 y ~ 66 kDa, comúnmente llamadas dobletes, en las muestras R1 y R2 (Figura 14). Ambas muestras son réplicas biológicas del evento de la invención, obtenidas de dos parcelas experimentales en el Polo Piracicaba. Los pares de proteínas generalmente provienen de la eliminación de residuos de aminoácidos terminales por las proteasas. Como era de esperar, el control negativo (NC) a su vez no mostró inmunorreactividad. El control negativo consistió en muestras de proteína total extraídas de la variedad parental. Las bandas de aproximadamente 69 y 66 kDa también están presentes en el control positivo 1 (CP1) donde se añadió la proteína Cry1Ac purificada internamente con CT1 (50 ng) a la proteína total extraída del cultivo parental. Se observan algunas bandas extra de menor peso molecular (entre 50 y 30 kDa) en el control positivo 1 (CP1). Estas bandas son visibles, posiblemente, porque la proteína Cry1Ac utilizada como control se ha purificado parcialmente (34% de pureza) con otras proteínas bacterianas. El control positivo 2 (CP2) consistió en proteína comercial Cry1Ac (5ng) (GeneScript) diluida en tampón de extracción PBST. Esta proteína se ha aislado con una pureza > 95% y tiene una sola banda del peso esperado.

[275] Se han agregado otros controles positivos a la membrana. Se utilizó una muestra de proteína total extraída de hojas de maíz Bt11 (Syngenta, EE. UU.) como control positivo para el experimento (CP3). Esto es posible porque los anticuerpos policlonales usados en el ensayo de transferencia Western también son capaces de reaccionar con proteínas Cry1Ab. Como era de esperar, el doblete Cry1Ab fue visible en la muestra de maíz Bt11 (CP3), así como en otras bandas de pesos de 40 y 30 kDa, aceptadas como producto de roturas proteolíticas intracelulares de proteínas Cry en hojas de plantas. El control positivo 4 (CP4) consistió en proteínas totales extraídas de otro evento de caña de azúcar que expresa Cry1Ac. Una vez más, el perfil de la proteína Cry1Ac aparece como un doblete. En las hojas no se observaron otras bandas que indiquen proteína Cry1Ac parcial o proteína de fusión de mayor peso molecular.

[276] La proteína codificada por el gen de selección bar también se detectó mediante un ensayo de transferencia Western. Aunque Pat se expresa a niveles más bajos que la proteína Cry1Ac, los ensayos de transferencia Western demostraron la presencia de una banda inmunorreactiva con el tamaño esperado de 22 kDa en todas las réplicas biológicas usadas del evento de la invención (Figura 15).

[277] Se agregaron dos controles positivos a la membrana. El control positivo 1 (CP1) corresponde a 1 ng de proteína bar purificada (Novoprotein, China) diluida en extracto de proteína de la variedad parental. El control positivo 2 (CP2) es la misma proteína diluida en tampón de extracción PBST. La banda de diagnóstico correspondiente a la proteína bar está presente en ambos controles a la altura esperada y es idéntica a la banda presente en el evento de la invención, confirmando su identidad.

[278] Además de la banda correspondiente a la proteína Pat, es posible observar la presencia de bandas a los pesos aproximados de 37kDa y 50kDa en todas las muestras excepto la proteína purificada diluida en el tampón de extracción PBST (CP2). La presencia de tales bandas en el control positivo 1 es indicativa de un artefacto, probablemente generado por la unión de anticuerpos inespecíficos a proteínas endógenas de la caña de azúcar.

[279] Por lo tanto, se concluye que la identidad de las proteínas Cry1Ac y Pat expresadas por el evento de la invención fue confirmada por Western Blot. Las proteínas expresadas por el evento de la invención son del tamaño esperado y no se encontró evidencia de proteínas truncadas / fusionadas expresadas por dicho evento.

Ejemplo 5. Ensayos biológicos: Susceptibilidad al barrenador de la caña de azúcar (*D. saccharalis*)

[280] Los ensayos biológicos (bioensayos) con la plaga diana *D. saccharalis* (barrenador de la caña) también se pueden utilizar para la detección y caracterización del evento CTC91087-6, demostrando la eficacia en el control de plagas proporcionada por la proteína insecticida Cry1Ac expresada. Se pueden contemplar diferentes bioensayos dentro del alcance de la presente invención: por ejemplo, Ensayo de Discos Foliare, Bioensayos en Invernadero de Malla, Ensayos de Dilución de Tejido, entre otros.

