

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 816 640**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.03.2013 PCT/US2013/034374**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2013 WO13149018**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2013 E 13715578 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2020 EP 2831243**

54 Título: **Evento de maíz DP-004114-3 y métodos para la detección del mismo**

30 Prioridad:

24.04.2012 US 201261617990 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

05.04.2021

73 Titular/es:

**PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL INC. (50.0%)
7100 N.W. 62nd Avenue
Johnston, IA 50131-1014, US y
E. I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**ALARCON, CLARA M.;
HARMON, MATTHEW C.;
PASCUAL, MARIA ALEJANDRA;
REGISTER, JAMES C., III;
SCELONGE, CHRISTOPHER J.;
YOUNG, JOSHUA K. y
ZHONG, CATHY XIAOYAN**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 816 640 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Evento de maíz DP-004114-3 y métodos para la detección del mismo

5 REFERENCIA AL LISTADO DE SECUENCIAS ENVIADO ELECTRÓNICAMENTE

La copia oficial del listado de secuencias se remite electrónicamente mediante EFS-Web como un listado de secuencias en formato ASCII con un archivo denominado "5251_PCT_sequence_listing.txt", creado el 8 de marzo de 2013 y que tiene un tamaño de 51 kilobytes y se presenta concurrentemente con la memoria descriptiva. El listado de secuencias contenido en este documento en formato ASCII forma parte de la memoria descriptiva.

Campo de la invención

Las realizaciones de la presente invención se refieren al campo de la biología molecular vegetal, específicamente, divulga construcciones de ADN para conferir resistencia a insectos a una planta. Las realizaciones de la invención se refieren más específicamente a ensayos para detectar la presencia del evento de maíz resistente a insectos DP-004114-3 en una muestra y a composiciones del mismo.

Antecedentes de la invención

La presente divulgación se refiere a la planta de maíz (*Zea mays*) resistente a insectos DP-004114-3, también denominada "línea de maíz DP-004114-3", "evento de maíz DP-004114-3", y "maíz 4114" y a la construcción de expresión de ADN vegetal de la planta de maíz DP-004114-3 y a la detección del transgén/región flanqueante de inserción en la planta de maíz DP-004114-3 y la descendencia de la misma. El documento WO2011/084621 se refiere al evento de maíz DP-004114-3 y a métodos de detección del mismo.

El maíz es un cultivo importante y es una fuente de alimento primaria en muchas áreas del mundo. El daño causado por plagas de insectos es un factor importante en la pérdida mundial de cultivos de maíz, a pesar del uso de medidas protectoras, tales como plaguicidas químicos. En vista de esto, se ha introducido por ingeniería genética resistencia a insectos en cultivos tales como maíz para controlar el daño por insectos y para reducir la necesidad de plaguicidas químicos tradicionales. Un grupo de genes que se ha utilizado para la producción de cultivos transgénicos resistentes a insectos es el grupo de delta-endotoxina de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). Las delta-endotoxinas se han expresado con éxito en plantas de cultivo, tales como algodón, patatas, arroz, girasol, así como maíz y han mostrado que proporcionan un control excelente frente a plagas de insectos. (Perlak, F.J. *et al.* (1990) *Bio/Technology* 8:939-943; Perlak, F.J. *et al.* (1993) *Plant Mol. Biol.* 22:313-321; Fujimoto, H. *et al.* (1993) *Bio/Technology* 11:1151-1155; Tu *et al.* (2000) *Nature Biotechnology* 18:1101-1104; Publicación PCT WO 01/13731; y Bing, J.W. *et al.* (2000) *Efficacy of Cry1F Transgenic Maize, 14th Biennial International Plant Resistance to Insects Workshop, Fort Collins, CO*).

Se sabe que la expresión de genes exógenos en plantas está influenciada por su ubicación en el genoma de la planta, quizá debido a la estructura de la cromatina (por ejemplo, heterocromatina) o a la proximidad de elementos reguladores transcripcionales (por ejemplo, potenciadores) próximos al sitio de integración (Weising *et al.* (1988) *Ann. Rev. Genet.* 22:421-477). Al mismo tiempo, la presencia del transgén en diferentes ubicaciones en el genoma influenciará de diferentes maneras al fenotipo general de la planta. Por este motivo, normalmente es necesario detectar sistemáticamente un gran número de eventos para identificar un evento caracterizado por la expresión óptima de un gen de interés introducido. Por ejemplo, en plantas y otros organismos se ha observado que puede haber una gran variación en los niveles de expresión de un gen introducido entre diferentes eventos. También puede haber diferentes patrones de expresión espacial o temporal, por ejemplo, diferencias en la expresión relativa de un transgén en diversos tejidos vegetales, que pueden no corresponder a los patrones esperados de los elementos reguladores transcripcionales en la construcción génica introducida. Por este motivo, es común producir de cientos a miles de diferentes eventos y detectar sistemáticamente estos eventos para detectar un solo evento que tiene los niveles y patrones de expresión deseados del transgén para fines comerciales. Un evento que tiene niveles o patrones deseados de expresión del transgén es útil para introgresar el transgén en otros fondos genéticos mediante cruzamiento sexual usando métodos de fitomejoramiento convencionales. La descendencia de dichos cruces mantiene las características de expresión del transgén del transformante original. Esta estrategia se usa para asegurar una expresión génica fiable en diversas variedades que están adaptadas a las condiciones de crecimiento locales.

Sería ventajoso ser capaz de detectar la presencia de un evento particular para determinar si la descendencia de un cruzamiento sexual contiene un transgén de interés. Además, sería útil un método para detectar un evento particular para cumplir con las regulaciones que requieren la aprobación y el marcaje precomercial de alimentos provenientes de plantas de cultivo recombinantes, por ejemplo o para su uso en el monitoreo ambiental, el monitoreo de rasgos en cultivos en el campo o el monitoreo de productos procedentes de la cosecha de un cultivo, así como para su uso para garantizar el cumplimiento de las partes sometidas a términos regulatorios o contractuales.

Es posible detectar la presencia de un transgén mediante cualquier método de detección de ácido nucleico incluyendo, pero sin limitación, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o hibridación de ADN usando sondas de ácidos nucleicos. Estos métodos de detección se centran generalmente en elementos genéticos de uso frecuente, tales como

promotores, terminadores, genes marcadores, etc., debido a que para muchas construcciones de ADN, la región codificante es intercambiable. Como resultado, dichos métodos pueden no ser útiles para discriminar entre diferentes eventos, particularmente aquellos producidos usando la misma construcción de ADN o construcciones muy similares, a menos que se conozca la secuencia de ADN del ADN flanqueante adyacente al ADN heterólogo insertado. Por ejemplo, se describe un ensayo PCR específico de evento en la Patente de los Estados Unidos n.º 6.395.485 para la detección del evento de élite GAT-ZM1. Por consiguiente, sería deseable tener un método sencillo y discriminatorio para la identificación del evento DP-004114-3.

Sumario de la invención

La invención proporciona un amplicón que consiste en la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 32 o el complemento de longitud completa del mismo.

La invención también proporciona un método para detectar el amplicón de la invención en una muestra biológica procedente de una planta, tejido o semilla del evento de maíz DP-004114-3, en donde dicha planta comprende una secuencia de nucleótidos que consiste en la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 32 o el complemento de longitud completa de la misma, en donde dicha secuencia de nucleótidos es detectable en dicha muestra usando un método de amplificación de ácidos nucleicos o un método de hibridación de ácidos nucleicos, en donde se ha depositado una muestra representativa de dicho evento de maíz DP004114-3 en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) con el n.º de registro PTA-11506.

Además, la invención proporciona un método para determinar la cigosidad del ADN de una planta de maíz que comprende el evento de maíz DP-004114-3 en una muestra biológica que comprende: (a) poner en contacto dicha muestra con un par de cebadores seleccionado entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 29 y 30, de tal forma que (1) cuando se usa en una reacción de amplificación de ácido nucleico que comprende ADN del evento de maíz DP-004114-3, dicha reacción produce un primer amplicón que consiste en la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 32 o el complemento de longitud completa del mismo, que es diagnóstico para el evento de maíz DP-004114-3 y (2) cuando se usa en una reacción de amplificación de ácido nucleico que comprende ADN genómico de maíz distinto de ADN de DP-004114-3, dicha reacción produce un segundo amplicón que es diagnóstico para el ADN genómico de maíz distinto de ADN de DP-004114-3; (b) llevar a cabo una reacción de amplificación de ácido nucleico; y (c) detectar los amplicones producidos de este modo, en donde la detección de la presencia de ambos amplicones indica que dicha muestra es heterocigota para el ADN del evento de maíz DP-004114-3, en donde la detección únicamente del primer amplicón indica que dicha muestra es homocigota para el ADN del evento de maíz DP-004114-3.

La invención también proporciona un par de cebadores polinucleotídicos que comprenden un primer cebador polinucleotídico y un segundo cebador polinucleotídico 20, en donde el primer cebador polinucleotídico comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 29 y el complemento de la misma; y el segundo cebador polinucleotídico comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 30 y el complemento de la misma, que funcionan juntas en presencia de un molde de ADN de DP-004114-3 en una muestra para producir un amplicón diagnóstico para el evento DP-004114-3.

La invención proporciona además un kit para detectar ácidos nucleicos que son únicos para el evento DP-004114-3 que comprende un par de cebadores que comprende en las SEQ ID NO: 29 y 30 y los complementos de las mismas, que funcionan como un par de cebadores en un método de detección de ácidos nucleicos y que tras la amplificación de o la hibridación con una secuencia de ácido nucleico diana en una muestra seguida de la detección del amplicón o la hibridación con la secuencia diana, son diagnósticos para la presencia de secuencias de ácido nucleico únicas para el evento DP-004114-3 en la muestra.

En el presente documento también se describen métodos para producir y seleccionar una planta de cultivo monocotiledónea resistente a insectos. Más específicamente, se describe una construcción de ADN que cuando se expresa en células vegetales y plantas, confiere resistencia a los insectos. Se describe una construcción de ADN que puede introducirse y replicarse en una célula hospedadora, que cuando se expresa en células vegetales y plantas, confiere resistencia a insectos a las células vegetales y plantas. El evento de maíz DP-004114-3 se produjo mediante transformación mediada por *Agrobacterium* con el plásmido PHP27118. Este evento contiene los casetes génicos *cry1F*, *cry34Ab1*, *cry35Ab1* y *pat*, que confieren resistencia a ciertas plagas de lepidópteros y coleópteros, así como tolerancia a la fosfinotricina.

Específicamente, el primer casete contiene una versión truncada del gen *cry1F* de *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai*. La inserción del gen *cry1F* confiere resistencia al daño por plagas de lepidópteros. La proteína Cry1F (SEQ ID NO: 1) está formada por 605 aminoácidos y tiene un peso molecular de aproximadamente 68 kDa. La expresión del gen *cry1F* está controlada por el promotor de poliubiquitina de maíz (Christensen *et al.* (1992) Plant Mol. Biol. 118(4):675-89), que proporciona expresión constitutiva de la proteína Cry1F en maíz. Esta región también incluye la región 5' no traducida (UTR) y el intrón asociado con el promotor de poliubiquitina nativo. El terminador para el gen *cry1F* es la señal de adición de poli(A) del marco abierto de lectura 25 (ORF 25) del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* pTi15955 (Barker *et al.* (1983) Plant Mol. Biol. 2:335-350).

El segundo casete contiene el gen *cry34Ab1* aislado de *Bacillus thuringiensis* cepa PS149B1 (Patentes de los Estados Unidos n.º 6.127.180; 6.624.145 y 6.340.593). La proteína Cry34Ab1 (SEQ ID NO: 2) tiene 123 aminoácidos de longitud y tiene un peso molecular de aproximadamente 14 kDa. La expresión del gen *cry34Ab1* se controla por una segunda copia del promotor de poliubiquitina de maíz con 5' UTR e intrón (Christensen *et al.*, 1992, anteriormente citado). El terminador para el gen *cry34Ab1* es el terminador *pinII* (Keil *et al.* (1986) *Nucleic Acids Res.* 14:5641-5650; An *et al.* (1989) *Plant Cell* 1:115-22).

El tercer casete génico contiene el gen *cry35Ab1*, también aislado de *Bacillus thuringiensis* cepa PS149B1 (Patentes de los Estados Unidos n.º 6.083.499; 6.548.291 y 6.340.593). La proteína Cry35Ab1 (SEQ ID NO: 3) tiene una longitud de 383 aminoácidos y un peso molecular de aproximadamente 44 kDa. La expresión simultánea de las proteínas Cry34Ab1 y Cry35Ab1 en la planta confiere resistencia a los insectos coleópteros. La expresión del gen *cry35Ab1* está controlada por la secuencia de promotor y líder de peroxidasa de *Triticum aestivum* (trigo) (Hertig *et al.* (1991) *Plant Mol. Biol.* 16:171-174). El terminador para el gen *cry35Ab1* es una segunda copia del terminador *pinII* (Keil *et al.*, 1986, anteriormente citado; An *et al.*, 1989, anteriormente citado).

El casete cuarto y final contiene una versión del gen de fosfinotricina acetiltransferasa de *Streptomyces viridochromogenes* (*pat*) que se ha optimizado para su expresión en maíz. El gen *pat* expresa la enzima fosfinotricina acetiltransferasa (PAT) que confiere tolerancia a la fosfinotricina. La proteína PAT (SEQ ID NO: 4) tiene 183 aminoácidos de longitud y tiene un peso molecular de aproximadamente 21 kDa. La expresión del gen *pat* está controlada por las regiones promotoras y terminadoras del transcrito de 35S de CaMV (Franck *et al.* (1980) *Cell* 21:285-294; Odell *et al.* (1985) *Nature* 313:810-812; Pietrzak, *et al.* (1986) *Nucleic Acids Res.* 14(14):5857-5868). También se describen plantas que contienen las construcciones de ADN.

En el presente documento también se describen composiciones y métodos para identificar una nueva planta de maíz denominada DP-004114-3. Los métodos se basan en cebadores o sondas que reconocen específicamente la secuencia 5' y/o 3' flanqueante de DP-004114-3. Las moléculas de ADN pueden comprender secuencias cebadoras que cuando se utilizan en una reacción PCR, producirán amplicones únicos para el evento transgénico DP-004114-3. En el presente documento también se describen plantas y semillas de maíz que comprenden estas moléculas. Además, los kits pueden utilizar estas secuencias cebadoras para la identificación del evento DP-004114-3.

Un aspecto adicional se refiere a la secuencia flanqueante específica de DP-004114-3 descrita en el presente documento, que puede usarse para desarrollar métodos de identificación específicos para DP-004114-3 en muestras biológicas. Más particularmente, un aspecto se refiere a las regiones flanqueantes 5' y/o 3' de DP-004114-3 que pueden usarse para el desarrollo de cebadores y sondas específicos. Un aspecto adicional se refiere a métodos de identificación para la presencia de DP-004114-3 en muestras biológicas basándose en el uso de dichos cebadores o sondas específicos.

En el presente documento se describen métodos para detectar la presencia de ADN correspondiente al evento de maíz DP-004114-3 en una muestra. Dichos métodos comprenden: (a) poner en contacto la muestra que comprende ADN con un conjunto de cebadores de ADN, que cuando se usan en una reacción de amplificación de ácidos nucleicos con ADN genómico extraído del evento de maíz DP-004114-3 produce un amplicón que es diagnóstico para el evento de maíz DP-004114-3; (b) llevar a cabo una reacción de amplificación de ácido nucleico, produciendo de este modo el amplicón; y (c) detectar el amplicón.

De acuerdo con otro aspecto, los métodos para detectar la presencia de una molécula de ADN correspondiente al evento DP-004114-3 en una muestra, comprendiendo dichos métodos: (a) poner en contacto la muestra que comprende ADN extraído de una planta de maíz con una molécula de sonda de ADN que hibrida en condiciones rigurosas con ADN extraído del evento de maíz DP-004114-3 y no hibrida en condiciones rigurosas con un ADN de planta de maíz de control; (b) someter a la muestra y a la sonda a condiciones de hibridación rigurosas; y (c) detectar la hibridación de la sonda al ADN. Más específicamente, un método para detectar la presencia de una molécula de ADN correspondiente al evento DP-004114-3 en una muestra, consistiendo dichos métodos en (a) poner en contacto la muestra que comprende ADN extraído de una planta de maíz con una molécula de sonda de ADN que consiste en secuencias que son únicas para el evento, por ejemplo, secuencias de unión, en donde dicha molécula sonda de ADN hibrida en condiciones rigurosas con ADN extraído del evento de maíz DP-004114-3 y no hibrida en condiciones rigurosas con un ADN de planta de maíz de control; (b) someter a la muestra y a la sonda a condiciones de hibridación rigurosas; y (c) detectar la hibridación de la sonda al ADN.

Además, en el presente documento se describen un kit y métodos para identificar el evento DP-004114-3 en una muestra biológica que detectan una región específica de DP-004114-3.

Las moléculas de ADN pueden comprender al menos una secuencia de unión de DP-004114-3; en donde una secuencia de unión abarca la unión entre el ADN heterólogo insertado en el genoma y el ADN de la célula de maíz que flanquea al sitio de inserción, es decir, ADN flanqueante y es diagnóstica del evento DP-004114-3.

Los métodos para producir una planta de maíz resistente a insectos pueden comprender las etapas de: (a) cruzar

sexualmente una primera línea precursora de maíz que comprende los casetes de expresión descritos en el presente documento, lo que confiere resistencia a insectos y una segunda línea de maíz precursora que carece de resistencia a insectos, produciendo de este modo una pluralidad de plantas descendientes; y (b) seleccionar una planta descendiente que es resistencia a los insectos. Dichos métodos pueden comprender opcionalmente la etapa adicional de retrocruzar la planta descendiente con la segunda línea de maíz precursora para producir una planta de maíz genéticamente pura que es resistente a los insectos.

Un método para producir una planta de maíz que es resistente a los insectos puede comprender transformar una célula de maíz con la construcción de ADN PHP27118, cultivar la célula de maíz transformada hasta obtener una planta de maíz, seleccionar la planta de maíz que muestra resistencia a insectos y cultivar adicionalmente la planta de maíz hasta obtener una planta de maíz fértil. La planta de maíz fértil puede autopolinizarse o cruzarse con variedades de maíz compatibles para producir descendencia resistente a insectos.

Otro aspecto se refiere además a un kit de detección de ADN para identificar el evento de maíz DP-004114-3 en muestras biológicas. El kit comprende un primer cebador que reconoce específicamente la región flanqueante 5' o 3' de DP-004114-3 y un segundo cebador que reconoce específicamente una secuencia en el ADN exógeno de DP-004114-3 o en el ADN flanqueante, para su uso en un protocolo de identificación PCR. Un aspecto adicional se refiere a un kit para identificar el evento DP-004114-3 en muestras biológicas, comprendiendo dicho kit una sonda específica que tiene una secuencia que corresponde o que es complementaria a, una secuencia que tiene entre un 80 % y un 100 % de identidad de secuencia con una región específica del evento DP-004114-3. La secuencia de la sonda corresponde a una región específica que comprende parte de la región flanqueante 5' o 3' del evento DP-004114-3.

Los métodos y kits pueden usarse para diferentes fines, tales como, pero sin limitación, los siguientes: para identificar el evento DP-004114-3 en plantas, material vegetal o en productos tales como, pero sin limitación, alimentos o productos alimentarios (frescos o procesados) que comprenden o proceden de material vegetal; adicionalmente o como alternativa, los métodos y kits pueden usarse para identificar material vegetal transgénico a fin de diferenciar entre material transgénico y no transgénico; adicionalmente o como alternativa, los métodos y kits pueden usarse para determinar la calidad del material vegetal que comprende el evento de maíz DP-004114-3. Los kits también pueden contener los reactivos y materiales necesarios para llevar a cabo el método de detección.

En el presente documento también se describe una planta de maíz DP-004114-3 o sus partes, incluyendo, pero sin limitación, polen, óvulos, células vegetativas, los núcleos de células de polen y los núcleos de los óvulos de la planta de maíz DP-004114-3 y la descendencia procedente de la misma. En el presente documento también se describen la planta de maíz y la semilla de DP-004114-3 a partir de las que las moléculas de cebador de ADN proporcionan un producto de amplificación específico.

Los anteriores y otros aspectos de la invención serán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

FIG. 1. Diagrama esquemático del plásmido PHP27118 con elementos genéticos indicados y sitios de enzima de restricción *Hind* III. El tamaño del plásmido es de 54910 pb.

FIG. 2. Diagrama esquemático del ADN-T que indica los genes *cry1F*, *cry34Ab1*, *cry35Ab1* y *pat* (flechas) junto con sus elementos reguladores respectivos. Se indican los sitios de la enzima de restricción *Hind* III en el ADN-T. El tamaño del ADN-T es de 11978 pb.

FIG. 3. Diagrama esquemático de la transformación y el desarrollo de DP-004114-3.

FIG. 4. Efectos en el desarrollo de larvas de gusano de la raíz del maíz occidental (WCRW) en el ensayo de plántulas subletales que emplea plántulas híbridas de maíz en el mismo origen genético: maíz DP-004114-3 con una isolínea como control negativo. Los resultados se basan en tres replicados. Los perfiles gráficos muestran el porcentaje de larvas en cada una de las tres fases a los 17 días después de la eclosión del huevo. Un desplazamiento hacia la fase 3 indica una reducción en la eficacia.

FIG. 5. Representación esquemática de las regiones de borde del inserto y genómicas secuenciadas en el maíz 4114. El diagrama indica los fragmentos de la PCR generados a partir de ADN genómico de maíz 4114 que se clonaron y secuenciaron: fragmentos A a F. La línea discontinua vertical representa las uniones del borde genómico/inserto. Los fragmentos G y H representan las regiones del borde genómico 5' y 3', respectivamente. La figura no está representada a escala.

Descripción detallada

Las siguientes definiciones y métodos se proporcionan para definir mejor la presente invención y para guiar a los expertos habituales en la materia en la práctica de la presente invención. A menos que se indique otra cosa, los

términos han de interpretarse de acuerdo con el uso convencional por los expertos habituales en la técnica relevante. También pueden encontrarse definiciones de términos comunes en biología molecular en Rieger *et al.*, Glossary of Genetics: Classical and Molecular, 5.^a edición, Springer-Verlag; Nueva York, 1991; y Lewin, Genes V, Oxford University Press: Nueva York, 1994. Se usa la nomenclatura para las bases de ADN como se expone en el 37 CFR §1.822.

5 La siguiente tabla expone las abreviaturas usadas a lo largo de este documento y en particular, en la sección de ejemplos.

Tabla de abreviaturas

Maíz 4114	Maíz que contiene el evento DP-004114-3
pb	Pares de bases
<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
CaMV	Virus del mosaico de la coliflor
<i>cry1F</i>	Gen <i>cry1F</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i>
Cry1F	Proteína del gen <i>cry1F</i>
<i>cry34Ab1</i>	Gen <i>cry34Ab1</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i> cepa PS149B1
Cry34Ab1	Proteína de <i>cry34Ab1</i>
<i>cry35Ab1</i>	Gen <i>cry35Ab1</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i> cepa PS149B1
Cry35Ab1	Proteína del gen <i>cry35Ab1</i>
kb	Par de kilobases
kDa	KiloDalton
LB	Borde izquierdo de ADN-T
<i>pat</i>	gen de fosfinotricina acetil transferasa
PAT	Proteína del gen de fosfinotricina acetil transferasa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
<i>pinII</i>	Gen inhibidor de proteinasa II de <i>Solanum tuberosum</i>
RB	Borde derecho de ADN-T
ADN-T	La porción de ADN de transferencia del plásmido de transformación de <i>Agrobacterium</i> entre los bordes izquierdo y derecho que se espera transferir al genoma de la planta
UTR	Región no traducida
ECB	Barrenador del maíz europeo (<i>Ostrinia nubilalis</i>)
FAW	Gusano cogollero (<i>Spodoptera frugiperda</i>)
WCRW	Gusano de la raíz del maíz occidental (<i>Diabrotica virgifera virgifera</i>)

Las composiciones de la presente divulgación incluyen semillas depositadas como el depósito de patente n.º PTA-11506 y plantas, células vegetales y semillas derivadas de las mismas. Los solicitantes han efectuado un depósito de al menos 2500 semillas del evento de maíz DP-004114-3 en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), Manassas, VA 20110-2209 EE. UU., el 24 de noviembre de 2010 y a los depósitos se les asignó el n.º de depósito PTA-11506. Estos depósitos se mantendrán bajo los términos del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los fines de Procedimiento de Patentes. Estos depósitos se efectuaron simplemente por comodidad para los expertos en la materia y no como admisión de que sea necesario un depósito, según lo dispuesto en el 35 U.S.C. §112. Las semillas depositadas en la ATCC el 24 de noviembre de 2010 se tomaron del depósito mantenido por Pioneer Hi-Bred International, Inc., 7250 NW 62nd Avenue, Johnston, Iowa 50131-1000. Se encontrará disponible el acceso a este depósito durante el periodo durante el que esté pendiente la solicitud para el Comisionado de Patentes y Marcas y para las personas que el Comisionado considere con derecho previa solicitud. Tras la autorización de cualquiera de las reivindicaciones en la solicitud, los solicitantes pondrán a disposición del público, según lo dispuesto en el 37 C.F.R. § 1.808, una o más muestras del depósito de al menos 2500 semillas de maíz híbrido en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209. Este depósito de semillas del evento de maíz DP-004114-3 se mantendrá en el repositorio

de la ATCC, que es un depósito público, durante un periodo de 30 años o de 5 años después de la solicitud más reciente o durante el periodo de vigencia de la patente, lo que tenga mayor duración y se repondrá en caso de que quede indisponible durante dicho periodo.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "que comprende" significa "incluyendo, pero sin limitación".

Como se usa en el presente documento, el término "maíz" significa *Zea mays* e incluye todas las variedades de la planta que pueden cruzarse con el maíz, incluyendo las especies de maíz silvestres.

10 Como se usa en el presente documento, la expresión "específico de DP-004114-3" se refiere a una secuencia de nucleótidos que es adecuada para identificar de manera discriminatoria el evento DP-004114-3 en plantas, material vegetal o en productos, tales como, pero sin limitación, alimentos o productos alimentarios (frescos o procesados) que comprenden o proceden de material vegetal.

15 Como se usa en el presente documento, las expresiones "resistente a insectos" y "que afecta a plagas de insectos" se refiere a efectuar cambios en la alimentación, el crecimiento y/o el comportamiento de los insectos en cualquier etapa del desarrollo, incluyendo, pero sin limitación: eliminar el insecto; retardar el crecimiento; prevenir la capacidad reproductiva; inhibir la alimentación; y similares.

20 Como se usa en el presente documento, las expresiones "actividad plaguicida" y "actividad insecticida" se usan como sinónimos para hacer referencia a la actividad de un organismo o una sustancia (tal como, por ejemplo, una proteína) que puede medirse mediante numerosos parámetros que incluyen, pero sin limitación, mortalidad de la plaga, pérdida de peso de la plaga, atracción de plagas, repelencia de plagas y otros cambios de comportamiento y físicos de una plaga después de que se alimente y/o se exponga al organismo o la sustancia durante un espacio de tiempo adecuado.

25 Por ejemplo, las "proteínas plaguicidas" son proteínas que muestran actividad plaguicida por sí mismas o en combinación con otras proteínas.