[281] Para el ensayo de discos foliares, se recolectaron hojas de plantas del evento CTC91087-6, se cortaron en discos de 16 mm² y se distribuyeron en placas de bioensayo que contenían agar gelificado. Cada pocillo de las placas de cultivo se infestó con *D. saccharalis* (0-24 h de edad) recién nacido y se incubó a 27 ± 1° C, humedad relativa 60 ± 10% y fotoperiodo 12h: 12h (claro: oscuro) por un período de 7 días. Al final de la incubación, se evaluó la mortalidad larvaria y la inhibición del desarrollo larvario de los individuos supervivientes y se calculó la eficacia relativa (Eficacia relativa = (1-Mtc / Mev) x100). Las larvas supervivientes se sometieron a análisis de imágenes mediante el software Digimizer (v 4.6.1) para la evaluación del estadio larvario según el ancho de la cápsula cefálica. Las larvas que no alcanzaron el primer estadio se consideraron muertas. Las variedades de caña de azúcar no transgénicas que son genéticamente muy similares al evento transgénico evaluado pueden usarse como controles de ensayo.

[282] Para caracterizar la eficacia del evento en el control de la plaga diana *D. saccharalis* en laboratorio, se realizaron ensayos de disco foliar con tejido vegetal del evento CTC91087-6 (dos etapas fenológicas, 110 y 220 DAP). Se utilizó como control (WT) caña de azúcar no transgénica CTC9001. El diseño experimental fue completamente aleatorio con cuatro repeticiones por tratamiento (112 neonatos por repetición). Se observó un promedio de 96% (gl = 4; P <0,0001) de tasa de mortalidad al comparar la variedad convencional (CTC9001) y el evento CTC91087-6 después de 7 días de alimentación con discos foliares. Además, con base en la medición del ancho de la cápsula cefálica, se observó que el 100% de los individuos sobrevivientes no se desarrollaron más allá del primer estadio, evidenciando una alta supresión en el desarrollo de *D. saccharalis* luego de alimentarse con el evento transgénico (Figura 17).

[283] Para los bioensayos de invernadero de malla fina, las plántulas del evento transgénico se plantan en un vivero con malla, donde las plantas se plantan en el suelo de manera similar a las condiciones ambientales naturales, pero en un ambiente controlado para prevenir la aparición de infestaciones naturales. Se realizan al menos 5 infestaciones cada 20 o 30 días, que contienen de 20 a 35 huevos de *Diatraea saccharalis* por macollo. La evaluación ocurre cuando se recolectan todos los tallos infectados y se cortan longitudinalmente para cuantificar el daño. La intensidad de infestación se calcula dividiendo el número de entrenudos dañados por el número total de entrenudos, y el resultado se multiplicó por 100 (intensidad de infestación). Se calculó el Porcentaje de Daño Efectivo, considerando el total de entrenudos con daño causado por el insecto dividido por el número total de tallos evaluados en la parcela.

[284] Se realizaron ensayos de invernadero de malla fina para caracterizar la eficacia del evento CTC91087-6 en el control del ataque del barrenador en comparación con su variedad parental CTC9001 (WT; no transgénica) en un diseño de bloques al azar, con 4 repeticiones. Cada parcela experimental estuvo compuesta por ocho racimos de caña-planta que recibieron 10 infestaciones artificiales con aproximadamente 30 huevos de *D. saccharalis* cada 15 días. A los ocho meses se calculó la Intensidad de Infestación (II) y el Daño efectivo para ambas variedades. La eficacia relativa en el control de la infestación y el daño por el evento CTC91087-6 se calculó mediante la fórmula $[100 - (\text{evento II} * 100) / \text{WT II Media}]$.

[285] Bajo la infestación artificial el evento CTC91087-6 presentó una eficacia relativa en el control de la infestación por *D. saccharalis* superior al 99,6% y en el control del daño del tallo (longitud) superior al 99,9% en relación a su variedad parental no transgénica CTC9001 (WT). El daño causado por *D. saccharalis* en los tallos de CTC91087-6 fue visiblemente menor que en la caña de azúcar convencional CTC9001 (Figura 18). Hubo diferencias estadísticamente (t-test, $P < 0.05$) entre CTC91087-6 y la variedad no transgénica CTC9001 en ambos parámetros evaluados ($df = 16$; $P < 0.0001$), mostrando que bajo infestación masiva con *D. Saccharalis* el evento suprimió los daños causados por la plaga.

[286] En la producción convencional de caña de azúcar, *D. saccharalis* se considera controlada cuando la intensidad de la infestación es inferior al 3% (Gallo et al., 2002). Para CTC91087-6, la intensidad de la infestación fue inferior al 0,01%, lo que refuerza la efectividad del evento para controlar su principal plaga objetivo.

[287] Además de emplear bioensayos que usan infestaciones artificiales para observar el grado de infestación y daño causado por *D. saccharalis*, también se pueden realizar observaciones de infestación y porcentaje de daño con base en información recopilada directamente de los campos donde se cultiva el evento

5 CTC91087-6. La II (Intensidad de la Infestación), por ejemplo, se puede calcular para la evaluación de la infestación natural definiendo un área experimental para el muestreo del tallo, cortando y cuantificando el número de entrenudos con y sin daños para obtener la intensidad de la infestación (II).

[288] En las pruebas realizadas para el desarrollo del evento de la invención,

10 se calculó la intensidad de infestación (II) en cuatro áreas experimentales: Piracicaba, Barrinha y Valparaíso (SP) y Quirinópolis (GO). Se utilizó como control la variedad convencional CTC 9001 (parental; no transgénica). Este ensayo ilustra la resistencia del evento CTC91087-6 a la infestación por *D. saccharalis* en comparación con la variedad parental (CTC9001): se observó una menor intensidad de infestación para

15 las plantas CTC91087-6 en comparación con la variedad parental (CTC 9001 = WT) en las cuatro áreas experimentales (análisis combinado; Figura 16).

[289] Habiendo descrito ejemplos de formas de realización preferidas, debe entenderse que el alcance de la presente invención abarca otras posibles variaciones y está limitado únicamente por el contenido de las reivindicaciones adjuntas, incluidas

20 las posibles equivalentes de las mismas.

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido caracterizado porque comprende al menos 14 nucleótidos contiguos de la SEC ID nro.: 18.

5 2. El polinucleótido según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de la SEC ID nro.: 18.

3. El polinucleótido según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende al menos 16 nucleótidos contiguos de la SEC ID nro.: 18.

10 4. El polinucleótido según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende la SEC ID nro.: 18.

5. El polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque comprende la SEC ID nro.: 13.

6. Un polinucleótido caracterizado porque comprende al menos 14 nucleótidos contiguos de la SEC ID nro.: 19.

15 7. El polinucleótido según la reivindicación 6 que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de la SEC ID nro.: 19.

8. El polinucleótido según la reivindicación 6 caracterizado porque comprende al menos, 16 nucleótidos contiguos de la SEC ID nro.: 19.

20 9. El polinucleótido según la reivindicación 6 caracterizado porque comprende la SEC ID nro.: 19.

10. El polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, caracterizado porque comprende la SEC ID nro.: 12.

11. El polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque comprende la SEC ID nro.: 5.

25 12. El polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque comprende la SEC ID nro.: 22.

13. Pares de cebadores que comprenden cebadores directos e inversos caracterizados porque el cebador directo comprende la SEC ID nro.: 6 y el cebador inverso comprende la SEC ID nro.: 7, o el cebador directo comprende la SEC ID nro.: 8 y el cebador inverso comprende la SEC ID nro.: 9.

30

14. Un método para detectar material vegetal de la caña de azúcar modificada genéticamente del evento CTC91087-6, que comprende las etapas de:

a) obtener una muestra de material vegetal para su análisis;

b) extraer ADN de la muestra;

5 c) proporcionar pares de cebadores que comprenden al menos un cebador directo y uno inverso;

d) amplificar una región entre el par de cebadores; y

e) detectar la presencia de un producto a partir de la amplificación.

10 15. El método según la reivindicación 14, caracterizado porque los pares de cebadores en la etapa c) están diseñados para unirse a un polinucleótido que comprende nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste en la SEC ID nro.: 22, y SEC ID nro.: 29, caracterizado porque al menos un par de cebadores comprende secuencias de nucleótidos contiguas seleccionadas del grupo que consiste en la SEC ID nro.: 23, la SEC ID nro.: 24, la SEC ID nro.: 30, y la
15 SEC ID nro.: 31.

16. El método según la reivindicación 14, caracterizado porque los pares de cebadores en la etapa c) están diseñados para unirse a un polinucleótido que comprende nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste en la SEC ID nro.: 22, y la SEC ID nro.: 29, donde al menos un par de
20 cebadores consiste en un primer cebador que comprende nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 23, la SEC ID nro.: 24, la SEC ID nro.: 30, y la SEC ID nro.: 31 y un segundo cebador que comprende nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 2, y la SEC ID nro.: 36.