"Secuencia codificante" se refiere a una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos específica. Como se usa en el presente documento, los términos "codificante" y "codificado", cuando se usan en el contexto de un ácido nucleico específico, quieren decir que el ácido nucleico comprende la información necesaria para guiar la traducción de la secuencia de nucleótidos en una proteína específica. La información mediante la que se codifica una proteína se especifica mediante el uso de codones. Un ácido nucleico que codifica una proteína puede comprender secuencias no traducidas (por ejemplo, intrones) en las regiones traducidas del ácido nucleico o pueden carecer de dichas secuencias no traducidas intermedias (por ejemplo, como en el ADNc).

35 "Gen" se refiere a un fragmento de ácido nucleico que expresa una proteína específica, incluyendo secuencias reguladoras que preceden (secuencias 5' no codificantes) y siguen (secuencias 3' no codificantes) a la secuencia codificante. "Gen nativo" se refiere a un gen tal como se encuentra en la naturaleza con sus propias secuencias reguladoras. "Gen quimérico" se refiere a cualquier gen que no es un gen nativo, que comprende secuencias reguladoras y codificantes que no se encuentran juntas en la naturaleza. Por consiguiente, un gen quimérico puede comprender secuencias reguladoras y secuencias codificantes que proceden de diferentes fuentes o secuencias reguladoras y secuencias codificantes procedentes de la misma fuente, pero dispuestas de una manera diferente a la que se encuentra en la naturaleza. "Gen endógeno" se refiere a un gen nativo en su ubicación natural en el genoma de un organismo. "Exógeno" se refiere a un material no encontrado normalmente en la ubicación de interés. Por tanto, el "ADN exógeno" puede comprender tanto ADN recombinante como ADN reorganizado recién introducido de la planta. Un gen "exógeno" se refiere a un gen no encontrado normalmente en el organismo hospedador, pero que se introduce en el organismo hospedador por transferencia génica. Los genes exógenos pueden comprender genes nativos insertados en un organismo no nativo o genes quiméricos. Un "transgén" es un gen que se ha introducido en el genoma mediante un procedimiento de transformación. El sitio en el genoma de una planta donde se ha insertado un ADN recombinante puede denominarse "sitio de inserción" o "sitio diana".

50 Como se usa en el presente documento, "inserto de ADN" se refiere al ADN heterólogo en los casetes de expresión usados para transformar el material vegetal, mientras que puede existir "ADN flanqueante" o bien de ADN genómico naturalmente presente en un organismo, tal como una planta o ADN exógeno (heterólogo) introducido mediante el proceso de transformación, que es extraño respecto de la molécula de ADN insertada adicional, por ejemplo, fragmentos asociados con el evento de transformación. Una "región flanqueante" o "secuencia flanqueante", como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de al menos 20 pb, preferentemente al menos 50 pb y hasta 5000 pb, que se ubica o bien inmediatamente cadena arriba de y contigua a o inmediatamente cadena debajo de y contigua a la molécula de ADN exógeno insertada original. Los procedimientos de transformación que dan lugar a la integración aleatoria del ADN exógeno darán como resultado transformantes que contienen diferentes regiones flanqueantes características y únicas para cada transformante. Cuando se introduce ADN recombinante en una planta mediante cruzamiento tradicional, normalmente no se cambiarán sus regiones flanqueantes. Los transformantes también contienen uniones únicas entre un trozo de ADN heterólogo insertado y ADN genómico o dos (2) trozos de ADN genómico o dos (2) trozos de ADN heterólogo. Una "unión" es un punto donde se unen dos (2) fragmentos de ADN específicos. Por ejemplo, se forma una unión donde el ADN insertado se une al ADN flanqueante. También existe un punto de unión en un organismo transformado donde dos (2) fragmentos de ADN se unen de un modo que está

modificado con respecto al encontrado en el organismo nativo. "ADN de unión" se refiere a ADN que comprende un punto de unión. Dos secuencias de unión expuestas en la presente divulgación son el punto de unión entre el ADN genómico de maíz y el extremo 5' del inserto como se expone en la SEQ ID NO: 27 y el punto de unión entre el extremo 3' del inserto y el ADN genómico de maíz, como se expone en la SEQ ID NO: 28.

5 Como se usa en el presente documento, "heterólogo", en referencia a un ácido nucleico, es un ácido nucleico originario de una especie exógena o, en caso de ser de la misma especie, está sustancialmente modificado con respecto a su forma nativa en cuanto a su composición y/o locus genómico mediante intervención humana deliberada. Por ejemplo, un promotor unido operativamente a una secuencia de nucleótidos heteróloga puede proceder de una especie
10 diferente a aquella de la que se obtuvo la secuencia de nucleótidos o, en caso de ser de la misma especie, el promotor no se encuentra unido operativamente de manera natural a la secuencia de nucleótidos. Una proteína heteróloga puede tener como origen una especie exógena o, en caso de ser de la misma especie, está sustancialmente modificada con respecto a su forma original mediante intervención humana deliberada.

15 "Secuencias reguladoras" se refiere a secuencias de nucleótidos ubicadas cadena arriba (secuencias 5' no codificantes), dentro o cadena abajo (secuencias 3' no codificantes) de una secuencia codificante y que influyen en la transcripción, el procesamiento o la estabilidad del ARN o la traducción de la secuencia codificante asociada. Las secuencias reguladoras pueden incluir promotores, secuencias líder de traducción, intrones y secuencias de reconocimiento de poliadenilación.

20 "Promotor" se refiere a una secuencia de nucleótidos capaz de controlar la expresión de una secuencia codificante o un ARN funcional. En general, una secuencia codificante está ubicada en 3' respecto de una secuencia promotora. La secuencia promotora consiste en elementos cadena arriba proximales y más distales, citándose los anteriores elementos como potenciadores. Por consiguiente, un "potenciador" es una secuencia de nucleótidos que puede
25 estimular la actividad promotora y puede ser un elemento innato del promotor o un elemento heterólogo insertado para potenciar el nivel o la especificidad de tejido de un promotor. Los promotores pueden proceder por completo de un gen nativo o estar compuestos de diferentes elementos procedentes de diferentes promotores encontrados en la naturaleza o incluso comprender segmentos de nucleótidos sintéticos. Los expertos en la materia entienden que los diferentes promotores pueden dirigir la expresión de un gen en diferentes tejidos o tipos celulares o en diferentes
30 estadios de desarrollo o en respuesta a diferentes condiciones ambientales. Los promotores que provocan la expresión de un fragmento de ácido nucleico en la mayoría de tipos celulares durante la mayoría del tiempo se citan comúnmente como "promotores constitutivos". Se están descubriendo continuamente nuevos promotores de diversos tipos útiles en células vegetales; pueden encontrarse numerosos ejemplos en la compilación de Okamura y Goldberg (1989) *Biochemistry of Plants* 15:1-82. Se reconoce además que ya que en la mayoría de los casos los límites exactos de las
35 secuencias reguladoras no se han definido completamente, algunos fragmentos de ácido nucleico de diferentes longitudes pueden tener una actividad promotora idéntica.

La "secuencia líder de la traducción" se refiere a una secuencia de nucleótidos ubicada entre la secuencia promotora de un gen y la secuencia codificante. La secuencia líder de traducción se encuentra presente en el ARNm
40 completamente procesado cadena arriba de la secuencia de inicio de la traducción. La secuencia líder de la traducción puede afectar a numerosos parámetros que incluyen, el procesamiento del transcrito primario en ARNm, la estabilidad del ARNm y/o la eficiencia de la traducción. Se han descrito ejemplos de secuencias líder de la traducción (Turner y Foster (1995) *Mol. Biotechnol.* 3:225-236).

45 Las "secuencias 3' no codificantes" se refieren a secuencias de nucleótidos ubicadas cadena debajo de una secuencia codificante e incluyen secuencias de reconocimiento de la poliadenilación y otras secuencias que codifican señales reguladoras capaces de afectar al procesamiento del ARNm o la expresión génica. La señal de poliadenilación normalmente se caracteriza por que afecta a la adición de tramos de ácido poliadenílico al extremo 3' del precursor de
50 ARNm. El uso de diferentes secuencias 3' no codificantes se ejemplifica por Ingelbrecht *et al.* (1989) *Plant Cell* 1:671-680.

Una "proteína" o un "polipéptido" es una cadena de aminoácidos dispuesta en un orden específico determinado por la secuencia codificante en un polinucleótido que codifica el polipéptido.

55 Una construcción de ADN es un conjunto de moléculas de ADN ligadas entre sí que proporciona uno o más casetes de expresión. La construcción de ADN puede ser un plásmido que tiene capacidad de autorreplicación en una célula bacteriana y contiene diversos sitios de restricción de enzima endonucleasa que son útiles para introducir moléculas de ADN que proporcionan elementos genéticos funcionales, es decir, promotores, intrones, líderes, secuencias codificantes, regiones de terminación 3', entre otros; o una construcción de ADN puede ser un conjunto lineal de
60 moléculas de ADN, tales como un casete de expresión. El casete de expresión contenido en una construcción de ADN comprende los elementos genéticos necesarios para proporcionar la transcripción de un ARN mensajero. El casete de expresión puede diseñarse para su expresión en células procariotas o eucariotas. Los casetes de expresión pueden diseñarse para su expresión en células vegetales.

65 Las moléculas de ADN pueden proporcionarse en casetes de expresión para su expresión en un organismo de interés. El casete incluirá secuencias reguladoras 5' y 3' unidas operativamente a una secuencia codificante. "Unido

operativamente" significa que las secuencias de ácido nucleico que se están uniendo son contiguas y, cuando es necesario unir dos regiones codificantes de proteína, contiguas y en el mismo marco de lectura. Unido operativamente pretende indicar un enlace funcional entre un promotor y una segunda secuencia, en donde la secuencia promotora inicia y media la transcripción de la secuencia de ADN correspondiente a la segunda secuencia. El casete puede
 5 contener además al menos un gen adicional que se va a cotransformar en el organismo. Como alternativa, los genes adicionales pueden proporcionarse en múltiples casetes de expresión o múltiples construcciones de ADN.

El casete de expresión incluirá en la dirección de la transcripción de 5' a 3': un región de inicio de la transcripción y la traducción, una región codificante y una región de terminación de la traducción funcional en el organismo que sirve
 10 como hospedador. La región de inicio de la transcripción (es decir, el promotor) puede ser nativa o análoga o exógena o heteróloga para el organismo hospedador. Además, el promotor puede ser la secuencia natural o como alternativa, una secuencia sintética. Los casetes de expresión pueden contener además secuencias líder 5' en la construcción del casete de expresión. Dichas secuencias líder pueden actuar potenciando la traducción.

Ha de entenderse que, como se usa en el presente documento, el término "transgénico" incluye cualquier célula, línea celular, callo, tejido, parte de planta o planta, cuyo genotipo se ha alterado mediante la presencia de un ácido nucleico heterólogo que incluye aquellos transgénicos alterados inicialmente de este modo, así como aquellos creados mediante cruzamientos sexuales o propagación asexual a partir del transgénico inicial. El término "transgénico", como se usa en el presente documento, no abarca la alteración del genoma (cromosómica o extracromosómica) mediante
 20 métodos de fitomejoramiento convencionales o por eventos de origen natural, tales como fertilización cruzada aleatoria, infección vírica no recombinante, transformación bacteriana no recombinante, transposición no recombinante o mutación espontánea.

Un "evento" transgénico se produce mediante la transformación de células vegetales con una o más construcciones de ADN heterólogas, incluyendo un casete de expresión de ácido nucleico que comprende un transgén de interés, la regeneración de una población de plantas resultante de la inserción del transgén en el genoma de la planta y la selección de una planta particular caracterizada por la inserción en una ubicación particular del genoma. Un evento se caracteriza fenotípicamente por la expresión del transgén. A nivel genético, un evento forma parte del acervo genético de una planta. El término "evento" también se refiere a la descendencia producida por un cruzamiento sexual exógamo entre el transformante y otra variedad que incluye el ADN heterólogo. Incluso después del retrocruzamiento repetido con un precursor recurrente, el ADN insertado y el ADN flanqueado del precursor transformado está presente en la descendencia del cruce en la misma ubicación cromosómica. El término "evento" también se refiere a ADN del transformante original que comprende el ADN insertado y la secuencia flanqueante inmediatamente adyacente al ADN insertado que podría esperarse que se transfiera a una descendencia que recibe el ADN insertado que incluye el transgén de interés como resultado de un cruzamiento sexual de una línea precursora que incluye el ADN insertado (por ejemplo, el transformante original y la descendencia resultante de la autopolinización) y una línea precursora que no contiene el ADN insertado.
 35

Puede criarse una planta de maíz DP-004114-3 resistente a insectos cruzando en primer lugar una planta de maíz precursora que comprende una planta de maíz cultivada a partir de la planta de maíz DP-004114-3 transgénica y la descendencia de la misma procedente de la transformación con los casetes de expresión descritos en el presente documento que confieren resistencia a insectos y una segunda planta de maíz precursora que carece de resistencia a insectos, produciendo de este modo una pluralidad de primeras plantas descendientes; y después seleccionando una primera planta descendiente que es resistente a los insectos; y autopolinizar la primera planta descendiente, produciendo de este modo una pluralidad de segundas plantas descendientes; y después seleccionar entre las segundas plantas descendientes una planta resistente a insectos. Estas etapas pueden incluir además el retrocruzamiento de la primera planta descendiente resistente a insectos o la segunda planta descendiente resistente a insectos con la segunda planta de maíz precursora o una tercera planta de maíz precursora, produciendo de este modo una planta de maíz que es resistente a los insectos.
 45

Como se usa en el presente documento, el término "planta" incluye la referencia a plantas enteras, órganos de plantas (por ejemplo, hojas, tallos, raíces, etc.), semillas, células vegetales y la descendencia de las mismas. Las partes de plantas transgénicas pueden comprender, por ejemplo, células vegetales, protoplastos, tejidos, callo, embriones, así como flores, tallos, frutos, hojas y raíces procedentes de plantas transgénicas o su descendencia previamente transformadas con una molécula de ADN descrita en el presente documento y que por tanto constan, al menos en parte, de células transgénicas, también se describen en el presente documento.
 50

Como se usa en el presente documento, la expresión "célula vegetal" incluye, sin limitación, semillas, cultivos en suspensión, embriones, regiones meristemáticas, tejido de callo, hojas, raíces, brotes, gametofitos, esporofitos, polen y micrósporas. La clase de plantas que puede usarse en los métodos descritos en el presente documento es generalmente tan amplia como la clase de plantas superiores susceptibles a las técnicas de transformación, incluyendo plantas tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas.
 60

"Transformación" se refiere a la transferencia de un fragmento de ácido nucleico en el genoma de un organismo hospedador, que da como resultado herencia genéticamente estable. Los organismos hospedadores que contienen los fragmentos de ácido nucleico transformados se denominan organismos "transgénicos". Los ejemplos de métodos
 65

de transformación de plantas incluyen transformación mediada por *Agrobacterium* (De Blaere *et al.* (1987) *Meth. Enzymol.* 143:277) y la tecnología acelerada por partículas o de "pistola génica" (Klein *et al.* (1987) *Nature* (Londres) 327:70-73; Patente de los Estados Unidos n.º 4.945.050). Los métodos de transformación adicionales se divulgan más adelante.

5 Por tanto, pueden incorporarse polinucleótidos aislados en construcciones recombinantes, normalmente construcciones de ADN, que tienen la capacidad de introducirse y replicarse en una célula hospedadora. Dicha construcción puede ser un vector que incluye un sistema de replicación y secuencias que tienen la capacidad de transcribir y traducir una secuencia codificante de polipéptido en una célula hospedadora determinada. Se ha descrito
10 una serie de vectores adecuados para la transfección estable de células vegetales o para el establecimiento de plantas transgénicas en, por ejemplo, Pouwels *et al.*, (1985; Sup. 1987) *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Weissbach y Weissbach (1989) *Methods for Plant Molecular Biology*, (Academic Press, Nueva York); y Flevin *et al.*, (1990) *Plant Molecular Biology Manual*, (Kluwer Academic Publishers). Normalmente, los vectores de expresión en plantas incluyen, por ejemplo, uno o más genes vegetales clonados bajo el control transcripcional de secuencias reguladoras 5' y 3' y un marcador de selección dominante. Dichos vectores de expresión en plantas también pueden contener una región reguladora del promotor (por ejemplo, una región reguladora que controla la expresión inducible o constitutiva, regulada ambientalmente o por el desarrollo o específica de células o tejidos), un sitio de inicio de la transcripción, un sitio de unión al ribosoma, una señal de procesamiento de ARN, un sitio de terminación de la transcripción y/o una señal de poliadenilación.

20 También ha de entenderse que pueden cruzarse dos plantas transgénicas diferentes para producir descendencia que contiene dos genes exógenos segregantes añadidos de manera independiente. La autopolinización de la descendencia adecuada puede producir plantas que son homocigotas para ambos genes exógenos añadidos. También se contemplan el retrocruzamiento con una planta precursora y el cruzamiento exogámico con una planta no transgénica, así como la propagación vegetativa. Pueden encontrarse descripciones de otros métodos de fitomejoramiento que se usan comúnmente para diferentes rasgos y cultivos en una de varias referencias, por ejemplo, Fehr, en *Breeding Methods for Cultivar Development*, Wilcos J. ed., American Society of Agronomy, Madison Wis. (1987).

30 Una "sonda" es un ácido nucleico aislado al que se une un marcador detectable o una molécula indicadora convencional, por ejemplo, un isótopo radiactivo, ligando, agente quimioluminiscente o enzima. Dicha sonda puede ser complementaria a una hebra de un ácido nucleico diana para una hebra de ADN aislado del evento de maíz DP-004114-3, ya proceda de una planta de maíz o de una muestra que incluye ADN del evento. Las sondas pueden incluir no solo ácidos desoxirribonucleicos o ribonucleicos, sino también poliaminas y otros materiales de sonda que se unen específicamente a una secuencia de ADN y pueden usarse para detectar la presencia de dicha secuencia de ADN diana.
35

Los "cebadores" son ácidos nucleicos aislados que se hibridan a una hebra de ADN diana complementaria mediante hibridación de ácido nucleico para formar un híbrido entre el cebador y la hebra de ADN diana, y después extenderse a lo largo de la hebra de ADN diana mediante una polimerasa, por ejemplo, una ADN polimerasa. Los pares de cebadores pueden referirse a su uso para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico diana, por ejemplo, mediante la PCR u otros métodos de amplificación de ácidos nucleicos convencionales. La "PCR" o "reacción en cadena de la polimerasa" es una técnica usada para la amplificación de segmentos de ADN específicos (véanse, las Patentes de los Estados Unidos n.º 4.683.195 y 4.800.159).
45

Las sondas y cebadores tienen una longitud de nucleótidos suficiente para unirse a la secuencia de ADN diana específicamente en las condiciones de hibridación o las condiciones de reacción determinadas por el operario. Esta longitud puede ser cualquier longitud que sea lo suficientemente larga para ser útil en un método de detección elegido. En general, se usan 11 nucleótidos de longitud o más, 18 nucleótidos de longitud o más y 22 nucleótidos de longitud o más. Dichas sondas y cebadores se hibridan específicamente a una secuencia diana en condiciones de hibridación de alta rigurosidad. Las sondas y cebadores pueden tener una similitud de secuencia de ADN completa de nucleótidos contiguos con la secuencia diana, aunque pueden diseñarse mediante métodos convencionales sondas que difieren respecto de la secuencia de ADN diana y que conservan la capacidad para hibridar con las secuencias de ADN diana. Las sondas pueden usarse como cebadores, pero generalmente se diseñan para que se unan al ADN o ARN diana y no se usan en un proceso de amplificación.
50
55

Pueden usarse cebadores específicos para amplificar un fragmento de integración para producir un amplicón que puede usarse como "sonda específica" para identificar el evento DP-004114-3 en muestras biológicas. Cuando la sonda se hibrida con los ácidos nucleicos de una muestra biológica en condiciones que permiten la unión de la sonda a la muestra, esta unión puede detectarse y de este puede obtenerse una indicación de la presencia del evento DP-004114-3 en la muestra biológica. Se ha descrito en la técnica dicha identificación de una sonda unida. La sonda específica puede ser una secuencia que, en condiciones optimizadas, se hibrida específicamente con una región en la región flanqueante 5' o 3' del evento y también comprende una parte del ADN exógeno contiguo con la misma. La sonda específica puede comprender una secuencia al menos un 80 %, entre un 80 y un 85 %, entre un 85 y un 90 %, entre un 90 y un 95 % y entre un 95 y un 100 % idéntica (o complementaria) a una región específica del evento.
60
65

Se describen métodos para preparar y usar las sondas y cebadores, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2.^a ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1989 (en lo sucesivo, "Sambrook *et al.*, 1989"); Ausubel *et al.* eds., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing y Wiley-Interscience, Nueva York, 1995 (con actualizaciones periódicas) (en lo sucesivo, "Ausubel *et al.*, 1995"); e Innis *et al.*, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press: San Diego, 1990. Los pares de cebadores de la PCR pueden proceder de una secuencia conocida, por ejemplo, usando programas informáticos pensados para dicho fin, tales como la herramienta de análisis de cebadores de la PCR en Vector NTI, versión 6 (Informax Inc., Bethesda MD); PrimerSelect (DNASTAR Inc., Madison, WI); y Primer (Versión 0.5©, 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, Mass.). Además, puede explorarse visualmente la secuencia e identificarse manualmente los cebadores usando guías conocidas por un experto en la materia.

Un "kit", como se usa en el presente documento, se refiere a un conjunto de reactivos con el fin de llevar a cabo el método descrito en el presente documento, más particularmente, la identificación del evento DP-004114-3 en muestras biológicas. El kit descrito en el presente documento puede usarse y sus componentes pueden ajustarse específicamente, con una finalidad de control de calidad (por ejemplo, pureza de lotes de semillas), detección del evento DP-004114-3 en material vegetal o material que comprende o procede de material vegetal, tal como, pero sin limitación, alimentos o productos alimentarios. "Material vegetal", como se usa en el presente documento, se refiere a un material que se obtiene o procede de una planta.

Los cebadores y sondas basados en las secuencias de ADN flanqueante y del inserto divulgadas en el presente documento pueden usarse para confirmar (y, en caso necesario corregir) las secuencias divulgadas mediante métodos convencionales, por ejemplo, volviendo a clonar y secuenciar dichas secuencias. Las sondas y cebadores de ácidos nucleicos pueden hibridar en condiciones rigurosas a una secuencia de ADN diana. Puede usarse cualquier método de hibridación o amplificación de ácidos nucleicos convencional para identificar la presencia de ADN de un evento transgénico en una muestra. Las moléculas de ácido nucleico o los fragmentos de las mismas tienen la capacidad de hibridar específicamente con otras moléculas de ácido nucleico en ciertas circunstancias. Como se usa en el presente documento, se dice que dos moléculas de ácido nucleico son capaces de hibridar específicamente entre sí en caso de que las dos moléculas sean capaces de formar una estructura de ácido nucleico bicatenaria antiparalela.

Se dice que una molécula de ácido nucleico es el "complemento" de otra molécula de ácido nucleico en caso de que muestre complementariedad completa. Como se usa en el presente documento, se dice que las moléculas muestran "complementariedad completa" cuando cada nucleótido de una de las moléculas es complementario a un nucleótido de la otra. Se dice que dos moléculas son "mínimamente complementarias" si pueden hibridar entre sí con suficiente estabilidad para permitir que queden hibridadas entre sí al menos en condiciones de "baja rigurosidad" convencionales. De manera similar, se dice que las moléculas son "complementarias" si pueden hibridar entre sí con suficiente estabilidad para permitir que permanezcan hibridadas entre sí en condiciones de "alta rigurosidad" convencionales. Las condiciones de rigurosidad convencionales se describen por Sambrook *et al.*, 1989 y por Haymes *et al.*, En: Nucleic Acid Hybridization, a Practical Approach, IRL Press, Washington, D.C. (1985). Las desviaciones respecto de la complementariedad completa son por tanto permisibles, en tanto que dichas desviaciones no impidan por completo la capacidad de las moléculas para formar una estructura bicatenaria. Para que una molécula de ácido nucleico sirva como cebador o sonda, solo es necesario que sea lo suficientemente complementaria en secuencia para que tenga la capacidad de formar una estructura bicatenaria estable en las concentraciones particulares de disolvente y sal empleadas.

En las reacciones de hibridación, la especificidad es normalmente la función de los lavados después de la hibridación, siendo factores críticos la fuerza iónica y la temperatura de la solución de lavado final. El punto térmico de fusión (T_m) es la temperatura (en condiciones de fuerza iónica y pH definidas) a la cual hibrida un 50 % de la secuencia diana complementaria con una sonda perfectamente coincidente. Para los híbridos de ADN-ADN, puede calcularse de manera aproximada la T_m mediante la ecuación de Meinkoth y Wahl (1984) Anal. Biochem. 138:267-284: $T_m = 81,5 \text{ }^\circ\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\%GC) - 0,61 (\% \text{ form}) - 500/l$; donde M es la molaridad de los cationes monovalentes, % GC es el porcentaje de nucleótidos de guanosina y citosina en el ADN, % form es el porcentaje de formamida en la solución de hibridación y L es la longitud del híbrido en pares de bases. La T_m se reduce en aproximadamente $1 \text{ }^\circ\text{C}$ por cada 1 % de emparejamiento erróneo; por lo tanto, la T_m , la hibridación y/o las condiciones de lavado pueden ajustarse para hibridar con secuencias de la identidad deseada. Por ejemplo, en caso de que se pretenda obtener secuencias con > 90 % de identidad, la T_m puede reducirse en aproximadamente $10 \text{ }^\circ\text{C}$. En general, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente $5 \text{ }^\circ\text{C}$ inferiores a la T_m para la secuencia específica y es complementaria en condiciones de fuerza iónica y pH definidas. Sin embargo, las condiciones altamente rigurosas pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 1, 2, 3 o $4 \text{ }^\circ\text{C}$ menos que la T_m ; las condiciones moderadamente rigurosas pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 6, 7, 8, 9 o $10 \text{ }^\circ\text{C}$ menos que la T_m ; las condiciones de baja rigurosidad pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 11, 12, 13, 14, 15 o $20 \text{ }^\circ\text{C}$ menos que la T_m .

Usando la ecuación, las composiciones de hibridación y lavado y la T_m deseada, los expertos habituales en la materia entenderán que se describen inherentemente variaciones en la rigurosidad de las soluciones de hibridación y/o lavado. En caso de que el grado de emparejamiento erróneo dé como resultado una T_m de menos de $45 \text{ }^\circ\text{C}$ (solución acuosa) o $32 \text{ }^\circ\text{C}$ (solución de formamida), se prefiere aumentar la concentración de SSC, de tal forma que puede usarse una mayor temperatura. Puede encontrarse una extensa guía de hibridación de ácidos nucleicos en Tijssen (1993)

Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes, Parte I, Capítulo 2 (Elsevier, Nueva York); y Ausubel *et al.*, eds. (1995) y Sambrook *et al.* (1989).

5 Como se usa en el presente documento, una secuencia sustancialmente homóloga es una molécula de ácido nucleico que hibridará específicamente con el complemento de la molécula de ácido nucleico con la que se está comparando en condiciones de alta rigurosidad. Los expertos en la materia conocen condiciones de rigurosidad adecuadas que promueven la hibridación de ADN, por ejemplo, cloruro de sodio/citrato de sodio 6X (SSC) a aproximadamente 45 °C, seguido de un lavado de SSC 2X a 50 °C o pueden encontrarse en Ausubel *et al.* (1995), 6.3.1-6.3.6. Normalmente, las condiciones rigurosas serán aquellas en las que la concentración salina es menor de aproximadamente 1,5 M de ion Na, típicamente una concentración de ion Na (u otras sales) de aproximadamente 0,01 a 1,0 M a pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es de al menos aproximadamente 30 °C para sondas cortas (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60 °C para sondas largas (por ejemplo, más de 50 nucleótidos). También pueden lograrse condiciones rigurosas con la adición de un agente desestabilizante, tal como formamida. Las condiciones de baja rigurosidad ejemplares incluyen hibridación con una solución tampón de formamida del 30 al 35 %, NaCl 1 M, SDS al 1 % (dodecilsulfato de sodio) a 37 °C y un lavado en SSC de 1X a 2X (SSC 20X = NaCl 3,0 M/citrato trisódico 0,3 M) a de 50 a 55 °C. Las condiciones de rigurosidad moderada ejemplares incluyen hibridación en formamida del 40 al 45 %, NaCl 1 M, SDS al 1 % a 37 °C y un lavado en SSC de 0,5X a 1X a de 55 a 60 °C. Las condiciones de alta rigurosidad ejemplares incluyen hibridación en formamida al 50 %, NaCl 1 M, SDS al 1 % a 37 °C y un lavado en SDS 0,1X a de 60 a 65 °C. Un ácido nucleico puede hibridar específicamente con una o más de las moléculas de ácido nucleico únicas para el evento DP-004114-3 o los complementos de los mismos o fragmentos de cualquiera de ellas en condiciones moderadamente rigurosas.

25 Se conocen bien en la técnica procedimientos de alineación de secuencias para la comparación. Por tanto, puede lograrse la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias cualesquiera usando un algoritmo matemático. Los ejemplos no limitantes de dichos algoritmos matemáticos son el algoritmo de Myers y Miller (1988) CABIOS 4:11-17; el algoritmo de homología local de Smith *et al.* (1981) Adv. Appl. Math. 2:482; el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443-453; el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444-2448; el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264, modificado como en Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877.

35 Pueden utilizarse implementaciones computarizadas de estos algoritmos matemáticos para la comparación de secuencias para determinar la identidad de secuencia. Dichas implementaciones incluyen, pero sin limitación: CLUSTAL en el programa PC/Gene (disponible de Intelligenetics, Mountain View, California); el programa ALIGN (Versión 2.0); el programa ALIGN PLUS (versión 3.0, copyright 1997); y GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA y TFASTA en el paquete informático de Wisconsin Genetics, versión 10 (disponible de Accelrys, 9685 Scranton Road, San Diego, CA 92121, EE. UU.). Pueden efectuarse alineamientos usando estos programas usando los parámetros por defecto.

40 El programa CLUSTAL está bien descrito por Higgins y Sharp, Gene 73: 237-244 (1988); Higgins y Sharp, CABIOS 5: 151-153 (1989); Corpet, *et al.*, Nucleic Acids Research 16: 10881-90 (1988); Huang, *et al.*, Computer Applications in the Biosciences 8: 155-65 (1992) y Pearson, *et al.*, Methods in Molecular Biology 24: 307-331 (1994). Los programas ALIGN y ALIGN PLUS están basados en el algoritmo de Myers y Miller (1988), anteriormente citado. Los programas BLAST de Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403 se basan en el algoritmo de Karlin y Altschul (1990), anteriormente citado. La familia BLAST de programas que pueden usarse para búsquedas de similitud en bases de datos incluye: BLASTN para secuencias de consulta de nucleótidos frente a secuencias de bases de datos de nucleótidos; BLASTX para secuencias de consulta de nucleótidos frente a bases de datos de proteínas; BLASTP para secuencias de consulta de proteínas frente a bases de datos de proteínas; TBLASTN para secuencias de consulta de proteínas frente a secuencias de bases de datos de nucleótidos; y TBLASTX para secuencias de consulta de nucleótidos frente a secuencias de bases de datos de nucleótidos. Véase, Ausubel, *et al.*, (1995). El alineamiento también puede llevarse a cabo manualmente mediante inspección visual.

55 Para obtener alineaciones con huecos con fines de comparación, puede utilizarse Gapped BLAST (en BLAST 2.0) como se describe en Altschul *et al.* (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389. Como alternativa, puede usarse PSI-BLAST (en BLAST 2.0) para realizar una búsqueda iterada que detecta relaciones distantes entre moléculas. Véase Altschul *et al.* (1997) anteriormente citado. Cuando se utiliza BLAST, Gapped BLAST o PSI-BLAST, pueden usarse los parámetros por defecto de los respectivos programas (por ejemplo, BLASTN para secuencias de nucleótidos, BLASTX para proteínas).

60 Como se usa en el presente documento, "identidad de secuencia" o "identidad", en el contexto de dos secuencias de ácido nucleico o polipéptido hace referencia a los restos en las dos secuencias que son iguales cuando se alinean para máxima correspondencia a lo largo de una ventana de comparación especificada. Cuando se usa el porcentaje de identidad de secuencia en referencia a proteínas, se reconoce que las posiciones que restos que no son idénticas normalmente difieren por sustituciones de aminoácidos conservativas, donde se sustituyen los restos de aminoácido por otros restos de aminoácido con propiedades similares (por ejemplo, carga o hidrofobia) y por lo tanto, no cambian las propiedades funcionales de la molécula. Cuando las secuencias difieren en sustituciones conservativas, puede ajustarse por exceso el porcentaje de identidad de secuencia para corregir la naturaleza conservativa de la sustitución.

Se dice que las secuencias que difieren por dichas sustituciones conservativas tienen "similitud de secuencia" o "similitud". Los medios para hacer este ajuste son bien conocidos por los expertos en la materia. Normalmente, esto implica puntuar una sustitución conservativa como un emparejamiento erróneo parcial en lugar de completo, aumentando de este modo el porcentaje de identidad de secuencia. Por tanto, por ejemplo, cuando a un aminoácido idéntico se le da una puntuación de 1 y a una sustitución no conservativa se le da una puntuación de cero, a una sustitución conservativa se le da una puntuación entre cero y 1. La puntuación de las sustituciones conservativas se calcula, por ejemplo, como se implementa en el programa PC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, California).

Como se usa en el presente documento, el "porcentaje de identidad de secuencia" significa el valor determinado al comparar dos secuencias alineadas de manera óptima a lo largo de una ventana de comparación, en donde la porción de la secuencia de polinucleótido en la ventana de comparación puede comprender adiciones o eliminaciones (es decir, huecos), en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o eliminaciones) para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las cuales se encuentra la base de ácido nucleico o el resto de aminoácido idénticos en ambas secuencias para producir el número de posiciones emparejadas, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia.

En referencia a la amplificación de una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, mediante la PCR) usando un par de cebadores de amplificación particular, las "condiciones rigurosas" son condiciones que permiten que el par de cebadores se hibride únicamente con la secuencia de ácido nucleico diana a la que se uniría un cebador que tenga la secuencia de tipo silvestre correspondiente (o su complemento) y preferentemente para producir un producto de amplificación único, el amplicón, en una reacción de amplificación térmica de ADN.

La expresión "específico para (una secuencia diana)" indica que una sonda o cebador hibrida en condiciones de hibridación rigurosas solo con la secuencia diana en una muestra que comprende la secuencia diana.

Como se usa en el presente documento, "ADN amplificado" o "amplicón" se refiere al producto de amplificación de ácido nucleico de una secuencia de ácido nucleico diana que forma parte de un molde de ácido nucleico. Por ejemplo, para determinar si una planta de maíz resultante de un cruzamiento sexual contiene ADN genómico del evento transgénico procedente de la planta de maíz descrita en el presente documento, el ADN extraído de la muestra de tejido de la planta de maíz puede someterse a un método de amplificación de ácido nucleico usando un par de cebadores de ADN que incluye un primer cebador procedente de la secuencia flanqueante adyacente al sitio de inserción del ADN heterólogo insertado y un segundo cebador procedente del ADN heterólogo insertado para producir un amplicón que es diagnóstico para la presencia del ADN del evento. Como alternativa, el segundo cebador puede proceder de la secuencia flanqueante. El amplicón tiene una longitud y una secuencia que también es diagnóstica para el evento. El amplicón puede tener una longitud en el intervalo desde la longitud combinada de los pares de cebadores más un par de bases de nucleótidos hasta cualquier longitud del amplicón que puede producirse mediante un protocolo de amplificación de ADN. Como alternativa, los pares de cebadores pueden proceder de la secuencia flanqueante en ambos lados del ADN insertado a fin de producir un amplicón que incluye la secuencia de nucleótidos del inserto completa de la construcción de expresión PHP27118, así como la secuencia que flanquea el inserto transgénico. Puede ubicarse un miembro de un par de cebadores procedente de la secuencia flanqueante a una distancia de la secuencia de ADN insertada, pudiendo variar esta distancia desde un par de bases de nucleótidos hasta los límites de la reacción de amplificación o aproximadamente 20.000 pb. El uso del término "amplicón" excluye específicamente dímeros de cebador que pueden formarse en la reacción de amplificación térmica de ADN.

La amplificación de ácido nucleico puede lograrse mediante cualquiera de los diversos métodos de amplificación de ácido nucleico conocidos en la técnica, incluyendo la PCR. Se conocen en la técnica diversos métodos de amplificación y se describen, entre otros, en las Patentes de los Estados Unidos n.º 4.683.195 y 4.683.202 y en Innis *et al.*, (1990) anteriormente citado. Se han desarrollado métodos de amplificación por la PCR para amplificar hasta 22 Kb de ADN genómico y hasta 42 Kb de ADN de bacteriófago (Cheng *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5695-5699, 1994). Pueden usarse estos métodos, así como otros métodos conocidos en la técnica de amplificación de ADN en la práctica de las realizaciones de la presente invención. Ha de entenderse que puede ser necesario ajustar una serie de parámetros en un protocolo de PCR específico a las condiciones de laboratorio específicas y pueden modificarse ligeramente y aun así permitir la recogida de resultados similares. Estos ajustes serán evidentes para un experto en la materia.

El amplicón producido mediante estos métodos puede detectarse mediante diversas técnicas, incluyendo, pero sin limitación, Genetic Bit Analysis (Nikiforov, *et al.* Nucleic Acid Res. 22:4167-4175, 1994) donde se diseña un oligonucleótido de ADN que solapa tanto con la secuencia de ADN flanqueante adyacente como con la secuencia de ADN insertada. El oligonucleótido se inmoviliza en los pocillos de una placa de micropocillos. Después de la PCR de la región de interés (usando un cebador en la secuencia insertada y uno en la secuencia flanqueante adyacente), puede hibridarse un producto de la PCR monocatenario al oligonucleótido inmovilizado y servir como molde para una reacción de extensión de una base usando una ADN polimerasa y ddNTP marcados específicos para la siguiente base esperada. La lectura puede estar basada en fluorescencia o en ELISA. Una señal indica la presencia del inserto/secuencia flanqueante debido a la amplificación exitosa, la hibridación y la extensión de una sola base.

- Otro método de detección es la técnica de pirosecuenciación descrita por Winge (2000) *Innov. Pharma. Tech.* 00:18-24. En este método, se diseña un oligonucleótido que solapa con la unión del ADN adyacente y el ADN del inserto. El oligonucleótido se hibrida a un producto de la PCR monocatenario de la región de interés (un cebador en la secuencia insertada y uno en la secuencia flanqueante) y se incuba en presencia de una ADN polimerasa, ATP, sulfúrico, luciferasa, apirasa, adenosina 5' fosfosulfato y luciferina. Los dNTP se añaden individualmente y la incorporación da como resultado una señal de luz que se mide. Una señal de luz indica la presencia del inserto del transgén/secuencia flanqueante debido a la exitosa amplificación, hibridación y extensión de una sola o de múltiples bases.
- La polarización de fluorescencia como se describe por Chen *et al.*, (1999) *Genome Res.* 9:492-498 es también un método que puede usarse para detectar un amplicón descrito en el presente documento. Usando este método, se diseña un oligonucleótido que solapa la unión del ADN flanqueado e insertado. El oligonucleótido se hibrida con un producto de la PCR monocatenario procedente de la región de interés (un cebador en el ADN insertado y uno en la secuencia de ADN flanqueante) y se incuba en presencia de una ADN polimerasa y un ddNTP marcado fluorescentemente. La extensión de una sola base da como resultado la incorporación del ddNTP. La incorporación puede medirse como un cambio en la polimerización usando un fluorómetro. Un cambio en la polarización indica la presencia del inserto del transgén/secuencia flanqueante debido a la exitosa amplificación, la hibridación y la extensión de una sola base.
- Taqman® (PE Applied Biosystems, Foster City, Calif.) se describe como un método para detectar y cuantificar la presencia de una secuencia de ADN y se explica completamente en las instrucciones proporcionadas por el fabricante. En resumen, se diseña una sonda oligonucleotídica FRET que solapa con la unión del ADN flanqueante y del inserto. La sonda de FRET y los cebadores de la PCR (un cebador en la secuencia de ADN del inserto y uno en la secuencia genómica flanqueante) se ciclan en presencia de una polimerasa termoestable y dNTP. La hibridación de la sonda de FRET da como resultado la escisión y liberación del resto fluorescente lejos del resto de inactivación en la sonda de FRET. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia flanqueante/inserto de transgén debido a una amplificación e hibridación exitosas.

Se han descrito sondas moleculares para su uso en la detección de secuencia, como se describe en Tyangi *et al.* (1996) *Nature Biotech.* 14:303-308. En resumen, se diseña una sonda oligonucleotídica FRET que solapa con la unión del ADN flanqueante y del inserto. La estructura única de la sonda de FRET da como resultado que contenga estructura secundaria que mantiene los restos fluorescentes e inactivantes muy próximos. La sonda de FRET y los cebadores de la PCR (un cebador en la secuencia de ADN del inserto y uno en la secuencia flanqueante) se ciclan en presencia de una polimerasa termoestable y dNTP. Después de la amplificación exitosa mediante la PCR, la hibridación de la sonda de FRET a la secuencia diana da como resultado la eliminación de la estructura secundaria de la sonda y la separación espacial de los restos fluorescente y de inactivación. Se obtiene como resultado una señal fluorescente. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia flanqueante/inserto de transgén debido a una amplificación e hibridación exitosas.

Una reacción de hibridación que usa una sonda específica para una secuencia hallada en el amplicón es otro método más usado para detectar el amplicón producido mediante una reacción PCR.

El evento de maíz DP-004114-3 es eficaz contra plagas de insectos que incluyen insectos seleccionados entre los órdenes de los coleópteros, dípteros, himenópteros, lepidópteros, malófagos, homópteros, hemípteros, ortópteros, tisanópteros, dermápteros, isópteros, anopluros, sifonápteros, tricópteros, etc., en particular, coleópteros y lepidópteros.

Los Insectos del orden de los lepidópteros incluyen, pero sin limitación, gusanos cogolleros, gusanos cortadores, falsos medidores y heliotinas de la familia *Noctuidae*: *Agrotis ipsilon* Hufnagel (gusano cortador negro); *A. orthogonia* Morrison (gusano cortador occidental); *A. segetum* Denis y Schiffermüller (polilla del nabo); *A. subterranea* Fabricius (gusano gris); *Alabama argillacea* Hübner (gusano de la hoja del maíz); *Anticarsia gemmatalis* Hübner (oruga de las leguminosas); *Athetis mindara* Barnes y McDunnough (gusano cortador rugoso); *Earias insulana* Boisduval (oruga espinosa del algodón); *E. vittella* Fabricius (gusano moteado); *Egira (Xylomyges) curialis* Grote (oruga de los cítricos); *Euxoa messoria* Harris (gusano cortador); *Helicoverpa armigera* Hübner (oruga del tomate); *H. zea* Boddie (gusano elotero); *Heliothis virescens* Fabricius (oruga del tabaco); *Hypena scabra* Fabricius (gusano del trébol); *Hyponeuma taltula* Schaus; *Mamestra configurata* Walker (gusano de las crucíferas); *M. brassicae* Linnaeus (polilla de la col); *Melanchra picta* Harris (oruga cebra); *Mocis latipes* Guenée (gusano medidor); *Pseudaletia unipuncta* Haworth (defoliadora del maíz); *Pseudoplusia includens* Walker (falso medidor de la soja); *Richia albicosta* Smith (Gusano cortador de la alubia occidental); *Spodoptera frugiperda* JE Smith (gusano cogollero); *S. exigua* Hübner (gusano cogollero de la remolacha); *S. litura* Fabricius (gusano del tabaco); *Trichoplusia ni* Hübner (medidor de la col); barrenadores, gusanos tejedores, gusanos de las coníferas y esqueletizantes de las familias *Pyrilidae* y *Crambidae*, tales como *Achroia grisella* Fabricius (polilla de la cera); *Amyelois transitella* Walker (gusano anaranjado); *Anagasta kuehniella* Zeller (polilla de la harina mediterránea); *Cadra cautella* Walker (polilla de la almendra); *Chilo partellus* Swinhoe (barrenador moteado del tallo); *C. suppressalis* Walker (barrenador del arroz); *C. terrellus* Pagenstecher (barrenador de la caña de azúcar); *Corcyra cephalonica* Stainton (polilla del arroz); *Crambus caliginosellus* Clemens (gusano tejedor del maíz); *C. teterrellus* Zincken (gusano tejedor del pasto varilla); *Cnaphalocrocis medinalis* Guenée

(enrollador de la hoja del arroz); *Desmia funeralis* Hübner (enrollador de la vid); *Diaphania hyalinata* Linnaeus (gusano del melón); *D. nitidalis* Stoll (oruga de la calabaza); *Diatraea flavipennella* Box; *D. grandiosella* Dyar (barrenador del maíz occidental del sur); *D. saccharalis* Fabricius (barrenador de la caña de azúcar); *Elasmopalpus lignosellus* Zeller (barrenador del tallo del maíz); *Eoreuma loftini* Dyar (barrenador del arroz mexicano); *Ephesia elutella* Hübner (polilla del tabaco (cacao)); *Galleria mellonella* Linnaeus (polilla de la cera); *Hedylepta accepta* Butler (enrollador de la hoja de la caña de azúcar); *Herpetogramma licarsisalis* Walker (gusano tejedor); *Homoeosoma electellum* Hulst (polilla del girasol); *Loxostege sticticalis* Linnaeus (gusano tejedor de la remolacha); *Maruca testulalis* Geyer (barrenador de la vaina de la alubia); *Orthaga thyrsalis* Walker (polilla del árbol del té); *Ostrinia nubilalis* Hübner (barrenador del maíz europeo); *Plodia interpunctella* Hübner (polilla de la harina india); *Scirpophaga incertulas* Walker (barrenador amarillo del tallo); *Udea rubigalis* Guenée (anudador de la hoja del apio); y enrolladores de las hojas, gusanos de los brotes, gusanos de las semillas y gusanos de los frutos de la familia *Tortricidae* *Acleris gloverana* Walsingham (polilla de los frutales occidental); *A. variana* Fernald (polilla de los frutales oriental); *Adoxophyes orana* Fischer von Rösslerstamm (capua de los frutales); *Archips* spp. incluyendo *A. argyrospila* Walker (enrollador de la hoja de los frutales) y *A. rosana* Linnaeus (enrollador de la hoja europeo); *Argyrotaenia* spp.; *Bonagota salubricola* Meyrick (enrolladora de las hojas brasileña); *Choristoneura* spp.; *Cochylis hospes* Walsingham (polilla bandeada del girasol); *Cydia latiferreana* Walsingham (polilla del castaño); *C. pomonella* Linnaeus (polilla de la manzana); *Endopiza viteana* Clemens (polilla del grano de la uva); *Eupoecilia ambiguella* Hübner (polilla de la viña); *Grapholita molesta* Busck (polilla de la fruta oriental); *Lobesia botrana* Denis & Schiffermüller (polilla de la vid europea); *Platynota flavedana* Clemens (rosquilla variegada); *P. stultana* Walsingham (rosquilla omnívora); *Spilonota ocellana* Denis & Schiffermüller (piral roja de los brotes); y *Suleima helianthana* Riley (polilla del brote del girasol).

Otras plagas agronómicas del orden de los lepidópteros incluyen, pero sin limitación, *Alsophila pometaria* Harris (gusano del cancro); *Anarsia lineatella* Zeller (barrenador del melocotonero); *Anisota senatoria* J.E. Smith (oruga rayada naranja del roble); *Antheraea pernyi* Guérin-Méneville (polilla del roble chino); *Bombyx mori* Linnaeus (gusano de la seda); *Bucculatrix thurberiella* Busck (perforador de la hoja del melocotonero); *Colias eurytheme* Boisduval (oruga de la alfalfa); *Datana integerrima* Grote & Robinson (oruga de la nuez); *Dendrolimus sibiricus* Tschetwerikov (polilla de la seda siberiana); *Ennomos subsignaria* Hübner (oruga del olmo); *Erannis tiliaria* Harris (áncora del tilo); *Erechthias flavistriata* Walsingham (polilla del brote de la caña de azúcar); *Euproctis chrysorrhoea* Linnaeus (polilla marrón); *Harrisina americana* Guérin-Méneville (esqueletizador de la vid); *Heliothis subflexa* Guenée; *Hemileuca oliviae* Cockrell (oruga del rango); *Hyphantria cunea* Drury (gusano de tela de araña); *Keiferia lycopersicella* Walsingham (minador del tomate); *Lambdina fiscellaria fiscellaria* Hulst (barrenador del abeto oriental); *L. fiscellaria lugubrosa* Hulst (barrenador del abeto occidental); *Leucoma salicis* Linnaeus (polilla satín); *Lymantria dispar* Linnaeus (polilla parda); *Malacosoma* spp.; *Manduca quinque maculata* Haworth (gusano cornudo del tomate); *M. sexta* Haworth (gusano cornudo del tabaco); *Operophtera brumata* Linnaeus (polilla invernal); *Orgyia* spp.; *Paleacrita vernata* Peck (gusano del cancro primaveral); *Papilio cresphontes* Cramer (mariposa cometa gigante); *Phryganidia californica* Packard (gusano del roble californiano); *Phyllocnistis citrella* Stainton (barrenador de la hoja de los cítricos); *Phyllonorycter blancardella* Fabricius (minador en elipses); *Pieris brassicae* Linnaeus (mariposa blanca gigante); *P. rapae* Linnaeus (mariposa blanca pequeña); *P. napi* Linnaeus (mariposa blanca y verde); *Platyptilia carduidactyla* Riley (polilla de la alcachofa); *Plutella xylostella* Linnaeus (polilla de dorso de diamante); *Pectinophora gossypiella* Saunders (gusano rosado); *Pontia protodice* Boisduval & Leconte (gusano de la col del sur); *Sabulodes aegrotata* Guenée (falsa medidora omnívora); *Schizura concinna* J.E. Smith (oruga de joroba roja); *Sitotroga cerealella* Olivier (polilla del grano); *Telchin licus* Drury (barrenador gigante de la caña de azúcar); *Thaumetopoea pityocampa* Schiffermüller (oruga procesionaria del pino); *Tineola bisselliella* Hummel (polilla de la ropa); *Tuta absoluta* Meyrick (minador de la hoja del tomate) e *Yponomeuta padella* Linnaeus (arañuelo del ciruelo).

Resultan interesantes las larvas y adultos del orden de los coleópteros, incluyendo gorgojos de las familias *Anthribidae*, *Bruchidae* y *Curculionidae* incluyendo, pero sin limitación: *Anthonomus grandis* Boheman (gorgojo del algodón); *Cylindrocopturus adpersus* LeConte (gorgojo del tallo del girasol); *Diaprepes abbreviatus* Linnaeus (picudo de la raíz); *Hypera punctata* Fabricius (gorgojo del trébol); *Lissorhoptrus oryzophilus* Kuschel (gorgojo de agua del arroz); *Metamasius hemipterus hemipterus* Linnaeus (gorgojo rayado de la caña de azúcar); *M. hemipterus sericeus* Olivier (gorgojo de la caña de azúcar); *Sitophilus granarius* Linnaeus (gorgojo del grano); *S. oryzae* Linnaeus (gorgojo del arroz); *Smicronyx fulvus* LeConte (gorgojo rojo de la semilla del girasol); *S. sordidus* LeConte (gorgojo gris de la semilla del girasol); *Sphenophorus maidis* Chittenden (chinche del maíz); *S. livis* Vaurie (gorgojo de la caña de azúcar); *Rhabdoscelus obscurus* Boisduval (gorgojo de la caña de azúcar de Nueva Guinea); escarabajos pulga, escarabajos del pepino, gusanos de la raíz, gusanos de las hojas, gusanos de la patata y minadores de las hojas de la familia *Chrysomelidae* incluyendo, pero sin limitación: *Chaetocnema ectypa* Horn (escarabajo pulga del maíz del desierto); *C. pulicaria* Melsheimer (escarabajo pulga del maíz); *Colaspis brunnea* Fabricius (colaspis de la uva); *Diabrotica barberi* Smith & Lawrence (gusano de la raíz del maíz del norte); *D. undecimpunctata howardi* Barber (gusano de la raíz del maíz del sur); *D. virgifera virgifera* LeConte (gusano de la raíz del maíz occidental); *Leptinotarsa decemlineata* Say (escarabajo de la patata de colorado); *Oulema melanopus* Linnaeus (escarabajo de las hojas de los cereales); *Phyllotreta cruciferae* Goeze (escarabajo pulga del maíz); *Zygogramma exclamationis* Fabricius (escarabajo del girasol); escarabajos de la familia *Coccinellidae* incluyendo, pero sin limitación: *Epilachna varivestis* Mulsant (escarabajo de la alubia mexicano); chafer y otros escarabajos de la familia *Scarabaeidae* incluyendo, pero sin limitación: *Antitrogus parvulus* Britton (larva de la caña de Childers); *Cyclocephala borealis* Arrow (escarabajo enmascarado del norte); *C. immaculata* Olivier (escarabajo enmascarado del sur); *Dermolepida albohirtum* Waterhouse (larva de la caña de lomo gris); *Euethola humilis rugiceps* LeConte (escarabajo de la caña de azúcar);

Lepidiota frenchi Blackburn (larva de la caña francesa); *Tomarus gibbosus* De Geer (escarabajo de la zanahoria); *T. subtropicus* Blatchley (larva de la caña de azúcar); *Phyllophaga crinita* Burmeister (gusano blanco); *P. latifrons* LeConte (escarabajo de junio); *Popillia japonica* Newman (escarabajo japonés); *Rhizotrogus majalis* Razoumowsky (escarabajo europeo); escarabajos de alfombra de la familia *Dermestidae*; gusanos de alambre de la familia *Elateridae*, *Eleodes* spp., *Melanotus* spp. incluyendo *M. communis* Gyllenhal (gusano de alambre); *Conoderus* spp.; *Limoniuss* spp.; *Agriotes* spp.; *Ctenicera* spp.; *Aeolus* spp.; escarabajos de la corteza de la familia *Scolytidae*; escarabajos de la familia *Tenebrionidae*; escarabajos de la familia *Cerambycidae*, tales como, pero sin limitación, *Migdolus fryanus* Westwood (escarabajo de la caña); y escarabajos de la familia *Buprestidae* incluyendo, pero sin limitación, *Aphanisticus cochinchinae seminulum* Obenberger (escarabajo bupresto minador).