25 17. El método según la reivindicación 14, caracterizado porque los pares de cebadores en la etapa c) están diseñados para unirse a un polinucleótido que comprende nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 5 y la SEC ID nro.: 37, en el que al menos un par de cebadores comprende nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo
30 que consiste de la SEC ID nro.: 3, la SEC ID nro.: 4, la SEC ID nro.: 38, y la SEC ID nro.: 39.

18. El método según la reivindicación 14, caracterizado porque los pares de cebadores en la etapa c) están diseñados para unirse a un polinucleótido que comprende nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 5, y la SEC ID nro.: 37, caracterizado porque al menos un par de cebadores consiste en un primer cebador que comprende nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 3, la SEC ID nro.: 4, la SEC ID nro.: 38, y la SEC ID nro.: 39 y un segundo cebador que comprende nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste de la SEC ID nro.: 2, y la SEC ID nro.: 36.

19. El método según la reivindicación 14, caracterizado porque el cebador directo comprende la SEC ID nro.: 6 y el cebador inverso comprende la SEC ID nro.: 7, o el cebador directo comprende la SEC ID nro.: 8 y el cebador inverso comprende la SEC ID nro.: 9.

20. El método según la reivindicación 14, caracterizado porque el producto a partir de la amplificación comprende la SEC ID nro.: 12 o la SEC ID nro.: 13.

21. El método según la reivindicación 14, caracterizado porque la detección del producto a partir de la amplificación se realiza mediante la hibridación de una sonda que comprende la SEC ID nro.: 10 o la SEC ID nro.: 11.

22. Un método para detectar material a partir de la caña de azúcar modificada genéticamente del evento CTC91087-6, que comprende las etapas de:

a) obtener una muestra de material vegetal para su análisis;

b) extraer ADN o RNA de la muestra;

c) proporcionar una sonda diseñada para unirse a un polinucleótido que comprende 14 o más nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste en la SEC ID nro.: 18, SEC ID nro.: 19, SEC ID nro.: 32, y la SEC ID nro.: 33;

d) hibridación de dicha sonda con la muestra; y

e) detectar la hibridación real de la sonda.

23. Un kit para detectar material a partir de caña de azúcar transgénica que comprende una proteína Cry1Ac (evento CTC91087-6) que comprende un medio para detectar la presencia de un polinucleótido que comprende, al menos, 14 nucleótidos

contiguos de la SEC ID nro.: 18, y/o de SEC ID nro.: 19 y / o una proteína cristal
pesticida (Cry),

24. Un kit según la reivindicación 23, caracterizado porque los medios
comprenden pares de cebadores diseñados para unirse a un polinucleótido que
comprende nucleótidos contiguos de secuencias seleccionadas del grupo que
consiste de la SEC ID nro.: 22, y la SEC ID nro.: 29, caracterizado porque al menos
un par de cebadores comprende secuencias de nucleótidos contiguas seleccionadas
del grupo que consiste en la SEC ID nro.: 23, SEC ID nro.: 24, SEC ID nro.: 30, y la
SEC ID nro.: 31.

25. Un kit según la reivindicación 23, caracterizado porque los medios
comprenden una sonda que incluye la SEC ID nro.: 10 o la SEC ID nro.: 11.

26. Construcción genética que comprende la SEC ID nro.: 1.

27. Construcción genética según la reivindicación 26, que comprende la
SEC ID NO: 14.

28. Una planta de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) modificada
genéticamente que comprende la SEC ID nro.: 18 o la SEC ID nro.: 19.

29. Una planta de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) modificada
genéticamente que comprende la SEC ID nro.: 12 o la SEC ID nro.: 13.

30. Una planta de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) modificada
genéticamente que comprende la SEC ID nro.: 5 o la SEC ID nro.: 22, caracterizada
porque la planta es resistente a insectos.

31. Una parte de la planta, una célula vegetal, un tejido vegetal o una semilla
de la planta de caña de azúcar modificada genéticamente (*Saccharum spp.*), en la que
dicha parte de la planta, célula vegetal, tejido vegetal o semilla comprenden la SEC
ID nro.:18 o SEC ID nro.: 19.

32. Un cultivo de tejidos de la planta de caña de azúcar modificada
genéticamente (*Saccharum spp.*) según la reivindicación 28.

33. Una planta de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) modificada
genéticamente regenerada a partir del cultivo de tejidos según la reivindicación 32,
caracterizada porque la planta regenerada comprende la SEC ID nro.: 18 o la SEC ID
nro.: 19.