Son interesantes los ejemplares adultos e inmaduros del orden Diptera, incluyendo minadores de las hojas *Agromyza parvicornis* Loew (mosca minadora del maíz); mosquitas que incluyen, pero sin limitación: *Contarinia sorghicola* Coquillett (mosquito del sorgo); *Mayetiola destructor* Say (mosca de Hessian); *Neolasioptera murtfeldtiana* Felt, (mosquito de la semilla del girasol); *Sitodiplosis mosellana* Géhin (mosquito del trigo); moscas de la fruta (*Tephritidae*), *Oscinella frit* Linnaeus (moscas de la fruta); gusanos que incluyen, pero sin limitación: *Delia* spp. incluyendo *Delia platura* Meigen (gusano del maíz); *D. coarctata* Fallen (mosca del trigo); *Fannia canicularis* Linnaeus, *F. femoralis* Stein (moscas menores); *Meromyza americana* Fitch (gusano del tallo del trigo); *Musca domestica* Linnaeus (mosca doméstica); *Stomoxys calcitrans* Linnaeus (moscas de establo)); moscas de la cara, moscas de los cuernos, moscardas, *Chrysomya* spp.; *Phormia* spp.; y otras plagas de moscas muscoides, tábanos *Tabanus* spp.; moscardones *Gastrophilus* spp.; *Oestrus* spp.; larvas del ganado *Hypoderma* spp.; moscas de los ciervos *Chrysops* spp.; *Melophagus ovinus* Linnaeus (keds); y otras *Brachycera*, mosquitos *Aedes* spp.; *Anopheles* spp.; *Culex* spp.; moscas negras *Prosimulium* spp.; *Simulium* spp.; mosquitos mordedores, moscas de la arena, esciáridos y otras *Nematocera*.

Se incluyen como insectos de interés aquellos del orden de los hemípteros, tales como, pero sin limitación, las siguientes familias: *Adelgidae*, *Aleyrodidae*, *Aphididae*, *Asterolecaniidae*, *Cercopidae*, *Cicadellidae*, *Cicadidae*, *Cixiidae*, *Coccidae*, *Coreidae*, *Dactylopiidae*, *Delphacidae*, *Diaspididae*, *Eriococcidae*, *Flatidae*, *Fulgoridae*, *Issidae*, *Lygaeidae*, *Margarodidae*, *Membracidae*, *Miridae*, *Ortheziidae*, *Pentatomidae*, *Phoenicococcidae*, *Phylloxeridae*, *Pseudococcidae*, *Psyllidae*, *Pyrrhocoridae* y *Tingidae*.

Los miembros agrónomicamente importantes del orden de los hemípteros incluyen además, pero sin limitación: *Acrosternum hilare* Say (chinche verde); *Acyrtisiphon pisum* Harris (pulgón del guisante); *Adelges* spp. (adélgidos); *Adelphocoris rapidus* Say (chinche rápida de plantas); *Anasa tristis* De Geer (chinche de la calabaza); *Aphis craccivora* Koch (pulgón del caupí); *A. fabae* Scopoli (pulgón negro de la alubia); *A. gossypii* Glover (pulgón del algodón, pulgón del melón); *A. maidiradicis* Forbes (pulgón de la raíz del maíz); *A. pomi* De Geer (pulgón del manzano); *A. spiraeicola* Patch (pulgón de la spirea); *Aulacaspis tegalensis* Zehntner (escama de la caña de azúcar); *Aulacorthum solani* Kaltenbach (pulgón estriado de la patata); *Bemisia tabaci* Gennadius (mosca blanca del tabaco, mosca blanca del boniato); *B. argentifolii* Bellows & Perring (mosca blanca de alas plateadas); *Blissus leucopterus leucopterus* Say (chinche); *Blostomatidae* spp.; *Brevicoryne brassicae* Linnaeus (pulgón de la col); *Cacopsylla pyricola* Foerster (mieleta del peral); *Calocoris norvegicus* Gmelin (chinche de la cápside de la patata); *Chaetosiphon fragaefolii* Cockerell (pulgón de la fresa); *Cimicidae* spp.; *Coreidae* spp.; *Corythuca gossypii* Fabricius (chinche de encaje); *Cyrtopeltis modesta* Distant (chinche del tomate); *C. notatus* Distant (chicharrita); *Deois flavopicta* Stål (chinche); *Dialeurodes citri* Ashmead (mosca blanca de los cítricos); *Diaphnocoris chlorionis* Say (chinche de la acacia de las tres espinas); *Diuraphis noxia* Kurdjumov/Mordvilko (pulgón del trigo ruso); *Duplacionaspis divergens* Green (escama armada); *Dysaphis plantaginea* Paaserini (pulgón rosado del manzano); *Dysdercus suturellus* Herrich-Schäffer (tinte del algodón); *Dysmicoccus boninsis* Kuwana (chinche harinosa gris de la caña de azúcar); *Empoasca fabae* Harris (saltahojas de la patata); *Eriosoma lanigerum* Hausmann (pulgón lanífero del manzano); *Erythroneoura* spp. (saltahojas de la vid); *Eumetopina flavipes* Muir (saltaplantas de la caña de azúcar); *Eurygaster* spp.; *Euschistus servus* Say (chinche hedionda parda); *E. variolarius* Palisot de Beauvois (chinche hedionda de una mancha); *Graptostethus* spp. (complejo de chinches de semillas); y *Hyalopterus pruni* Geoffroy (pulgón harinoso de la ciruela); *Icerya purchasi* Maskell (cochinilla acanalada); *Labopidicola allii* Knight (chinche de la planta de la cebolla); *Laodelphax striatellus* Fallen (saltahojas menor pardo); *Leptoglossus corculus* Say (chinche del piñón); *Leptodictya tabida* Herrich-Schaeffer (chinche de encaje); *Lipaphis erysimi* Kaltenbach (pulgón del nabo); *Lygocoris pabulinus* Linnaeus (cápsido verde común); *Lygus lineolaris* Palisot de Beauvois (chinche lygus); *L. hesperus* Knight (chinche lygus occidental); *L. pratensis* Linnaeus (chinche del páramo común); *L. rugulipennis* Poppius (chinche lygus europea); *Macrosiphum euphorbiae* Thomas (pulgón de la patata); *Macrolestes quadrilineatus* Forbes (saltahojas del áster); *Magdicada septendecim* Linnaeus (chicharra periódica); *Mahanarva fimbriolata* Stål (chinche salivosa); *M. posticata* Stål (cigarrita de la caña de azúcar); *Melanaphis sacchari* Zehntner (pulgón de la caña de azúcar); *Melanaspis glomerata* Green (escama negra); *Metopolophium dirrhodum* Walker (pulgón rosado de los cereales); *Myzus persicae* Sulzer (pulgón del melocotón-patata, pulgón verde del melocotonero); *Nasonovia ribisnigri* Mosley (pulgón de la lechuga); *Nephotettix cincticeps* Uhler (saltahojas verde); *N. nigropictus* Stål (saltahojas del arroz); *Nezara viridula* Linnaeus (chinche hedionda verde del sur); *Nilaparvata lugens* Stål (saltaplantas pardo); *Nysius ericae* Schilling (falsa chinche); *Nysius raphanus* Howard (falsa chinche); *Oebalus pugnax* Fabricius (chinche hedionda del arroz); *Oncopeltus fasciatus* Dallas (gran chinche del algodóncillo); *Orthops campestris* Linnaeus; *Pemphigus* spp. (pulgones de las raíces y pulgones de las agallas); *Peregrinus maidis* Ashmead (saltaplantas del maíz); *Perkinsiella saccharicida* Kirkaldy (saltahojas de la caña de azúcar); *Phylloxera devastatrix* Pergande (phylloxera del pecán); *Planococcus citri* Risso (pulgón harinoso de

los cítricos); *Plesiocoris rugicollis* Fallen (cápsido de la manzana); *Poecilocapsus lineatus* Fabricius (chinche de plantas de cuatro rayas); *Pseudatomoscelis seriatus* Reuter (saltona del algodón); *Pseudococcus* spp. (otros del complejo de pulgones harinosos); *Pulvinaria elongata* Newstead (escama del ficus); *Pyrilla perpusilla* Walker (saltahojas de la caña de azúcar); *Pyrrhocoridae* spp.; *Quadraspidiotus perniciosus* Comstock (cochinilla de san José); *Reduviidae* spp.;
 5 *Rhopalosiphum maidis* Fitch (pulgón de la hoja del maíz); *R. padi* Linnaeus (pulgón de la avena); *Saccharicoccus sacchari* Cockerell (chinche harinosa rosada de la caña de azúcar); *Scaptocoris castanea* Perty (chinche hedionda parda de las raíces); *Schizaphis graminum* Rondani (chinche verde); *Sipha flava* Forbes (pulgón amarillo de la caña de azúcar); *Sitobion avenae* Fabricius (pulgón del grano inglés); *Sogatella furcifera* Horvath (saltapuntas de dorso blanco); *Sogatodes oryzicola* Muir (saltahojas del arroz); *Spanagonicus albofasciatus* Reuter (pulga saltona negra);
 10 *Therioaphis maculata* Buckton (pulgón moteado de la alfalfa); *Tinidae* spp.; *Toxoptera aurantii* Boyer de Fonscolombe (pulgón negro de los cítricos); y *T. citricida* Kirkaldy (pulgón pardo de los cítricos); *Trialetodes abutiloneus* (mosca blanca de alas bandeadas) y *T. vaporariorum* Westwood (mosca blanca del invernadero); *Trioza diospyri* Ashmead (mieleta del caqui); y *Typhlocyba pomaria* McAtee (saltahojas blanco del manzano).

15 También se incluyen los adultos y las larvas del orden *Acari* (ácaros) tales como *Aceria tosichella* Keifer (ácaro rizado del trigo); *Panonychus ulmi* Koch (araña roja europea); *Petrobia latens* Müller (ácaro pardo del trigo); *Steneotarsonemus bancrofti* Michael (ácaro del tallo de la caña de azúcar); arañas y arañas rojas de la familia *Tetranychidae*, *Oligonychus grypus* Baker & Pritchard, *O. indicus* Hirst (ácaro de la hoja de la caña de azúcar), *O. pratensis* Banks (ácaro de la hierba de Banks), *O. stickneyi* McGregor (arañuela de la caña de azúcar); *Tetranychus*
 20 *urticae* Koch (arañuela de dos puntos); *T. mcdanieli* McGregor (arañuela de McDaniel); *T. cinnabarinus* Boisduval (arañuela carmín); *T. turkestanii* Ugarov & Nikolski (arañuela de la fresa), ácaros planos de la familia *Tenuipalpidae*, *Brevipalpus lewisii* McGregor (ácaro plano de los cítricos); ácaros de la roya de la familia *Eriophyidae* y otros ácaros que se alimentan de hojas importantes en la salud humana y animal, es decir, ácaros del polvo de la familia *Epidermoptidae*, ácaros de los folículos de la familia *Demodicidae*, ácaros del grano de la familia *Glycyphagidae*,
 25 garrapatas y otras *Ixodidae*. *Ixodes scapularis* Say (garrapata del ciervo); *I. holocyclus* Neumann (garrapata paralizante australiana); *Dermacentor variabilis* Say (garrapata común americana); *Amblyomma americanum* Linnaeus (garrapata solitaria); y ácaros de la sarna de las familias *Psoroptidae*, *Pyemotidae* y *Sarcoptidae*.

30 Son interesantes las plagas de insectos del orden *Thysanura*, tales como *Lepisma saccharina* Linnaeus (pececillo de plata); *Thermobia domestica* Packard (insecto de fuego).

Las plagas de artrópodos adicionales abarcadas incluyen: arañas del orden *Araneae* tales como *Loxosceles reclusa* Gertsch & Mulaik (araña reclusa parda); y *Latrodectus mactans* Fabricius (araña viuda negra); y ciempiés del orden *Scutigera*
 35 *Scutigera coleoptrata* Linnaeus (ciempiés doméstico). Además, son interesantes las plagas de insectos del orden de los isópteros, incluyendo aquellos del familia *Termitidae*, tales como, pero sin limitación, *Cornitermes cumulans* Kollar, *Cylindrotermes nordenskiöldi* Holmgren y *Pseudacanthotermes militaris* Hagen (termita de la caña de azúcar); así como de la familia *Rhinotermitidae* incluyendo, pero sin limitación, *Heterotermes tenuis* Hagen. También son de interés los insectos del orden de los tisanópteros, incluyendo, pero sin limitación, trips, tales como *Stenchaetothrips minutus* van Deventer (trips de la caña de azúcar).

40 Las realizaciones de la presente invención se definen adicionalmente en los siguientes ejemplos. Ha de entenderse que estos ejemplos se proporcionan únicamente a modo ilustrativo.

Ejemplos

45 **Ejemplo 1. Transformación de maíz mediante transformación con *Agrobacterium* y regeneración de plantas transgénicas que contienen los genes *Cry1F*, *Cry34Ab1*, *Cry35Ab1* (*Cry34/35Ab1*) y *Pat***

50 El maíz 4114 se produjo mediante transformación mediada por *Agrobacterium* con el plásmido PHP27118. Este evento contiene los casetes génicos *cry1F*, *cry34Ab1*, *cry35Ab1* y *pat*, que confieren resistencia a ciertas plagas de lepidópteros y coleópteros.

Específicamente, el primer casete contiene una versión truncada del gen *cry1F* de *Bt* var. *aizawai*. La inserción del gen *cry1F* confiere resistencia al daño por plagas de lepidópteros, incluyendo ECB y FAW. La proteína *Cry1F* (SEQ ID NO: 1) está formada por 605 aminoácidos y tiene un peso molecular de aproximadamente 68 kDa. La expresión del gen *cry1F* está controlada por el promotor de poliubiquitina de maíz (Christensen *et al.*, 1992, anteriormente citado), que proporciona expresión constitutiva de la proteína *Cry1F* en maíz. Esta región también incluye la 5' UTR y el intrón asociado con el promotor de poliubiquitina nativo. El terminador para el gen *cry1F* es la señal de adición de poli(A) del marco abierto de lectura 25 (ORF 25) del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) pTi15955 (Barker
 60 *et al.*, 1983, supra).

El segundo casete contiene el gen *cry34Ab1* aislado de *Bt* cepa PS149B1 (Patentes de los Estados Unidos n.º 6.127.180; 6.624.145 y 6.340.593). La proteína *Cry34Ab1* (SEQ ID NO: 2) tiene 123 aminoácidos de longitud y tiene un peso molecular de aproximadamente 14 kDa. La expresión del gen *cry34Ab1* se controla por una segunda copia del promotor de poliubiquitina de maíz con 5' UTR e intrón (Christensen *et al.*, 1992, anteriormente citado). El terminador para el gen *cry34Ab1* es el terminador *pinII* (Keil *et al.*, 1986, anteriormente citado; An *et al.*, 1989,

anteriormente citado).

El tercer casete génico contiene el gen *cry35Ab1*, también aislado de *Bt* cepa PS149B1 (Patentes de los Estados Unidos n.º 6.083.499; 6.548.291 y 6.340.593). La proteína Cry35Ab1 (SEQ ID NO: 3) tiene una longitud de 383 aminoácidos y un peso molecular de aproximadamente 44 kDa. La expresión simultánea de las proteínas Cry34Ab1 y Cry35Ab1 en la planta confiere resistencia a los insectos coleópteros, incluyendo la WCRW. La expresión del gen *cry35Ab1* está controlada por la secuencia de promotor y líder de peroxidasa de *Triticum aestivum* (trigo) (Hertig *et al.* 1991, anteriormente citado). El terminador para el gen *cry35Ab1* es una segunda copia del terminador *pinII* (Keil *et al.* 1986, anteriormente citado; An *et al.* 1989, anteriormente citado).

El casete cuarto y final contiene una versión de *pat* de *Streptomyces viridochromogenes* que se ha optimizado para su expresión en maíz. El gen *pat* expresa PAT, que confiere tolerancia a la fosfotricina (glufosinato-amonio). La proteína PAT (SEQ ID NO: 4) tiene 183 aminoácidos de longitud y tiene un peso molecular de aproximadamente 21 kDa. La expresión del gen *pat* está controlada por las regiones promotoras y terminadoras del transcrito de 35S de CaMV (Franck *et al.*, 1980, anteriormente citado; Odell *et al.*, 1985, anteriormente citado; Pietrzak, *et al.*, 1986, anteriormente citado). También se proporcionan plantas que contienen las construcciones de ADN. Una descripción de los elementos genéticos en el ADN-T de PHP27118 (expuesto en la SEQ ID NO: 5) y sus fuentes se describen adicionalmente en la tabla 1.

Tabla 1: Elementos genéticos en la región de ADN-T del plásmido PHP27118

Ubicación en el ADN-T (posición de pb)	Elemento genético	Tamaño (pb)	Descripción
1 a 25	Borde derecho	25	Región de RB de ADN-T del plásmido Ti de <i>A. tumefaciens</i>
26 a 76	Región del plásmido Ti	51	Secuencia no funcional del plásmido Ti de <i>A. tumefaciens</i>
77 a 114	Región polienlazadora	38	Región necesaria para clonar elementos genéticos
115 a 1014	Promotor de <i>ubiZM1</i>	900	Región promotora del gen de poliubiquitina de <i>Zea mays</i> (Christensen <i>et al.</i> , 1992, anteriormente citado)
1015 a 1097	5' UTR de <i>ubiZM1</i>	83	5' UTR del gen de poliubiquitina de <i>Zea mays. Id.</i>
1098 a 2107	Intrón de <i>ubiZM1</i>	1010	Región intrónica del gen de poliubiquitina de <i>Zea mays. Id.</i>
2108 a 2129	Región polienlazadora	22	Región necesaria para clonar elementos genéticos
2130 a 3947	Gen <i>cry1F</i>	1818	Versión troncada de <i>cry1F</i> de <i>Bt</i> var. <i>aizawai</i>
3948 a 3992	Región polienlazadora	45	Región necesaria para clonar elementos genéticos
3993 a 4706	Terminador del ORF 25	714	Secuencia terminadora del ORF 25 de pTi15955 de <i>A. tumefaciens</i> (Barker <i>et al.</i> , 1983, anteriormente citado)
4707 a 4765	Región polienlazadora	59	Región necesaria para clonar elementos genéticos
4766 a 5665	Promotor de <i>ubiZM1</i>	900	Región promotora del gen de poliubiquitina de <i>Zea mays</i> (Christensen <i>et al.</i> , 1992, anteriormente citado)
5666 a 5748	5' UTR de <i>ubiZM1</i>	83	5' UTR del gen de poliubiquitina de <i>Zea mays. Id.</i>
5749 a 6758	Intrón de <i>ubiZM1</i>	1010	Región intrónica del gen de poliubiquitina de <i>Zea mays. Id.</i>
6759 a 6786	Región polienlazadora	28	Región necesaria para clonar elementos genéticos
6787 a 7158	Gen <i>cry34Ab1</i>	372	Versión sintética de <i>cry34Ab1</i> que codifica la proteína cristal paraesporal de delta-endotoxina de 14 kDa de la cepa no móvil PS149B1 de <i>Bt</i> (Moellenbeck <i>et al.</i> (2001) Nature Biotech. 19:668-672; Ellis <i>et al.</i> (2002) Appl. Env. Microbiol. 68(3):1137-1145; Herman <i>et al.</i> (2002) Environ. Entomol. 31(2):208-214).
7159 a 7182	Región polienlazadora	24	Región necesaria para clonar elementos genéticos
7183 a 7492	Terminador de <i>pinII</i>	310	Región terminadora del gen de inhibidor de proteinasa II de <i>Solanum tuberosum</i> (Keil <i>et al.</i> 1986, anteriormente citado; An <i>et al.</i> 1989, anteriormente citado)
7493 a 7522	Región polienlazadora	30	Región necesaria para clonar elementos genéticos

(continuación)

Ubicación en el ADN-T (posición de pb)	Elemento genético	Tamaño (pb)	Descripción
7523 a 8820	Peroxidasa de TA	1298	Promotor de peroxidasa de <i>Triticum aestivum</i> que incluye la secuencia líder (Hertig <i>et al.</i> 1991, anteriormente citado)
8821 a 8836	Región polienlazadora	16	Región necesaria para clonar elementos genéticos
8837 a 9988	cry35Ab1	1152	Versión sintética de cry35Ab1 que codifica una proteína cristal paraesporal de delta-endotoxina de A 44 kDa de la cepa no móvil PS149B1 de Bt (Moellenbeck <i>et al.</i> 2001, anteriormente citado; Ellis <i>et al.</i> 2002, anteriormente citado; Herman <i>et al.</i> 2002, anteriormente citado)
9989 a 10012	Región polienlazadora	24	Región necesaria para clonar elementos genéticos
10013 a 10322	Terminador pinII	310	Región terminadora del gen de inhibidor de proteínasa II de <i>Solanum tuberosum</i> (Keil <i>et al.</i> 1986, anteriormente citado; An <i>et al.</i> 1989, anteriormente citado)
10323 a 10367	Región polienlazadora	45	Región necesaria para clonar elementos genéticos
10368 a 10897	Promotor 35S de CaMV	530	Promotor 35S de CaMV (Franck <i>et al.</i> , 1980, anteriormente citado; Odell <i>et al.</i> , 1985, anteriormente citado; Pietrzak, <i>et al.</i> , 1986, anteriormente citado)
10898 a 10916	Región polienlazadora	19	Región necesaria para clonar elementos genéticos
10917 a 11468	Gen <i>pat</i>	552	Secuencia codificante sintética optimizada para plantas de fosfinotricina acetiltransferasa de <i>Streptomyces viridochromogenes</i> .
11469 a 11488	Región polienlazadora	20	Región necesaria para clonar elementos genéticos
11489 a 11680	Terminador de CaMV35S	192	Terminador 35S de CaMV (Franck <i>et al.</i> , 1980, anteriormente citado; Pietrzak, <i>et al.</i> , 1986, anteriormente citado)
11681 a 11756	Región polienlazadora	76	Región necesaria para clonar elementos genéticos
11757 a 11953	Región del plásmido Ti	197	Secuencia no funcional del plásmido Ti de <i>A. tumefaciens</i>
11954 a 11978	Borde izquierdo	25	Región de LB de ADN-T del plásmido Ti de <i>A. tumefaciens</i>

Se extrajeron en condiciones asépticas embriones inmaduros de maíz (*Zea mays* L.) de la cariósida en desarrollo nueve a once días después de la polinización y se inocularon con *A. tumefaciens* cepa LBA4404 que contenía el plásmido PHP27118 (figura 1), esencialmente como se describe en Zhao (Patente de los Estados Unidos n.º 5.981.840). La región de ADN-T de PHP27118 se muestra en la figura 2. Después de tres a seis días de cultivo conjunto del embrión y el *Agrobacterium* en medio de cultivo sólido sin selección, se transfirieron los embriones a un medio sin selección con herbicida pero que contenía carbenicilina. Después de tres a cinco días en este medio, se transfirieron los embriones a medio de selección que era estimulante para la embriogénesis somática del maíz y que contenía bialafos para la selección de células que expresan el transgén *pat*. El medio también contenía carbenicilina para eliminar cualquier *Agrobacterium* restante. Después de seis a ocho semanas en el medio de selección, se identificaron callos sanos en crecimiento que demostraron resistencia al bialafos. Los supuestos callos transgénicos se regeneraron posteriormente para producir plántulas de T0.

Se tomaron muestras de las plántulas de T0 para su análisis por la PCR para verificar la presencia y el número de copias de los genes *cry1F*, *cry35Ab1*, *cry34Ab1* y/o *pat* insertados. Se confirmó que el evento de maíz DP-004114-3 contenía una sola copia del ADN-T (véanse los ejemplos 2 y 3). Además de este análisis, se analizaron las plántulas de T0 respecto de la presencia de ciertas secuencias de la cadena principal del vector binario de *Agrobacterium* mediante la PCR (datos no mostrados). Se seleccionaron las plantas en las que se determinó que tenían una sola copia para los genes insertados y negativas para las secuencias de la cadena principal de *Agrobacterium* para su propagación adicional en el invernadero. Se sometió a estas plantas de T0 seleccionadas a una detección sistemática de eficacia de rasgos y de expresión de proteínas llevando a cabo numerosos bioensayos (véase el ejemplo 5). Las plantas de T0 que cumplían todos los criterios pasaron a la siguiente fase y se cruzaron con líneas endógamas para producir simiente para las pruebas posteriores. En la figura 3 se muestra una vista general de la transformación y el desarrollo del evento.

Ejemplo 2. Caracterización del evento de maíz DP-004114-3

Se aisló ADN genómico de tejido foliar de simiente de ensayo de maíz 4114 y una sustancia de control (simiente de un maíz no modificado genéticamente con un acervo genético representativo del acervo genético del evento) y se sometió a amplificación mediante PCR cualitativa usando un par de cebadores específicos para la construcción. Los productos de la PCR se separaron en un gel de agarosa para confirmar la presencia de la construcción insertada en el ADN genómico aislado de la simiente de ensayo y la ausencia de la construcción insertada en el ADN genómico aislado de la simiente de control. Se usó un patrón de referencia (escala para ADN de baja masa; Invitrogen Corporation, n.º de catálogo 10380-012) para determinar el tamaño del producto de la PCR. Se evaluó la fiabilidad del método PCR específico para la construcción repitiendo tres veces el experimento. Se evaluó la sensibilidad de la amplificación por la PCR mediante diversas diluciones del ADN genómico del maíz 4114.

Se recogieron muestras foliares de ensayo y control (etapa foliar V5-V7) de plantas cultivadas en la Estación Experimental de DuPont (Wilmington, DE) a partir de semillas obtenidas de Pioneer Hi-Bred (Johnston, IA). Se llevaron a cabo extracciones de ADN genómico de los tejidos foliares de ensayo y de control usando un protocolo de extracción de urea convencional.

El ADN genómico se cuantificó usando el espectrofotómetro NanoDrop 1000 usando el programa informático ND-1000 V3.6 (ThermoScientific, Wilmington, DE) y el reactivo Quant-iT PicoGreen® (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las muestras de ADN se visualizaron en un gel de agarosa para confirmar los valores de cuantificación y para determinar la calidad del ADN.

Las muestras de ADN genómico aisladas del tejido foliar del maíz 4114 y las muestras de control se sometieron a amplificación por la PCR (Roche High Fidelity PCR Master Kit, Roche, n.º de catálogo 12140314001) utilizando un par de cebadores específicos para la construcción (SEQ ID NO: 7 y 8) que abarcan el terminador del ORF 25 de maíz y el promotor de ubiquitina (véase la figura 2) y permite la identificación única del ADN-T insertado en el maíz 4114. Un segundo par de cebadores (SEQ ID NO: 9 y 10) se usó para amplificar el gen de invertasa endógeno de maíz (n.º de referencia de GenBank AF171874.1) como control positivo para la amplificación por la PCR. El sitio diana de la PCR y el tamaño del producto de la PCR esperado para cada cebador se muestran en la tabla 2. Los reactivos de la PCR y las condiciones de reacción se muestran en la tabla 3. En este estudio, se usaron 50 ng de ADN genómico foliar en todas las reacciones PCR.

Tabla 2: Sitio diana de ADN genómico de la PCR y tamaño esperado de los productos de la PCR

Conjunto de cebadores	Sitio diana	Tamaño esperado del producto de la PCR (pb)
SEQ ID NO: 7 y 8	ADN-T específico de la construcción: Terminador y promotor de ubiquitina de ORF 25	287
SEQ ID NO: 9 y 10	gen de invertasa de maíz endógeno	225

Tabla 3: Reactivos y condiciones de reacción de la PCR

Reactivos de la PCR		Condiciones de reacción de la PCR			
Reactivo	Volumen (µl)	Elemento del ciclo	Temp (°C)	Tiempo (s)	n.º de ciclos
ADN molde (25 ng/µl)	2	Desnaturalización inicial	94	120	1
Cebador 1 (10 µM)	2	Desnaturalización	94	10	35
Cebador 2 (10 µM)	2	Hibridación	65	15	
Mezcla maestra de la PCR*	25	Elongación	68	60	
ddH ₂ O	19	Elongación final	68	420	1
---		Retener ciclo	4	Hasta su análisis	---

ddH₂O: agua doblemente destilada
 * Mezcla maestra de alta fidelidad de Roche

Un producto de la PCR con un tamaño de aproximadamente 300 pb amplificado mediante el conjunto de cebadores específicos para la construcción (SEQ ID NO: 7 y 8) se observa en las reacciones de la PCR usando el plásmido PHP27118 (10 ng) como molde y todas las muestras de ADN de maíz 4114, pero en ausencia de todas las muestras de maíz de control y el control sin molde. Este experimento se repitió tres veces y se obtuvieron resultados similares.

Los resultados observados para los extractos de ADN de cinco plantas de maíz 4114 y cinco plantas de maíz de control correspondieron estrechamente con el tamaño del producto de la PCR esperado (287 pb) para las muestras que contenían ADN genómico de maíz 4114. Se observó un producto de la PCR con un tamaño de aproximadamente 220 pb para las muestras tanto de maíz 4114 como de maíz de control después de la reacción PCR con el conjunto de cebadores (SEQ ID NO: 9 y 10) para la detección del gen de invertasa de maíz endógeno. Estos resultados corresponden estrechamente con el tamaño esperado del producto de la PCR (225 pb) para las muestras de ADN genómico que contienen el gen de invertasa endógeno de maíz. La banda diana endógena no se observó en el control sin molde.

Para evaluar la sensibilidad de la amplificación mediante la PCR, se diluyeron diversas concentraciones de una sola muestra de ADN de maíz 4114 en ADN de control no modificado genéticamente, dando como resultado cantidades de ADN de maíz 4114 en el intervalo de 500 fg, 5 pg, 10 pg, 50 pg, 100 pg, 500 pg, 5 ng y 50 ng (la cantidad total de ADN genómico en todas las muestras de la PCR fue de 50 ng). Cada dilución se sometió a amplificación PCR como se efectuó anteriormente. Basándose en este análisis, se determinó que el límite de detección (LDD) era de aproximadamente 100 pg de ADN de maíz 4114 en 50 ng de ADN total o un 0,2 % de ADN de maíz 4114.

En conclusión, el análisis por PCR cualitativa utilizando un conjunto de cebadores específico para la construcción para el maíz 4114 confirmó que las plantas de ensayo contenían el ADN-T insertado del plásmido PHP27118, como resulta evidente por la presencia de la banda diana específica para la construcción en todas las muestras de planta de ensayo analizadas y la ausencia en las plantas de control no modificadas genéticamente. Este resultado fue reproducible. Las plantas de ensayo y de control contenían el gen endógeno de invertasa de maíz. La sensibilidad del análisis en las condiciones descritas es de aproximadamente 100 pg de ADN genómico de maíz 4114 en 50 ng de ADN genómico total o un 0,2 % de ADN genómico de maíz 4114.

25 **Ejemplo 3. Análisis de transferencia de Southern de maíz DP-004114-3 para determinar la integridad y el número de copias**

Se usó análisis de transferencia de Southern para confirmar la integridad y el número de copias del ADN-T insertado de PHP27118 y para confirmar la presencia de los casetes génicos de *cry1F*, *cry34Ab1*, *cry35Ab1* y *pat* en el maíz 4114.

Se seleccionaron cinco plantas individuales de la generación T1 del maíz 4114 para su análisis por transferencia de Southern. Se recogió material foliar joven de las plantas de maíz 4114 (ensayo) y de maíz no transgénicas (control) y se colocó inmediatamente sobre nieve carbónica. Las muestras congeladas se liofilizaron y se extrajo el ADN genómico de los tejidos de ensayo y de control usando un método de extracción con CTAB.

Después de las digestiones con enzima de restricción como se detallan más adelante, se separaron los fragmentos de ADN en geles de agarosa, se despurinizaron, se desnaturalizaron y se neutralizaron in situ y se transfirieron a una membrana de nylon en tampón SSC 20X usando el método descrito para el TURBOBLOTTER™ Rapid Downward Transfer System (Schleicher y Schuell). Después de la transferencia a la membrana, el ADN se unió a la membrana mediante reticulación con luz ultravioleta.

Integridad

Se seleccionó la enzima de restricción *Hind* III para el análisis por transferencia de Southern de la integridad, ya que hay tres sitios ubicados en el ADN-T (figura 2). Se digirieron aproximadamente 1-3 µg de ADN genómico con *Hind* III y se separaron por tamaños en un gel de agarosa. Como control positivo, se añadieron aproximadamente 15 pg de plásmido que contenía el ADN-T de PHP27118 en una muestra de ADN vegetal de control, se digirió y se incluyó en el gel de agarosa. También se incluyó un control negativo para verificar la hibridación de fondo de la sonda al genoma de maíz.

Para la hibridación, se usaron cuatro sondas homólogas para los genes *cry1F*, *cry34Ab1*, *cry35Ab1* y *pat* en el ADN-T de PHP27118 (para los elementos génicos, véase la figura 2) para confirmar la presencia de los genes. Para desarrollar las sondas, se generaron fragmentos homólogos a los genes *cry1F*, *cry34Ab1*, *cry35Ab1* y *pat* mediante la PCR a partir del plásmido que contenía el ADN-T de PHP27118, se separaron por tamaños en un gel de agarosa y se purificaron usando un kit de extracción de gel QIAquick® (Qiagen). Posteriormente se generaron todas las sondas de ADN a partir de los fragmentos usando el sistema de marcado de ADN Rediprime™ II (Amersham) que lleva a cabo el marcaje prima aleatorio con [³²P]dCTP.

Las sondas marcadas se hibridaron con el ADN diana en las membranas de nylon para la detección de los fragmentos específicos usando la solución de hibridación MiracleHyb® esencialmente como se describe por el fabricante (Stratagene). Los lavados después de la hibridación se llevaron a cabo en condiciones de alta rigurosidad. Las transferencias se expusieron a una película de rayos X a -80 °C durante uno o más puntos de tiempo para detectar los fragmentos de hibridación.

Debido a que se conocen los sitios de la enzima *Hind* III en el ADN-T, se determinaron los tamaños esperados de la

banda para cada una de las sondas (tabla 4, figura 2). Para una copia intacta del ADN-T, se esperaba que la sonda para *cry1F* hibridase con un fragmento de 3891 pb. Se esperaba que las sondas para los genes *cry34Ab1*, *cry35Ab1* y *pat* se hibridasen a un fragmento de 7769 pb. Los fragmentos de las muestras de ensayo que coinciden con los tamaños esperados, así como coincidentes con las bandas en la muestra de control de plásmido, pueden confirmar la integridad del ADN-T insertado y la presencia de cada gen.

Los resultados del análisis de transferencia de Southern con *Hind* III y las sondas para los genes *cry1F*, *cry34Ab1*, *cry35Ab1* y *pat* confirmó los tamaños de fragmento esperados y, por lo tanto, confirmaron que el ADN-T se insertó intacto en cada uno de los eventos y que estaba presente cada uno de los genes.

Se observó una banda de aproximadamente 4 kb con la sonda para *cry1F*, lo que es coherente con el tamaño de fragmento esperado. Se observó un fragmento similar de aproximadamente 4 kb en el carril de control positivo de plásmido, que se supuso que era la banda esperada de 3891 pb. Basándose en la migración equivalente de la banda de hibridación en los eventos para la banda en el control positivo de plásmido, se confirmó que la porción del ADN-T que contenía *cry1F* se había insertado intacta en el maíz 4114.

En la hibridación con la sonda para *cry34Ab1*, se observó una banda de aproximadamente 8 kb en el evento y también en el control positivo del plásmido. Se supuso que la banda de hibridación en el carril de control positivo de plásmido era la banda esperada de 7769 pb. Debido a que la banda de hibridación en el evento había migrado de manera equivalente con esta banda, se confirmó que esta porción del ADN-T que contenía *cry34Ab1* se había insertado intacta.

De manera similar, las hibridaciones con *cry35Ab1* y *pat* se hibridaron con el mismo fragmento de 7769 pb en la planta y el control positivo de plásmido, como se esperaba. Estos resultados confirmaron que la porción del ADN-T que contenía los genes *cry35Ab1* y *pat* se había insertado intacta.

Este análisis por transferencia de Southern confirma que el maíz 4114 contiene una copia intacta del ADN-T de PHP27118 que contiene los genes *cry1F*, *cry34Ab1*, *cry35Ab1* y *pat*.

Tabla 4: Sumario de los fragmentos de hibridación esperados y observados en las transferencias de Southern para el ADN de maíz 4114 digerido con *Hind* III

Sonda	Tamaño de fragmento esperado del ADN-T de PHP27118 (pb) ¹	Tamaño de fragmento observado (kb) ²
<i>cry1F</i>	3891	~ 4
<i>cry34Ab1</i>	7769	~ 8
<i>cry35Ab1</i>	7769	~ 8
<i>pat</i>	7769	~ 8

1 Tamaños de fragmento esperados basándose en el mapa del ADN-T de PHP27118 (figura 2).
 2 Todos los fragmentos observados migraron de manera equivalente con el control positivo de plásmido y, por lo tanto, se confirmó que representan la porción intacta del ADN-T de PHP27118.

Número de copias

Se usaron las sondas para *cry1F* y *pat* en las hibridaciones por transferencia de Southern para evaluar el número de copias de las inserciones en maíz 4114.

Se seleccionó la enzima de restricción *Bcl* I para el análisis por transferencia de Southern del número de copias, ya que hay un solo sitio ubicado en el ADN-T (figura 2). Aproximadamente 3 µg de ADN genómico de plantas individuales de la generación T1 del evento 4114 se digirieron con *Bcl* I y se separaron por tamaños en un gel de agarosa. Se añadió un plásmido que contenía el ADN-T de PHP27118 en una muestra de ADN vegetal de control, se digirió y se incluyó en el gel de agarosa para que sirviese como control positivo de hibridación. También se incluyó ADN de maíz de control negativo para verificar la hibridación de fondo de la sonda al genoma de maíz. Se incluyó el marcador de peso molecular de ADN VII, marcado con digoxigenina (DIG) (Roche, Indianápolis, IN), en las transferencias de *Bcl* I como patrón de tamaño para los fragmentos de hibridación.

Las sondas para los genes *cry1F* y *pat* también se marcaron mediante una reacción PCR que incorpora un nucleótido marcado con digoxigenina (DIG), [DIG-11]-dUTP, en el fragmento. El marcaje mediante la PCR de los fragmentos aislados se llevó a cabo de acuerdo con los procedimientos proporcionados en el kit de síntesis de la sonda de DIG para la PCR (Roche).

Las sondas marcadas con DIG se hibridaron con las transferencias de Southern de *Bcl* I de la generación T1 del evento 4114. Las sondas se hibridaron con el ADN diana para la detección de los fragmentos específicos usando la

solución DIG Easy Hyb (Roche) esencialmente como se describe por el fabricante. Los lavados después de la hibridación se llevaron a cabo en condiciones de alta rigurosidad. Las sondas marcadas con DIG hibridadas a los fragmentos unidos se detectaron usando el sistema para detección de ácido nucleico quimioluminiscente CDP-Star (Roche). Las transferencias se expusieron a una película de rayos X a temperatura ambiente durante uno o más puntos de tiempo para detectar los fragmentos de hibridación. Las membranas se despojaron de sonda hibridada siguiendo las recomendaciones del fabricante antes de la hibridación con sondas adicionales.

La enzima de restricción *Bcl*I, que tiene un solo sitio de restricción en el ADN-T (figura 2), se seleccionó para confirmar la presencia de una sola inserción de ADN-T de PHP27118 en el maíz 4114. El sitio para *Bcl*I está ubicado en el pb 2546 del ADN-T (figura 2) y proporcionará fragmentos de más de aproximadamente 2500 pb y 9400 pb para un solo ADN-T insertado. La hibridación con la sonda de *pat* podría indicar el número de copias de este elemento hallado en el evento basándose en el número de bandas de hibridación (por ejemplo, una banda de hibridación indica una copia del elemento). La sonda para *pat* podría hibridar con el fragmento de más de 9400 pb. Debido a que el sitio de la enzima de restricción *Bcl*I se encuentra en el gen *cry1F*, se espera que la sonda para *cry1F* se hibride a ambos fragmentos y dé como resultado dos bandas para una sola inserción de ADN-T (figura 2).

Los resultados del análisis de transferencia de Southern con *Bcl*I y las sondas para los genes *cry1F* y *pat* para el maíz 4114 se resumen en la tabla 5.

Tabla 5: Sumario de los fragmentos de hibridación esperados y observados en transferencias de Southern para digestiones con *Bcl*I de maíz 4114

Sonda	Digestión enzimática	Tamaño de fragmento esperado del ADN-T de PHP27118 (pb) ¹	Tamaño de fragmento observado (kb) ²
<i>cry1F</i>	<i>Bcl</i> I	> 2500 ³ > 9400	~ 3,1> 8,6
<i>pat</i>	<i>Bcl</i> I	>9400	>8,6

¹ Tamaños de fragmento esperados basándose en el mapa del ADN-T de PHP27118 (figura 2).
² Todos los tamaños de fragmento observados se aproximan basándose en la migración del marcador de peso molecular DIG VII.
³ Se esperan dos fragmentos con la sonda para *cry1F* debido a la ubicación del sitio de restricción de *Bcl*I en el gen *cry1F*.

Los resultados del análisis de transferencia de Southern del maíz 4114 con digestión con *Bcl*I y la sonda para *cry1F* mostró dos bandas como se esperaba, una banda de más de 8,6 kb y una segunda banda de aproximadamente 3,1 kb. Se esperan dos bandas para una sola inserción debido a la ubicación del sitio de *Bcl*I en el gen *cry1F*, por lo que estos resultados indican que hay una sola copia de *cry1F* en el maíz 4114. Los resultados del análisis de transferencia de Southern del maíz 4114 con digestión con *Bcl*I y la sonda para *pat* mostraron una sola banda de más de 8,6 kb que coincidía con el tamaño de la banda de *cry1F* de mayor tamaño, como se esperaba. Estos resultados indican que también hay una sola inserción del gen *pat* en el evento de maíz 4114.

Ya que los genes *cry34Ab1* y *cry35Ab1* están ubicados en el mismo fragmento que el gen *pat* y parte del gen *cry1F* y entre los genes *cry1F* y *pat* en el ADN-T, por extensión esto también demuestra que es probable que este evento contenga una sola copia de cada uno de estos genes.

Ejemplo 4. Caracterización por secuenciación del inserto y las regiones de borde genómico del evento de maíz DP-004114-3

La secuencia del inserto y de las regiones de borde genómico se determinaron para confirmar la integridad del ADN insertado y para caracterizar la secuencia genómica que flanquea el sitio de inserción presente en el maíz 4114. En total, se confirmaron 16.752 pb de la secuencia genómica de maíz 4114, que comprende 2.422 pb de la secuencia de borde genómico 5', 2.405 pb de la secuencia de borde genómico 3' y 11.925 pb de ADN-T insertado de PHP27118. Se observó que el ADN-T insertado en el maíz 4114 tenía una eliminación de 29 pb en el extremo del borde derecho (RB) y una eliminación de 24 pb en el extremo del borde izquierdo (LB). Toda la demás secuencia se encuentra intacta y es idéntica a la del plásmido PHP27118. Se verificó que las regiones del borde genómico 5' y 3' del maíz 4114 eran procedentes de maíz mediante amplificación por la PCR y secuenciación de las regiones de borde genómico de plantas tanto de maíz 4114 como de maíz de control.

Se obtuvo simiente que contenía el evento DP-004114-3 de una generación T1S2 de maíz 4114. Se obtuvo simiente de control de una línea de maíz que tiene un acervo genético similar al del maíz 4114 pero que no contiene los casetes genéticos de *cry1F*, *cry34Ab1*, *cry35Ab1* y *pat*. Todas las semillas se obtuvieron de Pioneer Hi-Bred International, Inc. (Johnston, IA). Se usaron la escala de ADN de bajo peso molecular (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) y la escala de ADN de alto peso molecular (Invitrogen Corp.) para la electroforesis en gel para estimar los tamaños de fragmento de ADN en geles de agarosa.

Se sembraron la simiente de maíz 4114 y la simiente de control en cámaras de crecimiento en la estación experimental de DuPont (Wilmington, DE) para producir los tejidos vegetales usados para este estudio. Se sembró una semilla por maceta y la maceta se identificó de manera única. Todas las plantas se cultivaron con luz, temperatura y agua reguladas para un crecimiento saludable de la planta. Se recogieron muestras foliares de las plantas de maíz de control y 4114. Para cada planta individual, se recogió material foliar en una bolsa premarcada, se colocó sobre nieve carbónica y después se transfirió a un congelador a temperatura extremadamente baja (<-55 °C) después de la recogida. Todas las muestras se mantuvieron congeladas hasta el procesamiento de los tejidos.

Confirmación del genotipo mediante análisis PCR específico de evento

Se tomó una muestra foliar de todas las plantas de ensayo y de control para un análisis PCR específico para eventos. Se extrajo ADN de cada muestra foliar usando el kit para la PCR de plantas Extract-N-Amp™ siguiendo el procedimiento descrito (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) para el análisis por PCR en tiempo real.

La PCR en tiempo real se llevó a cabo en cada muestra de ADN usando un sistema de detección de secuencia ABI PRISM® 7500HT (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA). Se diseñaron conjuntos de sondas TaqMan® (Applied Biosystems, Inc.) y cebadores (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) para detectar una secuencia diana de maíz 4114. Además, se usó un segundo conjunto de sonda TaqMan® y cebador para un gen endógeno de maíz de referencia para confirmar la presencia de ADN amplificable en cada reacción. El análisis consistió en la determinación por PCR en tiempo real de las llamadas positivas/negativas cualitativas. El ADN extraído se evaluó usando la mezcla maestra para PCR universal TaqMan®, No AmpErase® UNG (Applied Biosystems, Inc.).

La determinación positiva o negativa para el maíz 4114 se basó en la comparación del CT (ciclo umbral) de la PCR diana específica para el evento con la de la diana de referencia endógena de maíz. En caso de que dianas de la PCR del evento y endógenas se amplificasen por encima del CT umbral, la planta se marcó como positiva para dicho evento. En caso de que se amplificase la diana endógena y no la diana del evento, la planta se puntuó como negativa. En caso de que no se amplificase ninguna de las dianas para una muestra particular, se determinó que era una muestra de ADN de mala calidad o un ensayo fallido y se repitió el ensayo.

Todas las plantas de maíz 4114 fueron positivas para la PCR específica del evento y las proteínas PAT, Cry1F y Cry34Ab1, mientras que todas las plantas de maíz de control fueron negativas. Los resultados se resumen en la tabla 6.

Tabla 6. Sumario del análisis PCR específico para el evento y la expresión de las proteínas Cry1F, Cry34Ab1 y PAT en plantas de maíz 4114 y de maíz de control

ID de la planta de maíz 4114	PCR específica para el evento ¹	Cry1F ²	Cry34Ab1 ²	PAT ²
T-F-08-233C-1	+	+	+	+
T-F-08-233C-2	+	+	+	+
T-F-08-233C-3	+	+	+	+
T-F-08-233C-4	+	+	+	+
ID de la planta de maíz de control				
C-F-08-246C-1	-	-	-	-
C-F-08-246C-2	-	-	-	-

1. Sumario del ensayo de PCR en tiempo real específica de evento para maíz 4114. Positivo (+) indica la presencia del evento de maíz 4114. Negativo (-) indica la ausencia del evento de maíz 4114.
 2. Sumario de la expresión de proteína Cry1F, Cry34Ab1 y PAT en plantas de maíz 4114 y de maíz de control usando dispositivos de flujo lateral. Positivo (+) indica la presencia de la proteína. Negativo (-) indica la ausencia de la proteína.

Secuenciación de ADN

Los fragmentos de ADN se clonaron y enviaron para su secuenciación al servicio de secuenciación de Pioneer Crop Genetics Research (Wilmington, DE). Se usó el programa informático Sequencher™ de Gene Codes Corporation (Ann Arbor, Michigan) para ensamblar las secuencias. La anotación de secuencias se llevó a cabo usando Vector NTI 9.1.0 (Invitrogen Corp) comparando las secuencias de inserto de ADN-T generadas a partir del maíz 4114 con las secuencias de la región de ADN-T del plásmido PHP27118 (usadas para la transformación para producir maíz 4114).

La región de ADN-T del plásmido PHP27118, usada para crear maíz 4114, se secuenció y comparó con la secuencia de ADN-T insertada en el maíz 4114.

Se usó la secuencia de la región de ADN-T del plásmido PHP27118 para diseñar pares de cebadores para caracterizar el ADN-T insertado en el maíz 4114. Se generaron seis productos de la PCR solapantes usando ADN genómico de cuatro plantas de maíz 4114 diferentes como molde. Estos productos de la PCR se clonaron y secuenciaron.

5

Secuenciación de las regiones de borde genómico flanqueante 5' y 3'

La caracterización de secuencia preliminar de las regiones de borde genómico flanqueantes 5' y 3' se llevaron a cabo usando varias rondas de PCR inversa, (Silver y Keerikatte (1989) J. Virol. 63: 1924; Ochman *et al.* (1988) Genetics 120:621-623; Triglia *et al.*, (1988) Nucl. Acids Res. 16:8186) con cebadores anclados en varias regiones del ADN-T insertado. La información de secuencia obtenida de la PCR inversa se sometió a análisis BLASTn y se mostró que coincidían con el clon BAC de maíz AC211214 de la base de datos de nucleótidos GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Esta secuencia se usó posteriormente para diseñar cebadores que abarcaban las uniones de inserto/genómicas 5' y 3' en el maíz 4114. Los productos de la PCR generados a partir de cuatro plantas de maíz 4114 se clonaron y secuenciaron para verificar las uniones del inserto/genómicas 5' y 3' y las regiones del borde genómico.

Además, para demostrar que las regiones de borde genómico 5' y 3' eran procedentes de maíz, se llevó a cabo la PCR en plantas de maíz 4114 y de maíz de control en las regiones genómicas. Cada fragmento de la PCR se secuenció directamente para verificar su identidad de origen de maíz.

Se usó la información de secuencia de ADN-T del plásmido PHP27118 para diseñar cebadores para verificar la secuencia insertada en el maíz 4114 (tablas 7 y 8).

25 **Tabla 7. Cebadores de la PCR usados para caracterizar las regiones de borde genómico y de ADN-T insertadas en el maíz 4114**

Fragmento de la PCR	Par de cebadores	SEQ ID NO: de los cebadores	Tamaño (pb)	Región amplificada
A	09-0-3030/ 09-0-2787	11/12	2511	Región de borde genómico e inserto 5'
B	09-0-3036/ 09-0-3046	13/14	3622	Inserción
C	09-0-2980/ 09-0-3045	16/15	4146	Inserción
D	08-0-2463/ 08-0-2759	17/18	2713	Inserción
E	09-0-2775/ 09-0-3083	19/20	3062	Inserción
F	09-0-2799/ 09-0-3005	21/22	2612	Región de borde genómico e inserto 3'
G	09-0-3230/ 09-0-3229	23/24	257	Región de borde genómico 5'
H	09-0-3231/ 09-0-3084	25/26	283	Región de borde genómico 3'

Tabla 8: Secuencia y ubicación de los cebadores usados para las reacciones PCR.

Fragmento de la PCR	Cebador (SEQ ID NO:)	Secuencia del cebador (5' - 3')	Ubicación de la secuencia diana (pb a pb) ¹
A	09-0-3030 (SID: 11)	GAGCATATCCAGCACCAGCTGGTACCAAG	1-29
	09-0-2787 (SID: 12)	GCAGGCATGCCCGCGGATA	2.511-2.493
B	09-0-3036 (SID: 13)	TGGTCTACCCGATGATGTGATTGGCC	1.994-2.019

(continuación)

Fragmento de la PCR	Cebador (SEQ ID NO:)	Secuencia del cebador (5' - 3')	Ubicación de la secuencia diana (pb a pb) ¹
	09-0-3046 (SID: 14)	CGAAGACAGGATCTGACAAGGTCCGATAG	5.615-5.587
C	09-0-3045 (SID: 15)	GACTTCATGAACTCTTTGTTTGTGACTGCAGAGAC	5.414-5.414
	09-0-2980 (SID: 16)	CTCATGACTCAGGACTTGTGGC	9.559-9.538
D	08-0-2463 (SID: 17)	ATCAGCCTCTACTTCGAC	9.390-9.407
	08-0-2759 (SID: 18)	CTCCATGATCTTCGTCTCATGTG	12.102-12.080
E	09-0-2775 (SID: 19)	CACCAACTCCATCCAGAAGTGCC	11.481-11.503
	09-0-3083 (SID: 20)	GCCTTGCAATTGGCGCAGTGAGAACCG	14.542-14.517
F	09-0-2799 (SID: 21)	CGGCGCGCCTCTAGTTGAAGACACGTT	14.141-14.167
	09-0-3005 (SID: 22)	CACTGGACTGAGCCGCACAGCTAAGGACAC	16.752-16.723
G	09-0-3230 (SID: 23)	GGAACATTCAGACTTGGGAGTCTGGACT	2.086-2.113
	09-0-3229 (SID: 24)	GAACAGGGTCTCGAATCAAGGGCAGC	2.342-2.316
H	09-0-3231 (SID: 25)	CGGTTCTCACTGCGCCAATGCAAGGC	14.517-14.542
	09-0-3084 (SID: 26)	CATGACGACCATGAAGCAACATC	14.799-14.777
¹ Ubicación en la secuencia de maíz 4114. Bases 1 - 2.422 = región de borde genómico 5' Bases 2.423 - 14.347 = inserto Bases 14.348 - 16.752 = región de borde genómico 3'.			

5 Para caracterizar el ADN-T insertado en maíz 4114, se diseñaron cebadores para la PCR para amplificar el inserto de ADN-T en seis productos de la PCR separados solapantes, como se indica en la tabla 7: fragmentos A a F (Posiciones indicadas en la figura 5). Como cabía esperar, se generaron los productos de la PCR predichos solo a partir de muestras de ADN genómico de maíz 4114 y no estaban presentes en las muestras de maíz de control. Se clonaron y secuenciaron los seis productos de la PCR. Cuando se comparó la secuencia del ADN-T insertado en maíz 4114 con la región de ADN-T del plásmido PHP27118 usado para crear el maíz 4114, se determinó que había una eliminación de 29 pb en el extremo RB y una eliminación de 24 pb en el extremo LB. Las eliminaciones en los extremos RB y LB normalmente suceden en la transformación mediada por *Agrobacterium* (Kim *et al.* (2007) Plant J. 51:779-791). Toda la demás secuencia se encuentra intacta y es idéntica a la del plásmido PHP27118. La secuencia de la inserción se presenta en la SEQ ID NO: 27.