34. Uso de plantas, células vegetales, partes de plantas o semillas de la planta de caña de azúcar modificada genéticamente (*Saccharum spp.*) según la reivindicación 28, en la que dicho uso está destinado a regenerar plantas, producir semillas o cultivar un campo de plantas, o fabricar un producto de planta.

5 35. Un producto básico elaborado a partir de la planta de caña de azúcar modificada genéticamente (*Saccharum spp.*) según la reivindicación 28.

36. Un método para producir una planta de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) modificada genéticamente a partir del evento CTC91087-6, que comprende las etapas de:

10 a) introducir una construcción genética que comprende la SEC ID nro.: 20, y la SEC ID nro.: 21, dentro de una cepa de *Agrobacterium*;

b) obtención de callos embriogénicos a partir de rollos de hojas inmaduras o tallos superiores de caña de azúcar (*Saccharum spp.*);

c) co-cultivo de callos embriogénicos con un cultivo de *Agrobacterium*;

15 d) seleccionar células transformadas que contienen el fragmento funcional en medio de cultivo que contiene glufosinato de amonio; y

e) regenerar plantas de caña de azúcar transformadas, caracterizadas porque las plantas de caña de azúcar modificadas genéticamente comprenden la SEC ID nro.: 20, y la SEC ID nro.: 21.

20 37. Una parte de una planta, una célula vegetal, un tejido vegetal o una semilla de las plantas de caña de azúcar modificadas genéticamente según la reivindicación 36.

38. Un método para producir una planta de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) resistente a insectos que comprende cruzar una primera planta de caña de azúcar con
25 una segunda planta de caña de azúcar, en donde la segunda planta de caña de azúcar es la planta según la reivindicación 28, y producir plantas de caña de azúcar descendientes de la misma.

39. Una planta de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) y partes de plantas, células vegetales, tejidos vegetales o semillas de las mismas producidos por el
30 método según la reivindicación 38.

40. Un método para generar una planta de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) modificada genéticamente del evento CTC91087-6, que comprende introducir una modificación genética en una planta de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) que comprende la SEC ID NO: 5 o la SEC ID nro.: 22 para producir una planta de caña de
5 azúcar (*Saccharum spp.*) modificada genéticamente del evento CTC91087-6, en la que la planta de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) modificada genéticamente tiene una resistencia mejorada a los insectos en comparación con una planta de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) sin la modificación genética.

41. Un método de cultivo de una planta de caña de azúcar (*Saccharum spp.*)
10 modificada genéticamente del evento CTC91087-6, que comprende hacer crecer una planta de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) modificada genéticamente del evento CTC91087-6 que comprende la SEC ID nro.: 5 o la SEC ID nro.: 22 en condiciones que comprenden infestación de insectos, caracterizada porque la planta de caña de
15 azúcar (*Saccharum spp.*) modificada genéticamente tiene un aumento en la resistencia a los insectos en comparación con una planta de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) sin la modificación genética cultivada en las mismas condiciones.

42. Una planta de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) modificada genéticamente del evento CTC91087-6 que comprende la SEC ID nro.: 5 o la SEC ID nro.: 22.

RESUMEN

Patente de Invención: **“POLINUCLEÓTIDOS, CEBADORES Y MÉTODOS PARA DETECCIÓN DE EVENTOS TRANSGÉNICOS, CONSTRUCCIÓN GENÉTICA, KIT PARA DETECCIÓN DE MATERIAL A PARTIR DE UNA MUESTRA DE PLANTA, EVENTO CTC91087-6, PLANTA DE CAÑA DE AZÚCAR RESISTENTE A INSECTOS Y MÉTODO PARA PRODUCIR UNA PLANTA DE CAÑA DE AZÚCAR RESISTENTE A INSECTOS, CÉLULA DE PLANTA, PARTE DE PLANTA O SEMILLA”.**

La presente invención se refiere al campo de la biotecnología. Más precisamente, una construcción genética y un método para producir un evento vegetal transgénico, especialmente un evento de la caña de azúcar (*Saccharum spp.*), que es resistente a la infestación por la plaga *Diatraea saccharalis*, conocida popularmente como plaga, se describe como barrenador común, barrenador de la caña o simplemente barrenador. La invención describe el evento, los métodos para la identificación del evento, así como el método de detección de inserción basado en la región única de intersección entre el inserto y el genoma del hospedador y las regiones flanqueantes que lo caracterizan.