15 Para verificar la secuencia adicional del borde genómico 5', se llevó a cabo la PCR con un cebador directo (SEQ ID NO: 11) en la región del borde genómico 5' y un cebador inverso (SEQ ID NO: 12) en el ADN-T insertado. El fragmento de la PCR resultante A de 2.511 pb de las muestras de ADN genómico de maíz 4114 se clonó y se secuenció (figura 3). Los 2.422 pb de la secuencia de la región del borde genómico 5' se expone en los nucleótidos 1-2.422 de la SEQ ID NO: 27.

20 Para verificar la secuencia adicional del borde genómico 3', se llevó a cabo la PCR con un cebador directo (SEQ ID NO: 21) en el ADN-T insertado y un cebador inverso (SEQ ID NO: 22) en la región del borde genómico 3'. El fragmento

de la PCR resultante F de 2.612 pb de las muestras de ADN genómico de maíz 4114 se clonó y se secuenció (figura 3). Los 2.405 pb de la secuencia de la región del borde genómico 3' se expone en los nucleótidos 14.348 a 16.752 de la SEQ ID NO: 27.

5 En total, se confirmaron 16.752 pb de secuencia del ADN genómico de maíz 4114: 2.422 pb de la secuencia del borde genómico 5', 2.405 pb de la secuencia de borde genómico 3' y 11.925 pb que comprenden el ADN-T insertado.

10 Para demostrar que las secuencias del borde genómico flanqueantes 5' y 3' son procedentes de maíz, se llevó a cabo la PCR en las regiones de borde genómico 5' y 3' (el par de cebadores expuesto en las SEQ ID NO: 23 y 24 y el par de cebadores expuesto en las SEQ ID NO: 25 y 26, respectivamente) en las muestras de ADN genómico de maíz 4114 y las muestras de maíz de control. Se generaron el fragmento G de la PCR (257 pb para la región genómica 5') y el fragmento G de la PCR (283 pb para la región genómica 3') esperados a partir tanto de maíz 4114 como de maíz de control. Estos productos de la PCR se clonaron y secuenciaron y los productos correspondientes del maíz 4114 y del maíz de control son idénticos, confirmando de este modo que las secuencias son genómicamente procedentes de maíz.

Ejemplo 5. Eficacia en insectos del evento de maíz DP-004114-3

20 Se generaron datos de eficacia acerca del maíz 4114. Las pruebas de campo compararon maíz 4114 en dos fondos genéticos con un control negativo (isolínea) en los mismos fondos genéticos. Las pruebas de eficacia incluyeron: daño foliar por primera generación de ECB (ECB1) y daño en el tallo por ECB de segunda generación (ECB2) en cuatro ubicaciones, daño en la raíz por WCRW en tres ubicaciones y daño foliar por FAW en una ubicación. En cada ubicación, se plantaron parcelas de una sola hilera en un bloque completo aleatorizado con tres replicados (20 granos/parcela x 12 entradas x 3 replicados = 1 experimento/ubicación). Se tomaron muestras de tejido de todas las plantas después de la emergencia para confirmar la presencia del evento mediante PCR específica para el evento. Se cortó cualquier negativo y cada parcela se redujo hasta un objetivo de 10-15 plantas espaciadas uniformemente por parcela.

30 Para los ensayos que caracterizan el daño por ECB1, cada planta se infestó manualmente con aproximadamente 100 larvas neonatas de ECB 3 veces (300 larvas en total) a lo largo de aproximadamente una semana comenzando en aproximadamente la etapa de crecimiento V5. Aproximadamente tres semanas después de la última infestación con éxito, se efectuaron valoraciones del daño foliar (basándose en una escala de valoración visual 9 -1, donde 9 indica ausencia de daño y 1 indica daño máximo) en 8 plantas consecutivas por parcela (total de 24 plantas por fondo genético, por entrada) y se calcularon las medias para cada tratamiento. Los resultados de la alimentación foliar de ECB de primera generación en maíz 4114 se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Eficacia del maíz DP-004114-3 contra larvas de ECB de primera generación

Ubicación	Línea de maíz	Valoración media del daño por ECB1LF ± Error estándar ^{ab}
York, NE	4114	9,0 ± 0,05 A
	1507x59122	9,0 ± 0,08 A
	Control negativo	4,4 ± 0,09 B
Johnston, IA	4114	9,0 ± 0,00 A
	1507x59122	9,0 ± 0,00 A
	Control negativo	4,5 ± 0,08 B
Mankato, MN	4114	9,0 ± 0,02 A
	1507x59122	9,0 ± 0,03 A
	Control negativo	4,7 ± 0,11 B
Princeton, Illinois	4114	9,0 ± 0,00 A
	1507x59122	9,0 ± 0,00 A
	Control negativo	5,5 ± 0,17 B

^aLas valoraciones del daño en plantas individuales se determinaron usando la siguiente escala visual.
 9. Ausencia de daño foliar visible o una pequeña cantidad de lesión de tipo punción o fino agujero en unas pocas hojas.
 8. Pequeña cantidad de lesiones de tipo agujero en unas pocas hojas.
 7. Lesión de tipo agujero común en varias hojas.
 6. Varias hojas con lesiones de tipo agujero y alargadas (Lesiones <1,27 cm (0,5") de longitud).
 5. Varias hojas con lesiones alargadas (lesiones de 1,27 cm (0,5") a 2,54 cm (1,0") de longitud).
 4. Varias hojas con lesiones alargadas (lesiones > 2,54 cm (1,0") de longitud).
 3. Lesiones largas (> 2,54 cm (1,0")) comunes en aproximadamente la mitad de las hojas.
 2. Lesiones largas (> 2,54 cm (1,0")) comunes en aproximadamente dos tercios de las hojas.
 1. La mayoría de las hojas con lesiones largas.

^bEn una ubicación, las medias con la misma letra no son significativamente diferentes (prueba de LSD protegida de Fisher, P > 0,05).

Para los ensayos que caracterizan el daño por ECB2, se infestaron de nuevo manualmente las mismas plantas infestadas anteriormente con ECB1 posteriormente en la temporada de crecimiento con aproximadamente 100 larvas neonatas de ECB (300 larvas en total) por planta 3 veces a lo largo de aproximadamente una semana comenzando en la etapa de crecimiento R1, cuando aproximadamente un 50 % de las plantas estaban dispersando polen. Aproximadamente a los 50-60 días después de la última infestación, se dividieron los tallos de 8 plantas consecutivas por parcela (total de 24 plantas por fondo genético por entrada) desde la parte superior del 4.º entrenudo por encima de la mazorca primaria hasta la base de la planta. Después se midió en centímetros la longitud total de los túneles en el tallo por ECB (ECBXCM) y se registraron para cada planta. Los túneles de 1 cm o menos se consideraron agujeros de entrada (la larva no era capaz de establecerse en el tallo) y no se incluyeron en los cm totales de túneles. Se calcularon las medias (cm totales de túneles) para cada tratamiento. Los resultados de alimentación del tallo por ECB2 para el maíz 4114 se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Eficacia del maíz DP-004114-3 contra larvas de ECB de segunda generación

Ubicación	Línea de maíz	ECBXCM media (longitud del túnel, cm) ± Error estándar*
York, NE	4114	0,9 ± 0,27 B
	1507x59122	0,4 ± 0,12 B
	Control negativo	22,6 ± 1,83 A
Mankato, MN	4114	1,3 ± 0,30 B
	1507x59122	0,7 ± 0,18 B
	Control negativo	31,3 ± 2,19 A
Johnston, IA	4114	1,1 ± 0,26 B
	1507x59122	0,3 ± 0,11 B
	Control negativo	33,0 ± 2,51 A
Princeton, Illinois	4114	0,8 ± 0,22 B
	1507x59122	0,1 ± 0,07 B
	Control negativo	10,0 ± 0,94 A

^bEn una ubicación, las medias con la misma letra no son significativamente diferentes (prueba de LSD protegida de Fisher, $P > 0,05$).

También se investigó el daño radicular causado por WCRW. Se infestaron manualmente plantas aproximadamente en la fase de crecimiento V2 con aproximadamente 500 huevos de WCRW aplicados al suelo a cada lado de la planta (~1.000 huevos/planta en total). Además, se plantaron las parcelas en campos que tenían altas probabilidades de contener una infestación natural de WCRW. Las raíces de las plantas se evaluaron aproximadamente en la etapa de crecimiento R2. Se retiraron cinco plantas consecutivas por parcela (45 plantas por fondo genético en total, por entrada) de la parcela y se lavaron con agua a presión. El daño en la raíz se valoró usando la escala de lesión nodular de 0-3 (CRWNIS) (Oleson, *et al.* (2005) J. Econ. Entomol. 98 (1): 1-8) y se calcularon las medias para cada tratamiento. Las valoraciones medias del daño radicular a causa de la alimentación del WCRW se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Eficacia del maíz DP-004114-3 contra larvas de WCR

Ubicación	Línea de maíz	Puntuación CRWNIS media ± Error estándar ^{b,c}
Johnston, IA	4114	0,1 ± 0,01 B
	1507x59122	0,1 ± 0,02 B
	Control negativo	0,5 ± 0,09 A
Mankato, MN	4114	0,1 ± 0,02 B
	1507x59122	0,1 ± 0,01 B
	Control negativo	1,1 ± 0,11 A
Rochelle, Illinois	4114	0,3 ± 0,04 B
	1507x59122	0,1 ± 0,01 B
	Control negativo	1,3 ± 0,18 A

^bLas valoraciones del daño en las masas radiculares de plantas individuales se determinaron usando la escala de lesión nodular de 0-3 (Oleson *et al.* 2005, anteriormente citado).
^cEn una ubicación, las medias con la misma letra no son significativamente diferentes (prueba de LSD protegida de Fisher, $P > 0,05$).

Para la prueba de eficacia del FAW, se infestaron manualmente plantas individuales con aproximadamente 75 neonatos aproximadamente en la etapa de crecimiento V5. Se valoró el daño en las hojas en 8 plantas consecutivas

por parcela (un total de 24 plantas por fondo genético, por entrada) (FAWL basada en una escala de valoración visual 9-1, donde 9 indica ausencia de daño y 1 indica daño máximo) aproximadamente dos semanas después de la última inoculación con éxito) y se calcularon las medias para cada tratamiento. Las valoraciones medias del daño que caracterizan la alimentación foliar del FAW en DP-004114-3 se muestran en la tabla 12.

5

Tabla 12. Eficacia del maíz DP-004114-3 contra larvas de FAW

Ubicación	Línea de maíz	Valoración media del daño por FAWLF ± Error estándar ^{a,b}
Johnston, IA	4114	8,9 ± 0,06 BC
	1507x59122	9,0 ± 0,00 A
	Control negativo	2,1 ± 0,08 D

^aLas valoraciones del daño en plantas individuales se determinaron usando la siguiente escala visual:

9. Ausencia de daño de lesiones de agujero en hojas de la espira.
8. Agujeros y pequeñas lesiones circulares presentes en hojas de la espira.
7. Pequeñas lesiones circulares y unas pocas lesiones alargadas pequeñas (de forma rectangular) de hasta 1,27 cm (0,5") de longitud presentes en las hojas de la espira y enrolladas.
6. Varias lesiones alargadas pequeñas de 1,27 cm (0,5") a 2,54 cm (1") de longitud en unas cuantas hojas de la espira y enrolladas.
5. Varias lesiones grandes alargadas de más de 2,54 cm (1") de longitud presentes en unas cuantas hojas de la espira y enrolladas y/o unos cuantos agujeros de forma irregular con un tamaño de pequeño a mediano uniforme (membrana basal consumida) en las hojas de la espira y enrolladas.
4. Varias lesiones grandes alargadas presentes en varias hojas de la espira y enrolladas y/o varios agujeros grandes con una forma de uniforme a irregular en las hojas de la espira y enrolladas.
3. Muchas lesiones alargadas de todos los tamaños presentes en varias hojas de la espira más varios agujeros con forma irregular en las hojas de la espira y enrolladas.
2. Muchas lesiones alargadas de todos los tamaños presentes en la mayoría de hojas de la espira y enrolladas más muchos agujeros de gran tamaño con forma de uniforme a irregular en las hojas de la espira y enrolladas.
1. Hojas de la espira y enrolladas prácticamente destruidas por completo.

^bEn una ubicación, las medias con la misma letra no son significativamente diferentes (prueba de LSD protegida de Fisher, P > 0,05).

Además de los estudios de eficacia en campo, el maíz 4114 se evaluó en el ensayo de laboratorio de plántula subletal (SSA) (Publicación de los Estados Unidos n.º 2006/0104904). El SSA permitió comparar la eficacia del maíz 4114 con un control no protegido (isolínea próxima) sin los efectos de confusión del ambiente de campo. La técnica de SSA implica exponer a una población de WCRW neonato a plántulas de maíz que contienen uno de los eventos de maíz 4114 o plántulas de maíz no transgénicas (control negativo). Las larvas fueron expuestas durante un periodo de 17 días desde la fecha de eclosión inicial del huevo. La unidad experimental para el SSA fue un solo recipiente de plástico con unas dimensiones de 23 x 30 x 10 cm (Pactiv Corp., Lake Forest, IL). Las entradas se dispusieron en un bloque completo aleatorizado con 3 replicados por entrada. Para cada entrada, La configuración del SSA implicó colocar 115 granos en cada recipiente con 225 ml de una solución fungicida de tiofanato-metilo al 1 % y 1000 ml de medio de crecimiento de plantas Metro-Mix 200 (Scotts-Sierra Horticultural Products Company, Marysville, OH). Inmediatamente después de añadir la Metro-Mix, Se infestó con los huevos de WCRW sobre la superficie de cada recipiente a una tasa de 1.000 huevos por recipiente. Los huevos de WCRW se preincubaron a 25 °C, de tal forma que se temporizó para que la eclosión inicial del huevo se produjese 5-7 días del establecimiento del recipiente. Los recipientes infestados se mantuvieron en una cámara ambiental ajustada a 25 °C, humedad relativa del 65 % y un ciclo de luz:oscuridad de 14:10. Las larvas se extrajeron de los recipientes 17 días después de la eclosión de los huevos usando un sistema de embudo Bursese. Se seleccionó una muestra secundaria aleatoria de 30 larvas por recipiente y se midieron sus cápsulas de cabeza en un microscopio de disección para categorizar cada una en 1 de 3 etapas. Los datos recogidos incluyen la edad estructural de la población larval determinada a partir del número de larvas en cada una de las tres potenciales etapas. Se representaron los histogramas que presentaban gráficamente la distribución de edad de las larvas para cada entrada y se compararon visualmente, como se muestra en la figura 4.

El espectro de plagas para el maíz 4114 se proporciona en la tabla 13.

30

Tabla 13. Plagas de insectos que se controlan o suprimen por maíz DP-004114-3 que expresa Cry1F, Cry34Ab1 y Cry35Ab1

Nombre científico	Nombre común	Orden del insecto
<i>Ostrinia nubilalis</i>	Barrenador del maíz europeo (ECB)	Lepidópteros
<i>Helicoverpa zea</i>	Gusano elotero (CEW)	Lepidópteros
<i>Spodoptera frugiperda</i>	Gusano cogollero (FAW)	Lepidópteros
<i>Diatraea grandiosella</i>	Barrenador del maíz del suroeste (SWCB)	Lepidópteros

(continuación)

Nombre científico	Nombre común	Orden del insecto
<i>Richia albicosta</i>	Gusano cortador de la alubia occidental (WBCW)	Lepidópteros
<i>Agrotis ipsilon</i>	Gusano cortador negro (BCW)	Lepidópteros
<i>Elasmopalpus lignosellus</i>	Barrenador menor del tallo de maíz (LCSB)	Lepidópteros
<i>Diatrea crambidoides</i>	Barrenador del tallo de maíz del sur (SCSB)	Lepidópteros
<i>Diabrotica virgifera</i>	Gusano de la raíz del maíz occidental (WCRW)	Coleópteros
<i>Diabrotica virgifera zea</i>	Gusano de la raíz del maíz mexicano (MCR)	Coleópteros
<i>Diabrotica berberi</i>	Gusano de la raíz del maíz del norte (NCR)	Coleópteros
<i>Diatrea saccharalis</i>	Barrenador de la caña de azúcar (SCB)	Coleópteros

Ejemplo 6. Expresión y concentración de proteínas

Generación de material vegetal

5 Se cultivó maíz 4114 de la generación PHNAR x BC3F3 en cinco ubicaciones en los Estados Unidos y Canadá. Cada sitio empleó un diseño de bloque completo aleatorizado que contenía cuatro bloques, con cada bloque separado por una distancia amortiguadora de al menos 36 pulgadas (0,9 m). Cada entrada se plantó en parcelas de 2 filas bordeadas a cada lado por 1 fila de simiente de borde.

Recogida y procesado de tejido foliar

10 Se recogió una muestra de tejido foliar en cada bloque en la etapa V9. Todas las muestras se recogieron de plantas sanas seleccionadas imparcialmente representativas de cada evento. Cada muestra foliar se obtuvo seleccionando la hoja más joven que había emergido al menos 8 pulgadas (20 cm, tejido visible) desde la espira. En caso de que esta hoja estuviese dañada o no estuviese sana, se tomó una muestra de la siguiente hoja por debajo. Se podó (cortó) la hoja de la planta a aproximadamente 8 pulgadas (20 cm) desde la punta de la hoja. La muestra foliar (incluyendo el nervio central) se cortó en trozos de ≤ 1 pulgada (2,5 cm) y se colocaron en un vial para muestras de 50 ml. Después, se colocaron las muestras sobre nieve carbónica hasta que se transfirieron a un congelador (≤ -10 °C). Las muestras se enviaron congeladas y se almacenaron a ≤ -10 °C tras su llegada. Todas las muestras de tejido se liofilizaron, al vacío, hasta sequedad. Las muestras foliares liofilizadas se homogeneizaron finamente para prepararlas para el análisis. Las muestras se almacenaron congeladas entre las etapas de procesado.

Determinaciones de la concentración de proteínas

25 Las concentraciones de las proteínas Cry1F, Cry34Ab1, Cry35Ab1 y PAT se determinaron usando métodos de ELISA cuantitativo específicos.

Extracción de proteínas

30 Se pesaron alícuotas de muestras de tejido foliar procesado en tubos de 1,2 ml con un peso diana de 10 mg. Cada muestra analizada respecto de las concentraciones de proteína Cry1F, Cry34Ab1, Cry35Ab1 y PAT se extrajo en 0,6 ml de PBST enfriado (suero salino tamponado con fosfato más Tween-20). Después de la centrifugación, se retiraron los sobrenadantes, se diluyeron y se analizaron.

Determinación de la concentración de proteína de Cry1F, Cry34Ab1 y PAT

40 Los kits de ELISA para Cry1F, Cry34Ab1 y PAT empleados se obtuvieron de EnviroLogix, Inc. (Portland, ME) y el kit de ELISA para Cry35Ab1 empleado se obtuvo de Acadia BioScience, LLC (Portland, ME). El método ELISA para cada una de estas cuatro proteínas utilizó un formato en "sándwich" secuencial para determinar la concentración de la proteína en extractos de muestra. Se incubaron patrones (analizados en pocillos triplicados) y extractos de muestra diluida (analizados en pocillos duplicados) en una placa prerrecubierta con un anticuerpo específico para una sola proteína seleccionada entre Cry1F, Cry34Ab1, Cry35Ab1 o PAT. Después de la incubación, se lavaron de la placa las sustancias no unidas. Un anticuerpo específico diferente para la respectiva proteína seleccionada, conjugado a la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP), se añadió a la placa y se incubó. Posteriormente, se lavaron las sustancias no unidas de la placa dejando la proteína unida "en sándwich" entre el anticuerpo recubierto sobre la placa y el conjugado de anticuerpo-HRP. La detección del complejo de anticuerpo unido-proteína se logró mediante la adición de sustrato, que generó un producto coloreado en presencia de HRP. La reacción se detuvo con una solución

ácida y se determinó la densidad óptica (DO) de cada pocillo usando un lector de placas. Se usó una media de los resultados de pocillos duplicados para determinar la concentración de la proteína Cry1F, Cry34Ab1, Cry35Ab1 o PAT en ng/mg de peso seco de la muestra.

5 **Cálculos para determinar las concentraciones de proteína**

Se usó el programa informático SoftMax® Pro para llevar a cabo los cálculos necesarios para convertir los valores de DO obtenidos del lector de placas en concentraciones de proteína.

10 **1. Curva patrón**

Se incluyó una curva patrón en cada placa de ELISA. La ecuación para la curva patrón se generó mediante el programa informático, que usó un ajuste cuadrático para relacionar los valores medios de DO obtenidos de los patrones con la respectiva concentración patrón (ng/ml). La ecuación de regresión cuadrática se aplicó del siguiente modo:

15

$$y = Cx^2 + Bx + A$$

donde x = concentración patrón conocida e y = valor de absorbancia medio respectivo (DO).

20 **2. Concentración de la muestra**

La interpolación de la concentración de la muestra (ng/ml) se logró resolviendo para x la ecuación anterior usando valores para A, B y C determinados mediante la curva patrón.

25

$$\text{Concentración de la muestra (ng/ml)} = \frac{-B + \sqrt{B^2 - 4C(A - DO \text{ de la muestra})}}{2C}$$

Por ejemplo, Parámetros de la curva: A = 0,0476, B = 0,4556, C = -0,01910 y DO de la muestra = 1,438

30

$$\text{Concentración de la muestra} = \frac{-0,4556 + \sqrt{0,4556^2 - 4(-0,01910)(0,0476 - 1,438)}}{2(-0,01910)} = 3,6 \text{ ng/ml}$$

Los valores de concentración de la muestra se ajustaron para el factor de dilución expresado como 1:N

$$\text{Concentración ajustada} = \text{Concentración de muestra} \times \text{Factor de dilución}$$

35

por ejemplo, Concentración de muestra = 3,6 ng/ml y Factor de dilución = 1:10

$$\text{Concentración ajustada} = 3,6 \text{ ng/ml} \times 10 = 36 \text{ ng/ml}$$

40

Los valores de concentración de la muestra ajustados se convirtieron de ng/ml a ng/mg de peso de la muestra del siguiente modo:

$$\text{ng/mg de peso de la muestra} = \text{ng/ml} \times \text{Volumen de extracción (ml)} / \text{Peso de la muestra (mg)}$$

45

por ejemplo, Concentración = 36 ng/ml, Volumen de extracción = 0,60 ml y Peso de la muestra = 10,0 mg

$$\text{ng/mg de peso de la muestra} = 36 \text{ ng/ml} \times 0,60 \text{ ml} / 10,0 \text{ mg} = 2,2 \text{ ng/mg}$$

50

3. Límite inferior de cuantificación (LIDC)

El LIDC, en ng/mg de peso de la muestra, se calculó del siguiente modo:

$$LIDC = \frac{LIDQ \text{ reportable del ensayo} \times \text{Volumen de extracción}}{\text{Peso diana de la muestra}}$$

55

por ejemplo para PAT en hojas: LIDC del ensayo reportable = 2,3 ng/ml, volumen de extracción = 0,6 ml y peso diana de la muestra = 10 mg

$$LIDC = \frac{2,3 \text{ ng/ml} \times 0,6 \text{ ml}}{10 \text{ mg}} = 0,14 \text{ ng/mg de peso de la muestra}$$

60 **Resultados**

Las proteínas Cry1F, Cry34Ab1, Cry35Ab1 y PAT se detectaron en tejido foliar de V9 de maíz 4114 a las concentraciones expuestas en la tabla 14 a continuación.

Tabla 14: Concentraciones de proteína en maíz 4114

	Concentración de proteína en ng/mg de peso seco*			
	Cry1F	Cry34Ab1	Cry35Ab1	PAT
Media ± DT	9,7 ± 2,5	26 ± 3,1	33 ± 3,1	9,8 ± 3,3
Intervalo	5,3 - 14	22-31	28 - 39	4,8 - 15
* El LIDC para Cry1F y PAT fue de 0,14 ng/mg de peso seco; el LIDC para Cry34Ab1 y -Cry35Ab1 fue de 0,16 ng/mg de peso seco				

5

Ejemplo 7: Un sistema de identificación específico de evento para maíz DP-004114-3

Se diseñó el sistema específico de evento para maíz DP-004114-3 en la unión 5' entre el inserto DP-004114-3 y la región genómica de maíz. El cebador directo (08-O-2677, SEQ ID NO: 29) está situado dentro del ADN genómico de maíz, el cebador inverso (08-O-2678, SEQ ID NO: 30) está situado dentro del ADN insertado y el sitio de unión de la sonda (08-QP74, SEQ ID NO: 31) abarca la transición entre el inserto DP-004114-3 y el ADN genómico de maíz (tabla 15). Las concentraciones óptimas de cebador y sonda se seleccionaron basándose en la eficiencia de la PCR y la capacidad para cuantificar los extremos bajos (0,08 % de GM) y altos (5 % de GM) del intervalo dinámico (tabla 16).

10

15

Tabla 15: Cebadores y sonda para el sistema PCR específico para el evento DP-004114-3

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO.
08-0-2677	5'- CGT TTG TAG CAC TTG CAC GTA GT -3'	29
08-0-2678	5'- GGT AAC CGC TOT TOO AGT TGA A -3'	30
08-QP74 (sonda)	5'- AAG CTT CAA CAC AGA TO -3'	31

Secuencia del amplicón de DP-004114-3 (los sitios de unión del cebador y la sonda están subrayados): Longitud: 90 pb

CGTTTGTAGCACCTTGACCGTAGTTACCCGGACCGAAGCTTCAACACAGATCTGATA
GTTTAAACGCTCTTCAACTGGAAGAGCGGTTACC (SEQ ID NO: 32)

Tabla 16: Mezcla maestra para el sistema PCR específico para el evento DP-004114-3

Productos químicos	Concentración	Concentración final†	µl/reacción
Applied Biosystems TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG	2x	1x	10,0
08-0-2677	10 µM	500 nM	1,0
08-0-2678	10 µM	900 nM	1,8
08-QP74	10 µM	200 nM	0,4
Agua estéril			1,8
Volumen total			15,0

† La reacción PCR total es de 20 µl (15 µl de mezcla maestra y 5 µl de molde de ADN genómico).

Tabla 17: Parámetros de reacción y ciclado

Formato:	15 µl de mezcla maestra + 5 µl de molde de ADN genómico = 20 µl por reacción
Equipo:	Termociclador en tiempo real Applied Biosystems ViiA7
Programa informático:	Programa informático ViiA 7 RUO versión 1.1
Material plástico:	Placas de reacción ópticas de 96 pocillos MicroAmp® (Applied Biosystems, Inc.); Placas de reacción óptica transparentes de 384 pocillos PRISM™ (Applied Biosystems, Inc.); y película adhesiva óptica MicroAmp™ (Applied Biosystems, Inc.)

5

Tabla 18: Parámetros de ciclado

Etapa	Estadio	Temp.	Tiempo	Recogida de datos	Ciclos
1	Activación enzimática inicial	95 °C	600 s	no	1x
2	Amplificación Desnaturalización	95 °C	15 s	no	40x
3	Hibridación y extensión	60 °C	60 s	Sí	

10

15

El formato del ensayo usó una curva patrón que tenía cuatro puntos de referencia, cada una por triplicado. Los patrones se produjeron preparando una solución de 40 ng/µl de ADN genómico total de maíz con 10 % de ADN de maíz DP-004114-3 seguido de diluciones seriadas en tampón TE 0,1x que contenía 10 ng/µl de ADN de esperma de salmón. Los controles negativos (NTC) se midieron por triplicado para cada sistema para verificar la pureza de los reactivos. Cada muestra (desconocida) se analizó a razón de 200 ng de ADN genómico de maíz por reacción en triplicados (seis reacciones por muestra en total para ambos sistemas PCR). Posteriormente se calculó el contenido relativo de ADN de maíz DP-004114-3 a ADN de maíz total determinando la media de los números de copias basándose en las curvas patrón (regresión lineal del valor de ciclo umbral (C_T) frente al log [número de copias]) y calculando las proporciones del número de copias de maíz DP-004114-3/número de copias totales de genomas de maíz haploides.

20

25

Este sistema de PCR cuantitativa específica de evento para la detección del ADN de maíz DP-004114-3 se desarrolló, optimizó y validó en un sistema para PCR en tiempo real ViiA 7™ de Applied Biosystems. El método también puede aplicarse en una plataforma diferente pero, con una optimización y adaptación mínimas.

El método de PCR en tiempo real específico para el evento descrito en el presente documento puede aplicarse para determinar el contenido relativo de ADN de maíz DP-004114-3 en el ADN genómico de maíz total. El método funciona de manera lineal con un nivel aceptable de exactitud y precisión a lo largo del intervalo completo, de un 0,08 % a un 5,0 % de contenido de DP-004114-3. El método se desarrolló y validó con ADN genómico extraído de semillas de maíz. Sin embargo, puede aplicarse el ensayo a cualquier matriz de la que pueda purificarse ADN genómico con suficiente cantidad y calidad.

Ejemplo 8: Método de detección PCR basado en gel para el evento de maíz DP-004114-3

30

Este protocolo describe un ensayo de PCR basado en gel cualitativo para detectar la presencia de ADN de maíz DP-004114-3. El método de detección PCR se usa junto con un método de extracción de ADN que proporciona ADN de suficiente calidad y cantidad.

35

Se desarrolló un sistema PCR para maíz DP-004114-3 usando cebadores para amplificar la unión del borde 5' entre el ADN genómico de maíz y el inserto de DP-004114-3. El cebador directo se ubica en la región genómica de maíz y el cebador inverso se ubica en el inserto del transgén.

ES 2 816 640 T3

Cebador directo (11-0-4127) (SEQ ID NO: 33): 5'- GGA CCC TGT TCA CAA CAC AGG GCT C-3'

Cebador inverso (11-0-4128) (SEQ ID NO: 34): 5'- GGC CGA AGC TTC GGT CCG G-3'

5 Secuencia del amplicón (se subrayan los sitios de unión al cebador) (SEQ ID NO: 35):

ggaccctgttcacaacacagggctctggctttggagcctctcgttttagcacttgcacgtagttaccggaccgaagcttcaacac
agatctgatagtttaaacgctcttcaactggaagagcggttaccggaccgaagcttcggcc

10 Equipos y materiales usados:

Equipo/Material de plástico	Especificación
GeneAmp PCR System 9700 de 96 pocillos	Applied Biosystems, Foster City, Ca; o equivalente
Unidad de electroforesis en gel	Sub Cell GT, Bio-Rad, Hercules, CA; o equivalente
Fuente de alimentación	Power Pac, Bio-Rad, Hercules, CA; o equivalente
Documentación del gel	Bio-Rad Molecular Imager Gel Doc XR+ Imager System; o equivalente
	Quantity One, 2.0 Software; o equivalente
Pipetas con volumen ajustable	Ranin, Woburn, MA; Investigación: 0,5 - 10 µl; 2 - 20 µl; 20 - 200 µl, 100 - 1000 µl; o equivalente
Puntas de filtro	Adecuadas para los modelos de pipeta usados
Tubos de reacción para PCR y tapas	Applied Biosystems, Foster City, CA; o equivalente
Tubos de reacción de 1,5 ml	Eppendorf, Hamburgo, Alemania; o equivalente

Reactivos, tampones y soluciones:

Reactivo	Especificación
Mezcla maestra para PCR de Promega 2x (contiene MgCl ₂ 15 mM y polimerasa Taq)	Promega, Madison, WI; o equivalente
Marcador de PCR	Promega, Madison, WI; o equivalente
Agarosa UltraPure	Invitrogen, Carlsbad, CA; o equivalente
Bromuro de etidio	EMD, Darmstadt, Alemania; o equivalente
Colorante de carga azul naranja de Promega 6x	Promega, Madison, WI; o equivalente
10 x tampón TBE	Mediatech, Herndon, VA; o equivalente
Agua de grado molecular	Mediatech, Herndon, VA; o equivalente

15 Procedimientos

Los reactivos se mezclaron exhaustivamente antes de su uso. Se preparó una mezcla de reacción que consistía en todos los componentes de la reacción PCR, excepto para el ADN molde, en cantidad suficiente para llevar a cabo todas las reacciones. Los reactivos y la mezcla maestra se mantuvieron sobre hielo.

20

Preparación de la mezcla maestra para el sistema PCR:

ES 2 816 640 T3

Componente	Concentración	Concentración final	µl/rxn
Tampón PCR de Promega 2x	2 x	1 x	12,50
Cebador directo (11-0-4127)	10 µM	200 nM	0,50
Cebador inverso (11-0-4128)	10 µM	200 nM	0,50
Agua estéril			6,50
Volumen total			20,00

Se mezclaron los compuestos y se dispensaron 20 µl de la mezcla maestra mezclada exhaustivamente en tubos de reacción. Se añadieron 5 µl de 20 ng/µl de ADN genómico molde.

- 5 Controles sin molde: En lugar de ADN genómico, se añadieron 5 µl del diluyente usado para diluir las muestras de ADN de ensayo a su concentración adecuada; por ejemplo, agua, TE 0,1x, etc.

Controles positivos: se añadieron 5 µl de, por ejemplo, ADN de maíz DP-004114-3 al 1 % (20 ng/µl).

- 10 Después de la adición del molde a la mezcla maestra, se taparon los tubos de reacción y se colocaron inmediatamente en la máquina PCR precalentada y se inició el ciclo.

Parámetros de ciclado

- 15 El ensayo PCR se llevó a cabo usando un GeneAmp PCR System 9700 de 96 pocillos de Applied Biosystems con la velocidad de rampa ajustada a 'GeneAmp 9600'. Los parámetros de ciclado fueron los siguientes:

Perfil de PCR para el método de detección de DP-004114-3

Etapa	Elemento del ciclo	T (°C)	Tiempo (min:s)	Ciclos	
1	Desnaturalización inicial	95	2:00	1x	
2	Amplificación	Desnaturalización	95	00:30	35x
3		Hibridación	66	00:30	
4		Extensión	72	00:30	
5	Extensión final	72	7:00	1x	

20

Electroforesis en gel

Los productos de la PCR se mezclaron con cantidad suficiente de tampón de carga 6x añadido para una concentración final de tampón de carga 1x (ejemplo: 25 µl de producto de la PCR más 5 µl de tampón de carga 6x). Se cargaron 25 15 µl de productos de la PCR/mezcla de colorante de carga en un gel de agarosa al 2,5 %/TBE 1x. El gel se corrió con un máximo de 7 V por cm (medidos de electrodo a electrodo) hasta que los fragmentos se separaron adecuadamente. El gel se corrió durante un tiempo suficiente para obtener una separación clara de las bandas de marcador en el intervalo de 50 a 200 pb. El gel de agarosa se tiñó en un baño de bromuro de etidio (1,5 µg por ml en agua destilada o tampón) durante aproximadamente 15 min, se enjuagó con agua destilada o TBE 1x y se tomaron 30 fotografías con luz UV con un sistema de documentación de geles adecuado. El producto de la PCR para el maíz DP-004114-3 tenía 149 pb de longitud.

LISTADO DE SECUENCIAS

35 <110> Pioneer Hi-Bred International, Inc. y E. I. DuPont de Nemours and Company

<120> Evento de maíz DP-004114-3 y métodos para la detección del mismo

40 < 130> 5251PCT

<150> 61/617.990

<151> 30/03/2012

45 <160> 35

<170> FastSEQ para Windows versión 4.0

<210> 1

5 <211> 605

<212> PRT

<213> *Bacillus thuringiensis*

<220>

10 <223> CryIF

<400> 1

```

Met Glu Asn Asn Ile Gln Asn Gln Cys Val Pro Tyr Asn Cys Leu Asn
 1          5          10          15
Asn Pro Glu Val Glu Ile Leu Asn Glu Glu Arg Ser Thr Gly Arg Leu
      20          25          30
Pro Leu Asp Ile Ser Leu Ser Leu Thr Arg Phe Leu Leu Ser Glu Phe
      35          40          45
Val Pro Gly Val Gly Val Ala Phe Gly Leu Phe Asp Leu Ile Trp Gly
 50          55          60
Phe Ile Thr Pro Ser Asp Trp Ser Leu Phe Leu Leu Gln Ile Glu Gln
 65          70          75          80
Leu Ile Glu Gln Arg Ile Glu Thr Leu Glu Arg Asn Arg Ala Ile Thr
      85          90          95
Thr Leu Arg Gly Leu Ala Asp Ser Tyr Glu Ile Tyr Ile Glu Ala Leu
      100          105          110
Arg Glu Trp Glu Ala Asn Pro Asn Asn Ala Gln Leu Arg Glu Asp Val
      115          120          125
Arg Ile Arg Phe Ala Asn Thr Asp Asp Ala Leu Ile Thr Ala Ile Asn
      130          135          140
Asn Phe Thr Leu Thr Ser Phe Glu Ile Pro Leu Leu Ser Val Tyr Val
      145          150          155          160
Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser Leu Leu Arg Asp Ala Val Ser Phe
      165          170          175
Gly Gln Gly Trp Gly Leu Asp Ile Ala Thr Val Asn Asn His Tyr Asn
      180          185          190
Arg Leu Ile Asn Leu Ile His Arg Tyr Thr Lys His Cys Leu Asp Thr
      195          200          205
Tyr Asn Gln Gly Leu Glu Asn Leu Arg Gly Thr Asn Thr Arg Gln Trp
      210          215          220
Ala Arg Phe Asn Gln Phe Arg Arg Asp Leu Thr Leu Thr Val Leu Asp
      225          230          235          240
Ile Val Ala Leu Phe Pro Asn Tyr Asp Val Arg Thr Tyr Pro Ile Gln
      245          250          255
Thr Ser Ser Gln Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Ser Ser Val Ile Glu
      260          265          270
Asp Ser Pro Val Ser Ala Asn Ile Pro Asn Gly Phe Asn Arg Ala Glu
      275          280          285
Phe Gly Val Arg Pro Pro His Leu Met Asp Phe Met Asn Ser Leu Phe

```

15

ES 2 816 640 T3

	290					295						300					
Val	Thr	Ala	Glu	Thr	Val	Arg	Ser	Gln	Thr	Val	Trp	Gly	Gly	His	Leu		
305					310					315					320		
Val	Ser	Ser	Arg	Asn	Thr	Ala	Gly	Asn	Arg	Ile	Asn	Phe	Pro	Ser	Tyr		
				325					330					335			
Gly	Val	Phe	Asn	Pro	Gly	Gly	Ala	Ile	Trp	Ile	Ala	Asp	Glu	Asp	Pro		
			340					345					350				
Arg	Pro	Phe	Tyr	Arg	Thr	Leu	Ser	Asp	Pro	Val	Phe	Val	Arg	Gly	Gly		
		355						360					365				
Phe	Gly	Asn	Pro	His	Tyr	Val	Leu	Gly	Leu	Arg	Gly	Val	Ala	Phe	Gln		
370						375					380						
Gln	Thr	Gly	Thr	Asn	His	Thr	Arg	Thr	Phe	Arg	Asn	Ser	Gly	Thr	Ile		
385				390						395					400		
Asp	Ser	Leu	Asp	Glu	Ile	Pro	Pro	Gln	Asp	Asn	Ser	Gly	Ala	Pro	Trp		
				405					410					415			
Asn	Asp	Tyr	Ser	His	Val	Leu	Asn	His	Val	Thr	Phe	Val	Arg	Trp	Pro		
			420					425					430				
Gly	Glu	Ile	Ser	Gly	Ser	Asp	Ser	Trp	Arg	Ala	Pro	Met	Phe	Ser	Trp		
		435					440					445					
Thr	His	Arg	Ser	Ala	Thr	Pro	Thr	Asn	Thr	Ile	Asp	Pro	Glu	Arg	Ile		
	450					455						460					
Thr	Gln	Ile	Pro	Leu	Val	Lys	Ala	His	Thr	Leu	Gln	Ser	Gly	Thr	Thr		
465					470					475					480		
Val	Val	Arg	Gly	Pro	Gly	Phe	Thr	Gly	Gly	Asp	Ile	Leu	Arg	Arg	Thr		
				485					490					495			
Ser	Gly	Gly	Pro	Phe	Ala	Tyr	Thr	Ile	Val	Asn	Ile	Asn	Gly	Gln	Leu		
			500					505					510				
Pro	Gln	Arg	Tyr	Arg	Ala	Arg	Ile	Arg	Tyr	Ala	Ser	Thr	Thr	Asn	Leu		
		515					520					525					
Arg	Ile	Tyr	Val	Thr	Val	Ala	Gly	Glu	Arg	Ile	Phe	Ala	Gly	Gln	Phe		
	530					535					540						
Asn	Lys	Thr	Met	Asp	Thr	Gly	Asp	Pro	Leu	Thr	Phe	Gln	Ser	Phe	Ser		
545					550					555					560		
Tyr	Ala	Thr	Ile	Asn	Thr	Ala	Phe	Thr	Phe	Pro	Met	Ser	Gln	Ser	Ser		
				565					570					575			
Phe	Thr	Val	Gly	Ala	Asp	Thr	Phe	Ser	Ser	Gly	Asn	Glu	Val	Tyr	Ile		
			580					585					590				
Asp	Arg	Phe	Glu	Leu	Ile	Pro	Val	Thr	Ala	Thr	Leu	Glu					
		595					600					605					

<210> 2
 <211> 123
 5 <212> PRT
 <213> *Bacillus thuringiensis*

<220>
 < 223> Cry34Ab1

10 <400> 2

ES 2 816 640 T3

Met	Ser	Ala	Arg	Glu	Val	His	Ile	Asp	Val	Asn	Asn	Lys	Thr	Gly	His
1				5					10					15	
Thr	Leu	Gln	Leu	Glu	Asp	Lys	Thr	Lys	Leu	Asp	Gly	Gly	Arg	Trp	Arg
			20					25					30		
Thr	Ser	Pro	Thr	Asn	Val	Ala	Asn	Asp	Gln	Ile	Lys	Thr	Phe	Val	Ala
		35					40					45			
Glu	Ser	Asn	Gly	Phe	Met	Thr	Gly	Thr	Glu	Gly	Thr	Ile	Tyr	Tyr	Ser
	50					55					60				
Ile	Asn	Gly	Glu	Ala	Glu	Ile	Ser	Leu	Tyr	Phe	Asp	Asn	Pro	Phe	Ala
65					70					75					80
Gly	Ser	Asn	Lys	Tyr	Asp	Gly	His	Ser	Asn	Lys	Ser	Gln	Tyr	Glu	Ile
			85						90					95	
Ile	Thr	Gln	Gly	Gly	Ser	Gly	Asn	Gln	Ser	His	Val	Thr	Tyr	Thr	Ile
			100					105					110		
Gln	Thr	Thr	Ser	Ser	Arg	Tyr	Gly	His	Lys	Ser					

115

120

<210> 3
 <211> 383
 <212> PRT
 <213> *Bacillus thuringiensis*

5

<220>
 < 223> Cry35Ab1

10

<400> 3

ES 2 816 640 T3

Met Leu Asp Thr Asn Lys Val Tyr Glu Ile Ser Asn His Ala Asn Gly
 1 5 10 15
 Leu Tyr Ala Ala Thr Tyr Leu Ser Leu Asp Asp Ser Gly Val Ser Leu
 20 25 30
 Met Asn Lys Asn Asp Asp Asp Ile Asp Asp Tyr Asn Leu Lys Trp Phe
 35 40 45
 Leu Phe Pro Ile Asp Asp Asp Gln Tyr Ile Ile Thr Ser Tyr Ala Ala
 50 55 60
 Asn Asn Cys Lys Val Trp Asn Val Asn Asn Asp Lys Ile Asn Val Ser
 65 70 75 80
 Thr Tyr Ser Ser Thr Asn Ser Ile Gln Lys Trp Gln Ile Lys Ala Asn
 85 90 95
 Gly Ser Ser Tyr Val Ile Gln Ser Asp Asn Gly Lys Val Leu Thr Ala
 100 105 110
 Gly Thr Gly Gln Ala Leu Gly Leu Ile Arg Leu Thr Asp Glu Ser Ser
 115 120 125
 Asn Asn Pro Asn Gln Gln Trp Asn Leu Thr Ser Val Gln Thr Ile Gln
 130 135 140
 Leu Pro Gln Lys Pro Ile Ile Asp Thr Lys Leu Lys Asp Tyr Pro Lys
 145 150 155 160
 Tyr Ser Pro Thr Gly Asn Ile Asp Asn Gly Thr Ser Pro Gln Leu Met
 165 170 175
 Gly Trp Thr Leu Val Pro Cys Ile Met Val Asn Asp Pro Asn Ile Asp
 180 185 190
 Lys Asn Thr Gln Ile Lys Thr Thr Pro Tyr Tyr Ile Leu Lys Lys Tyr
 195 200 205
 Gln Tyr Trp Gln Arg Ala Val Gly Ser Asn Val Ala Leu Arg Pro His
 210 215 220
 Glu Lys Lys Ser Tyr Thr Tyr Glu Trp Gly Thr Glu Ile Asp Gln Lys
 225 230 235 240
 Thr Thr Ile Ile Asn Thr Leu Gly Phe Gln Ile Asn Ile Asp Ser Gly
 245 250 255
 Met Lys Phe Asp Ile Pro Glu Val Gly Gly Gly Thr Asp Glu Ile Lys
 260 265 270
 Thr Gln Leu Asn Glu Glu Leu Lys Ile Glu Tyr Ser His Glu Thr Lys
 275 280 285
 Ile Met Glu Lys Tyr Gln Glu Gln Ser Glu Ile Asp Asn Pro Thr Asp
 290 295 300
 Gln Ser Met Asn Ser Ile Gly Phe Leu Thr Ile Thr Ser Leu Glu Leu
 305 310 315 320
 Tyr Arg Tyr Asn Gly Ser Glu Ile Arg Ile Met Gln Ile Gln Thr Ser
 325 330 335
 Asp Asn Asp Thr Tyr Asn Val Thr Ser Tyr Pro Asn His Gln Gln Ala
 340 345 350
 Leu Leu Leu Leu Thr Asn His Ser Tyr Glu Glu Val Glu Glu Ile Thr
 355 360 365
 Asn Ile Pro Lys Ser Thr Leu Lys Lys Leu Lys Lys Tyr Tyr Phe
 370 375 380

<210> 4
 <211> 183
 <212> PRT
 <213> *Streptomyces viridochromogenes*

5

<220>
 <223> Proteina fosfinotricina acetil transferasa

10

<400> 4

ES 2 816 640 T3

Met	Ser	Pro	Glu	Arg	Arg	Pro	Val	Glu	Ile	Arg	Pro	Ala	Thr	Ala	Ala
1				5				10					15		
Asp	Met	Ala	Ala	Val	Cys	Asp	Ile	Val	Asn	His	Tyr	Ile	Glu	Thr	Ser
		20						25					30		
Thr	Val	Asn	Phe	Arg	Thr	Glu	Pro	Gln	Thr	Pro	Gln	Glu	Trp	Ile	Asp
		35					40					45			
Asp	Leu	Glu	Arg	Leu	Gln	Asp	Arg	Tyr	Pro	Trp	Leu	Val	Ala	Glu	Val
	50					55					60				
Glu	Gly	Val	Val	Ala	Gly	Ile	Ala	Tyr	Ala	Gly	Pro	Trp	Lys	Ala	Arg
65					70					75					80
Asn	Ala	Tyr	Asp	Trp	Thr	Val	Glu	Ser	Thr	Val	Tyr	Val	Ser	His	Arg
			85						90					95	
His	Gln	Arg	Leu	Gly	Leu	Gly	Ser	Thr	Leu	Tyr	Thr	His	Leu	Leu	Lys
			100					105					110		
Ser	Met	Glu	Ala	Gln	Gly	Phe	Lys	Ser	Val	Val	Ala	Val	Ile	Gly	Leu
		115					120					125			
Pro	Asn	Asp	Pro	Ser	Val	Arg	Leu	His	Glu	Ala	Leu	Gly	Tyr	Thr	Ala
	130					135					140				
Arg	Gly	Thr	Leu	Arg	Ala	Ala	Gly	Tyr	Lys	His	Gly	Gly	Trp	His	Asp
145					150					155					160
Val	Gly	Phe	Trp	Gln	Arg	Asp	Phe	Glu	Leu	Pro	Ala	Pro	Pro	Arg	Pro
				165					170					175	
Val	Arg	Pro	Val	Thr	Gln	Ile									
			180												

<210> 5

<211> 11978

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia completa de la región de ADN-T del plásmido PHP27118

10

<400> 5

```

gtttaccocgc caatatatcc tgtcaaacac tgatagttta aacgctcttc aactggaaga 60
gcggttacc ccgaccgaagc ttcggccggg gccatcgat atccgcgggc atgcctgcag 120
tgcagcgtga cccggtcgtg cccctctcta gagataatga gcattgcatg tctaagttat 180
aaaaaattac cacatatattt ttttgtcaca cttgtttgaa gtgcagttta tctatcttta 240
tacatatatt taaactttac tctacgaata atataatcta tagtactaca ataatacag 300
tgttttagag aatcatataa atgaacagtt agacatggtc taaaggacaa ttgagtattt 360
tgacaacagg actctacagt tttatctttt tagtgtgcat gtgttctcct ttttttttgc 420
aaatagcttc acctatataa tacttcatcc attttattag tacatccatt tagggtttag 480
ggttaatggt ttttatagac taattttttt agtacatcta ttttattcta ttttagcctc 540
taaattaaga aactaaaac tctatttttag tttttttatt taataattta gatataaaat 600
agaataaaat aaagtgacta aaaattaaac aaataccctt taagaaatta aaaaaactaa 660
ggaaacattt ttcttgtttc gagtagataa tgccagcctg ttaaagcggc tgcagcagtc 720
taacggacac caaccagcga accagcagcg tcgctcggg ccaagcgaag cagacggcac 780
ggcatctctg tcgctgcctc tggaccctc tcgagagttc cgctccaccg ttggacttgc 840
tccgctgtcg gcatccagaa attgctggtc ggagcggcag acgtgagccg gcacggcagg 900
cggcctctc ctctctcac ggcaccggca gctacggggg attcctttcc caccgctcct 960
tcgctttccc ttctcggccc gccgtaataa atagacaccc cctccacacc ctctttcccc 1020
aacctcgtgt tttcggagc gcacacacac acaaccagat ctccccaaa tccaccgctc 1080
ggcacctccg cttcaaggta cgccgctcgt cctccccccc cccccctctc taccttctct 1140
agatcggcgt tccgggtccat ggtagggcc cggtagttct acttctgttc atgtttgtgt 1200
tagatccgtg tttgtgtag atccgtgctg ctacggttcg tacacggatg cgacctgtac 1260
gtcagacacg ttctgattgc taacttgcca gtgtttctct ttggggaatc ctgggatggc 1320
tctagccggt ccgcagacgg gatcgatttc atgatttttt ttgtttcgtt gcatagggtt 1380

```

ES 2 816 640 T3

tggtttgccc ttttccttta tttcaatata tgcogtgcac ttgtttgtcg ggtcatcctt 1440
 tcatgctttt ttttgccttg gttgtgatga tgtgggtctgg ttgggcggtc gttctagatc 1500
 ggagtagaat tctgtttcaa actacctggt ggatttatta attttggatc tgtatgtgtg 1560
 tgccatacat attcatagtt acgaattgaa gatgatggat ggaaatatcg atctaggata 1620
 ggtatagatg ttgatgcggg ttttactgtg gcatatacag agatgctttt tggtcgcttg 1680
 gttgtgatga tgtgggtggt ttgggcggtc gttcattcgt tctagatcgg agtagaatac 1740
 tgtttcaaac tacctggtgt atttattaat tttggaactg tatgtgtgtg tcatacatct 1800
 tcatagttac gagttaaaga tggatggaaa tatcgatcta ggataggat acatgttgat 1860
 gtgggtttta ctgatgcata tacatgatgg catatgcagc atctattcat atgctctaac 1920
 cttgagtacc tatctattat aataaacaag tatgttttat aattattttg atcttgatat 1980
 acttggatga tggcatatgc agcagctata tgtggatttt tttagccctg ccttcatacg 2040
 ctatttattt gcttggactt gtttcttttg tgcgatctca ccctgttgtt tggtgttact 2100
 tctgcaggtc gactctagag gatccaacaa tggagaacaa catacagaat cagtgcgtcc 2160
 cctacaactg cctcaacaat cctgaagtag agattctcaa cgaagagagg tcgactggca 2220
 gattgocggt agacatctcc ctgtccctta cacgtttctt gttgtctgag tttgttccag 2280
 gtgtgggagt tgcgtttggc ctcttcgacc tcatctgggg ctctcatcact ccatctgatt 2340
 ggagcctctt tcttctccag attgaacagt tgattgaaca aaggattgag accttggaaa 2400
 ggaatcgggc catcactacc cttcgtggct tagcagacag ctatgagatc tacattgaag 2460
 cactaagaga gtgggaagcc aatcctaaca atgcccact gagagaagat gtgctgatac 2520
 gctttgctaa cacagatgat gctttgatca cagccatcaa caacttcacc cttaccagct 2580
 tcgagatccc tcttctctcg gtctatgttc aagctgctaa cctgcacttg tcaactactg 2640
 gcgacgctgt gtcgtttggg caaggttggg gactggacat agctactgtc aacaatcact 2700
 acaacagact catcaatctg attcatcgat acacgaaaca ttgtttggat acctacaatc 2760
 agggattgga gaacctgaga ggtactaaca ctgcgcaatg ggccaggttc aatcagttca 2820
 ggagagcctt tacacttact gtgtagtaca tagttgctct ctttccgaac tacgatgttc 2880
 gtacctatcc gattcaaacg tcatcccaac ttacaagga gatctacacc agttcagtca 2940
 ttgaagactc tccagtttct gcgaacatac ccaatgggtt caacagggtc gagtttggag 3000
 tcagaccacc ccatctcatg gacttcatga actctttggt tgtgactgca gagactgta 3060
 gatcccaaac tgtgtgggga ggacacttag ttagctcacg caacacgggt ggcaatcgt 3120
 tcaactttcc tagttacggg gtcttcaatc ccgggggccc catctggatt gcagatgaag 3180
 atccacttcc tttctatcgg accttgtcag atctcttctt cgtccgagga ggctttggca 3240
 atctcacta ttactcggg cttaggggag tggcctttca acaaactggt acgaatcaca 3300
 cccgcacatt caggaactcc gggaccattg actctctaga tgagatacca cctcaagaca 3360
 acagcggcgc accttggat gactactccc atgtgctgaa tcatgttacc tttgtgcgct 3420
 ggccagggtg gatctcaggt tccgactcat ggagagcacc aatgttctct tggacgcatc 3480
 gtacgctac ccccaaaaac accattgatc cagagagaat cactcagatt cccttgggtg 3540
 aggcacaccc acctcagtca ggaactacag ttgtaagagg gccggggttc acggaggag 3600
 acattcttcg acgcactagt ggaggacct tgcgctacac cattgtcaac atcaatgggc 3660
 aacttcccca aaggtatcgt gccaggatc gctatgcctc tactaccaat ctaagaatct 3720
 acgttacggt tgcaggtgaa cggatctttg ctggtcagtt caacaagaca atggataccg 3780
 gtgatccact tacattccaa tctttctcct acgccactat caacaccgcg ttcaccttc 3840
 caatgagcca gagcagtttc acagtaggtg ctgatacctt cagttcaggg aacgaagtgt 3900
 acattgacag gtttgagttg attccagtta ctgccacact cgagtaagga tccgtcgacc 3960
 tgcagccaag ctttcgagag ctcgagatcc ccgacatag ccccggttc gttgcgacta 4020
 acatgagttc ttggcaaat ttgattggac ctgatgagat gatccaacc gaggatag 4080
 caaagctcgt tcgtgcagca atggaacggc caaacctgct ttttgtcccc aagaatgagg 4140
 tgctatgcat gaaggaatct acccgttgat gtccaacagt ctcagggtta atgtctatgt 4200
 atcttaaata atgttgcgg tattttgtaa tctcatatag attttactg tgcgacgcaa 4260
 aatattaaa taatattat tattatctac gttttgattg agatatcatc aatattataa 4320
 taaaaatct cattaaacac gatttgatc aaatgacagt caataatctg atttgaatat 4380
 ttattaattg taacgaatta cataaagatc gaatgaaaaa tactgcactg caaatgaaa 4440
 ttaaacacata ctaataaatg cgtcaaatat ctttgccaag atcaagcggg gtgaggcct 4500
 catatccggt ctgattaca agcacggtat ccccgaaagc cgctccacca atgccctcga 4560
 catagatgcc gggctcgagc ctgaggacat tgcctacctt gagcatggtc tcagcggcgg 4620
 cttaagctc aatcccatcc caatctgaat atoctatccc gcgcccagtc cgggtgaa 4680
 acgggtctgt ccatccacct ctggtgggaa ttccgggtccg ggtcaccttt gtccaccaag 4740
 atggaactgc ggccagcttg catgcctgca gtcgagcgtg acccggctgt gccctctct 4800
 agagataatg agcattgcat gtctaagtta taaaaaatta ccacatattt tttttgtcac 4860
 acttgtttga agtgcagttt atctatcttt atacatata ttaaacttta ctctacgaat 4920
 aatataatct atagtactac aataatatca gtgtttttaga gaatcatata aatgaacagt 4980
 tagacatggt ctaaaggaca attgagatt ttgacaacag gactctacag ttttatctt 5040
 ttagtgtgca tgtgtctcc ttttttttg caaatagctt cacctatata atacttcatc 5100
 cattttatta gtacatccat ttagggttta gggttaatgg tttttataga ctaatttttt 5160
 tagtacctct attttattct attttagcct ctaaattaag aaaactaaaa ctctatttta 5220
 gtttttttat ttaataattt agatataaaa tagaataaaa taaagtgact aaaaattaaa 5280

ES 2 816 640 T3

caaataccct ttaagaaatt aaaaaaacta aggaaacatt tttcttgttt cgagtagata 5340
 atgccagcct gttaaagcgc gtcgacgagt ctaacggaca ccaaccagcg aaccagcagc 5400
 gtcgctgcgg gccaaagcga gacgacggca cggcatctct gtcgctgcct ctggaccctt 5460
 ctcgagagtt ccgctccacc gttggacttg ctccgctgtc ggcatccaga aattgcgtgg 5520
 cggagcggca gacgtgagcc ggcacggcag ggcggctcct cctcctctca cggcaccggc 5580
 agctacgggg gattccttcc ccaccgctcc ttogctttcc cttctcogcc cggcctaata 5640
 aatagacacc ccctccacac cctctttccc caacctcgtg ttgttcggag cgcacacaca 5700
 cacaaccaga tctcccccaa atccaccctc cggcacctcc gcttcaaggt acgcccgtcg 5760
 tcctcccccc cccccctct ctaccctctc tagatcggcg ttccggcca tggtagggc 5820
 ccggtagttc tacttctggt catgtttgtg ttagatccgt gtttgtgtta gatccgtgct 5880
 gctagcgttc gtacacggat ggcacctgta cgtcagacac gttctgattg ctaacttgcc 5940
 agtgtttctc ttggggaat cctgggatgg ctctagccgt tccgcagacg gtagcattt 6000
 catgattttt tttgttctgt tgcataagggt ttggtttgcc cttttccttt atttcaatat 6060
 atgccgtgca cttgtttgtc gggcatctct ttcatgcttt tttttgtctt ggttgtgatg 6120
 atgtggtctg gttggcgggt cgttctagat cggagtagaa ttctgtttca aactacctgg 6180
 tggatttatt aattttggat ctgtatgtgt gtgccataca tattcatagt tacgaattga 6240
 agatgatgga tggaaatct gatctaggat aggtatacat gttgatgagg gttttactga 6300
 tgcataatac gagatgcttt ttgttcgctt ggttgtgatg atgtggtgtg gttggcgggt 6360
 cgttcattcg ttctagatcg gactagaata ctgtttcaaa ctacctggtg tatttattaa 6420
 ttttggaact gtatgtgtgt gtcataatc ttcatagtta cgagttaag atggatggaa 6480
 atactgatct aggataggta tacatggtga tgtgggtttt actgatgcat atactgatg 6540
 gcatatgcag catctattca tatgctctaa ccttgagtac ctatctatta taataaaca 6600
 gtatgtttta taattatttt gatcttgata tacttggtat atggcatatg cagcagctat 6660
 atgtggattt ttttagccct gccttcatac gctatttatt tgcttggtac tgtttctttt 6720
 gtcgagctc accctgttgt ttggtgttac ttctgcaggt cgactctaga ggtaccacac 6780
 gacaccatgt ccgcccgcga ggtgcacatc gacgtgaaca acaagaccgg ccacaccctc 6840
 cagctggagg acaagaccaa gctcagcggc ggcaggtggc gcacctccc gaccaactg 6900
 gccaacgacc agatcaagac cttcgtggcc gaatccaacg gcttcatgac cggcaccgag 6960
 ggcaccatct actactcaat taatggcgag gccgagatca gcctctactt cgacaaccgg 7020
 ttccgcccgt ccaacaata cgacggccac tccaacaagt cccagtacga gatcatcacc 7080
 cagggccgct ccggcaacca gtcccacgtg acctacacca tccagaccac ctcccctc 7140
 tacggccaca agtctgagt catgagctat gagtcagtta acctagactt gtccatctt 7200
 tggattggcc aacttaatta atgtatgaaa taaaaggatg cacacatagt gacatgctaa 7260
 tcaactataat gtgggcatca aagttgtgtg ttatgtgtaa ttactagtta tctgaataaa 7320
 agagaaagag atcatccata tttcttatcc taaatgaatg tcacgtgtct ttataattct 7380
 ttgatgaacc agatgcattt cattaacca atoccatata atataaatat taatcatata 7440
 taattaatat caattgggtt agcaaaacaa atctagtcta ggtgtgtttt gcgaatgcgg 7500
 ccgcccagct aattgggat ctgcatgaaa gaaactgtcg cactgtgaa ccgcacctg 7560
 tcactttcat cgaacacgac ctgtgcccaa gatgacggtg ctgcccgtca agtgaggctg 7620
 aattgccttg gacagaagcg gactccctac aattagttag gccaaacggg gcatccatgt 7680
 gtagctccgg gctcgggctg tatcgccatc tgcaatagca tccatggagc tcggtccatg 7740
 tagttggaga tgaaccaatg atcgggctgt tggacgtatg ttctgtgta ctccgatagt 7800
 agagtacgtg ttagctcttt catggtgcaa gtgaaatttg tgttggtttt attaccctta 7860
 cgttagttgc gggacaggag acacatcatg aatttaaagg cgatgatgtc ctctctgta 7920
 atgttattct tttgatgtga tgaatcaaaa tgtcatataa aacatttgtt gctcttagt 7980
 taggcctgat cgtagaacga aatgctcgtg tagcggggct acgagcctat gacgcaataa 8040
 cactggtttg ccggcccgga gtcgcttgac aaaaaaagc atgttaagtt tatttacaat 8100
 tcaaaaccta acatattata ttccctcaaa gcaggttcac gatcacacct gtacctaaa 8160
 aaaacatgaa gaatatatta ctccattatt atgagatgaa ccacttgga agagtggtaa 8220
 gctatataaa aaaatgaaca ttattacgag atgttatatg ccattatatt gattcgaaga 8280
 tatatgtttc tttctcccac gggcacctaa cggatcatatg ataaggccaa ggcagatcac 8340
 gggaaattat tcgaatacat gttacgcctt attgcccgaa aaaaaatgca ggcaggtgt 8400
 tggccgtagc gatttaagca cttaaactgg aggttgccac acttgatgc aagcgtctga 8460
 cccttctaaa aaatcggcgg ctttgcctgt atccgtatcc cctatccaac atctagctgg 8520
 ccacacgacg gggctgggca gatcgtggat gccgggtcga cgtcगतcgt cttagctag 8580
 agaccaatct accatctgtt atggatgctt gctagctaga ctagtacgac ataaaatttg 8640
 gatactttct cccaactggg agacggggac tgatgtgcag ctgcacgtga gctaaattt 8700
 tcctataaaa tatgcatgaa atactgcatt atcttgccac agccactgcc acagcaagt 8760
 aacaagtgca gctggtagca cgcaacgcat agctctggac ttgtagctag gtagccaacc 8820
 ggatccacac gacaccatgc tcgacaccaa caaggtgtac gagatcagca accacgcca 8880
 cggcctctac gccgccacct acctctccct cgacgactcc ggcgtgtccc tcatgaaca 8940
 gaacgacgac gacatcgac actacaacct caagtggttc ctcttcccga tcgacgacga 9000
 ccagtacatc atcacctcct acgcccaca caactgcaag gtgtggaacg tgaacaacga 9060
 caagattaat gtgtcaacct atcctccac caactccatc cagaagtggc agatcaaggc 9120
 caacggctcc tcctacgtga tccagtcgaa caacggcaag gtgctcaccg ccggcaccgg 9180

ES 2 816 640 T3

ccaggccctc ggccctcatcc gcctcaccga cgagtcctcc aacaaccgga accagcaatg 9240
 gaacctgacg tccgtgcaga ccatccagct cccgcagaag ccgatcatcg acaccaagct 9300
 caaggactac ccgaagtact ccccgaccgg caacatcgac aacggcacct ccccgcagct 9360
 catgggctgg accctcgtgc cgtgcatcat ggtgaacgac ccgaacatcg acaagaacac 9420
 ccagatcaag accacccccgt actacatcct caagaagtac cagtactggc agagggccgt 9480
 gggctccaac gtcgcgctcc gcccgcacga gaagaagtcc tacacctacg agtggggcac 9540
 cgagatcgac cagaagacca ccatcatcaa caccctcggc ttccagatca acatcgacag 9600
 cggcatgaag ttcgacatcc cggaggtggg cggcgggtacc gacgagatca agaccagct 9660
 caacgaggag ctcaagatcg agtattcaca tgagacgaag atcatggaga agtaccagga 9720
 gcagtccgag atcgacaacc cgaccgacca gtccatgaac tccatcggct tcctcaccat 9780
 cacctccctg gagctctacc gctacaacgg ctccgagatc cgcacatgc agatccagac 9840
 ctccgacaac gacacctaca acgtgacctc ctaccggaac caccagcagg ccctgctgct 9900
 gctgaccaac cactcctacg aggaggtgga ggagatcacc aacatcccga agtccaccct 9960
 caagaagctc aagaagtact acttctgagt catgagtcac gagtcatgta acctagactt 10020
 gtccatcttc tggattggcc aacttaatta atgtatgaaa taaaaggatg cacacatagt 10080
 gacatgctaa tcactataat gtgggcatca aagttgtgtg ttatgtgtaa ttactagtta 10140
 tctgaataaa agagaaagag atcatccata tttcttatcc taaatgaatg tcacgtgtct 10200
 ttataattct ttgatgaacc agatgcattt cattaaccaa atccatatac atataaatat 10260
 taatcatata taattaatat caattgggtt agcaaaacaa atctagtcta ggtgtgtttt 10320
 gcgaattatc gatgggcccc ggccgaagct ggccgcggac cgaattccca tggagtcaaa 10380
 gattcaaata gaggacctaa cagaactcgc cgtaaagact ggccaacagt tcatacagat 10440
 tctcttacga ctcaatgaca agaagaaaat cttcgtcaac atgggtggagc acgacacgct 10500
 tgtctactcc aaaaatatca aagatacagt ctcagaagac caaagggcaa ttgagacttt 10560
 tcaacaaagg gtaatatccg gaaacctcct cggattccat tgcccagcta tctgtcactt 10620
 tattgtgaag atagtggaaa aggaaggtgg ctctacaaa tgccatcatt gcgataaagg 10680
 aaaggccatc gttgaagatg cctctgccga cagtgggtccc aaagatggac ccccaccac 10740
 gaggagcatc gtggaaaaag aagacgttcc aaccacgtct tcaaagcaag tggattgatg 10800
 tgatatctcc actgacgtaa gggatgacgc acaatcccac tatccttcgc aagacccttc 10860
 ctctatataa ggaagttcat ttcatttggg gaggacaggg taccgggga tccaccatgt 10920
 ctccggagag gagaccagtt gagattaggc cagctacagc agctgatatg gccgcggttt 10980
 gtgatatcgt taaccattac attgagacgt ctacagtga ctttaggaca gagccacaaa 11040
 caccacaaga gtggattgat gatctagaga ggttgcaaga tagataccct tggttgggtg 11100
 ctgaggttga ggggtgtgtg gctggtattg cttacgttg gccctggaag gctaggaacg 11160
 cttacgattg gacagttgag agtactgttt acgtgtcaca taggcatcaa aggttgggccc 11220
 taggatccac attgtacaca catttgctta agtctatgga ggcgcaaggt ttttaagtctg 11280
 tggttgctgt tataggcctt ccaaacgatc catctgttag gttgcatgag gctttgggat 11340
 acacagcccc ggggtacattg cgcgcagctg gatacaagca tgggtggatgg catgatgttg 11400
 gtttttggca aagggatttt gagttgccag ctctccaag gccagttagg ccagttacc 11460
 agatctgagt cgacctgcag gcatgcccgc tgaaatcacc agtctctctc taaaaatcta 11520
 tctctctcta taataatgtg tgagttagttc ccagataagg gaattagggg tcttataggg 11580
 tttcgctcat gtgttgagca tataagaaac ccttagtatg tatttgtatt tgtaaaatac 11640
 ttctatcaat aaaatttcta attcctaaaa ccaaatcca gggcgagctc gaattcgagc 11700
 tcgagccccg gtggatcctc tagagtcgac ctgcagaagc ttcgggtccgg cgcgcctcta 11760
 gttgaagaca cgttcatgtc ttcacgtaa gaagacactc agtagtcttc ggccagaatg 11820
 gcctaactca aggccatcgt ggccctcttg tcttcagat gaagagctat gtttaaactg 11880
 gcaagcgcta ctagacaatt cagtacatta aaaacgtccg caatgtgtta ttaagttgtc 11940
 taagcgtcaa tttgtttaca ccacaatata tcctgccca 11978

<210> 6

<211> 16752

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> La secuencia completa del inserto y las regiones flanqueantes del evento DP-004114-3

10

<400> 6

ES 2 816 640 T3

```
gagcatatcc agcaccagct ggtaccaagg tcgggtctct gtgctagtgc tattagctag 60
tgtaaggagc gagtaggtca gttaaggctg gtgcgctcgtg agggctgtct tgtgtgtagc 120
tacagcagac ggttcatcag aaggattatt cgtgcagtat atacagtaca actagacaat 180
gatgttgatg attggtctag agctagaggc ctatagccct atactactgt gtattgtccg 240
ccgttttagt tttttggtcc catcccatca atgcaaccgc cttgttttgc tccaattgtc 300
ccgttcctgc gcctcgcttt tgctctgtcg catcgcatac aaaaaaaaaa acgccgcgcc 360
ggctttgaat cgcgcccccc aactgctcca accaggcaac ggacacggcc accgtccgtg 420
```

ES 2 816 640 T3

tcgcgagcaa	aaaaacaaaa	agaggaacgc	gtccaggacg	aagcagtcca	ctgccgctgt	480
ggccggcaaa	agatctggtt	gagcacatgg	agattggaga	aggttgggtg	gttcttctgg	540
aaacgccaat	gaatgggggc	actgacatgt	actcttaaca	tgtagtgcaa	tccagagatc	600
ggatatccag	acactggcag	cacgatcgcc	tcggcgcgta	gatcacgcac	gcaaattact	660
gaagaccatt	cacaaaaaaa	aaaaaacaca	caggggctag	cgtgccccac	accaaaccca	720
agtgcctcgt	tgacgcagc	ggagcgaaaa	aaaacaataa	tgtcactgt	cacgtcgcgt	780
atccaacccc	gcggacgtct	cggctctcag	cagcagcaca	cggggcacct	cacgatgccg	840
ttctcgttgc	actccgtgca	ccgccggaac	ccgccgccgc	attcgtcgcc	ctcctcctcc	900
tcctccgcct	cgtcttcgtc	accacgtac	accttgacgc	tgcccagaca	gacatcgcag	960
agcacgaacc	gcatgtcccc	gcaggcctcg	cacgcgccgg	cgtcgccgcc	gtgtggggccg	1020
gccgtcgacg	cagcgccttc	gcacccggcc	agcctcggcg	cgagctcccc	ggcctcgtgc	1080
agccgcttca	gtcctcggc	gttgcccagc	agctccccgt	ccacgaagag	gctggggagg	1140
gcggcggggc	tgccgcggc	ttggccgagc	ccgaggccga	gaaggccgcg	gagctcgtcc	1200
cggaaaccgc	ggtgcatgga	cacgtcgcgc	tcgtcgaggc	gcacgccgta	gcccttgagg	1260
atggcgcgcg	ccaggcagca	gtcctcgtgc	gtggcgcgca	cgccgcgcag	cgacgtgaag	1320
tagagcaccg	ccctccgcgg	cggcagcgcc	ttcccctccc	cgccgctcgt	cggggcgggc	1380
tcgggcccag	gcatcggcat	cggcagcggc	gtcaccttgg	cggacgcgcg	gaggtcctgc	1440
gcaggcgccg	tggcgaccgg	gaacgagaag	gagtgggcgc	cgaacggcgc	gcccagcagc	1500
ggggagcggg	cctcgaggcc	ggccatgagc	gcccacgcgt	cgatgtcctc	cgatcgttg	1560
ggcggcgtca	tggtggcgt	gcgcggcgcc	agcctcgtgg	gcgcgggctc	cggcgcccgc	1620
ggcagggcct	tgtccagctc	cagggaccgc	agcgtggacg	acgtgagccg	caccacgtgg	1680
acgccgacgt	cgctggggca	ccgagccggg	aacgactggc	tgccgcggcag	cggtgacggg	1740
cagtaccgga	ggtcgtgacg	ggcctgcctt	gaggtggtgc	accccatggc	accaatgtac	1800
acacacggcc	aaagcgccaa	gtgggctgca	gactgcctgc	caatgtgatc	aagcagccag	1860
gagcagagac	ggatctctgg	ggatcggggg	ttctgggggt	taggatcttt	atactactct	1920
gtcattgggg	atataaaaact	aggagtgtgg	ttaattagga	ctcgatagat	aagttacca	1980
caagcgcgtg	aaatggtcta	cccgatgatg	tgattggcct	aaaaagaaca	agaagagtat	2040
ttggagctac	tgaacattct	cttttcctga	agataactaa	tttttggac	attcagactt	2100
gggagtctgg	acttttgag	ggaagttcaa	attgtggtct	gcctctgccca	tgtgttgttt	2160
tttagtcgga	gagtggccct	catttttttt	gtcctgttta	gctttatagt	cgtagcagct	2220
agttagcгаа	tttaaccttg	gattatggcc	gtgttagtca	acaatcatt	gattatttc	2280
ctccctttcg	cgtgctttt	cctgtacgca	ttctcgcgtc	ccttgattcg	aggaccctgt	2340
tcacaacaca	gggctctggc	tttgaggcct	ctcgtttgta	gcacttgca	gtagttacc	2400
ggaccgaagc	ttcaacacag	atctgatagt	ttaaacgctc	ttcaactgga	agagcggtta	2460
cccggaccga	agcttcggcc	ggggcccctc	gatatccgcg	ggcatgcctg	cagtgacgcg	2520
tgaccgggtc	gtgcccctct	ctagagataa	tgagcattgc	atgtctaagt	tataaaaaat	2580
taccacatat	ttttttgtc	acactgtttt	gaagtgcagt	ttatctatct	ttatacatat	2640
atttaacatt	tactctacga	ataataaat	ctatagtact	acaataatat	gattgtttta	2700
gagaaatcata	taaatgaaca	gttagacatg	gtctaaagga	caattgagta	ttttgacaac	2760
aggactctac	agttttatct	ttttagtgtg	catgtgttct	cctttttttt	tgcaaatagc	2820
ttcacctata	taatacttca	tccattttat	tagtacatcc	atthaggggt	taggggtaat	2880
ggtttttata	gactaatttt	tttagtacat	ctattttatt	ctattttagc	ctctaaatta	2940
agaaaactaa	aactctatth	tagttttttt	atthaataat	ttagatataa	aatagaataa	3000
aataaagtga	ctaaaaatta	aacaaatacc	ctttaagaaa	ttaaaaaac	taaggaaaca	3060
ttttctttgt	ttcagtaga	taatgccagc	ctgttaaacg	ccgtcgacga	gtctaaccga	3120
caccaaccag	cgaaccagca	gcgtcgcgtc	gggccaagcg	aagcagacgg	cacggcatct	3180
ctgtcgcgtc	ctctggacc	ctctcgagag	ttccgctcca	ccgttgact	tgtccgctg	3240
tcggcatcca	gaaatgctg	ggcggagcgg	cagacgtgag	ccggcacggc	aggcggcctc	3300
ctcctcctct	cacggcaccg	gcagctacgg	gggattcctt	tcccaccgct	ccttcgcttt	3360
cccttcctcg	cccggcgtaa	taaatagaca	ccccctccac	accctctttc	cccaacctcg	3420
tgtgttctcg	agcgcacaca	cacacaacca	gatctcccc	aaatccacc	tctggcacct	3480
ccgcttcaag	gtacgcccgt	cgctcctccc	ccccccccct	ctctaccttc	tctagatcgg	3540
cgttccggtc	catggttagg	gcccggtagt	tctacttctg	ttcatgtttg	tgtagatcc	3600
gtgtttgtgt	tagatccgtg	ctgctagcgt	tcgtacacgg	atgcgacctg	tacgtcagac	3660
acgttctgat	tgctaacttg	ccagtgtttc	tctttgggga	atcctgggat	ggctctagcc	3720
gttccgcaga	cgggatcgat	ttcatgattt	tttttgtttc	gttgcatagg	gtttggtttg	3780
cccttttctc	tattttcaat	atatgccgtg	cacttgtttg	tcgggtcatc	ttttcatgct	3840
tttttttgct	ttggttgtga	tgatgtggtc	tggttggggc	gtcgttctag	atccgagtag	3900
aattctgtht	caaactacct	ggtggattta	ttaatthtgg	atctgtatgt	gtgtgccata	3960
catattcata	gttacgaatt	gaagatgatg	gatggaaata	tcgatctagg	ataggtatac	4020
atgttgatgc	gggttttact	gatgcatata	cagagatgct	ttttgttcgc	ttggttgtga	4080
tgatgtggtg	tggttggggc	gtcgttcatt	cgthctagat	cggagtagaa	tactgtttca	4140
aactacctga	tgtatthatt	aatthtggaa	ctgtatgtgt	gtgtcataca	tcttcatagt	4200
tacgagttta	agatggatgg	aaatctgat	ctaggatagg	tatacatggt	gatgtgggtt	4260
ttactgatgc	atatacatga	tggcatatgc	agcatctatt	catatgctct	aaccttgagt	4320

ES 2 816 640 T3

acctatctat tataataaac aagtatgttt tataattatt ttgatcttga tatacttggga 4380
 tgatggcata tgcagcagct atatgtggat ttttttagcc ctgccttcat acgctattta 4440
 tttgcttggt actgtttctt ttgtcagatc tcaccctggt gtttgggtgtt acttctgcag 4500
 gtcgactcta gaggatccaa caatggagaa caacatacag aatcagtgcg tcccctacaa 4560
 ctgcctcaac aatcctgaag tagagattct caacgaagag aggtcgcactg gcagattgcc 4620
 gttagacatc tccctgtccc ttacacgttt cctgttgtct gagtttgttc caggtgtggg 4680
 agttgcggtt ggccctctcg acctcatctg gggcttcac actccatctg attggagcct 4740
 ctttcttctc cagattgaac agttgattga acaaaggatt gagacctgg aaaggaatcg 4800
 ggccatcact acccttcgtg gcttagcaga cagctatgag atctacattg aagcactaag 4860
 agagtgggaa gccaatccta acaatgccca actgagagaa gatgtgcgta tacgctttgc 4920
 taacacagat gatgctttga tcacagccat caacaacttc acccttacca gcttcgagat 4980
 ccctcttctc tcggtctatg ttcaagctgc taacctgcac ttgtcactac tgcgcgacgc 5040
 tgtgtcgttt gggcaagggt ggggactgga ctagctact gtcaacaatc actacaacag 5100
 actcatcaat ctgattcatc gatacacgaa acattgtttg gataacctaca atcagggatt 5160
 ggagaacctg agaggtacta acactcgcca atggggcagg ttcaatcagt tcaggagaga 5220
 ccttacactt actgtgttag acatagttgc tctctttccg aactacgatg ttcgtaccta 5280
 tccgattcaa acgtcatccc aacttacaag ggagatctac accagttcag tcattgaaga 5340
 ctctccagtt tctgcaaca tacccaatgg tttcaacagg gctgagtttg gactgagacc 5400
 accccatctc atggacttca tgaactctt gttgtgact gcagagactg ttagatcca 5460
 aactgtgtgg ggaggacact tagttagctc acgcaacacg gctggcaatc gtatcaactt 5520
 tcctagttac ggggtcttca atcccgggg cgccatctgg attgcagatg aagatccacg 5580
 tcctttctat cggacctgt cagatcctgt ctctcgtccga ggaggctttg gcaatcctca 5640
 ctatgtactc ggtcttaggg gagtggcctt tcaacaaact ggtacgaatc acaccgcac 5700
 attcaggaac tccgggacca ttgactctct agatagata ccacctcaag acaacagcgg 5760
 cgcaccttg aatgactact cccatgtgct gaatcatgtt acctttgtgc gctggccagg 5820
 tgagatctca ggttccgact catggagagc accaatgttc tcttggacgc atcgtagcgc 5880
 taccocaca aacaccattg atccagagag aatcactcag attcccttg tgaaggcaca 5940
 cacactcag tcaggaacta cagttgtaag agggccgggg ttcacgggag gagacattct 6000
 tcgacgcact agtggaggac cattcgcgta caccattgtc aacatcaatg ggcaacttcc 6060
 ccaaaggtat cgtgccagga tacgctatgc ctctactacc aatctaagaa tctacgttac 6120
 ggttgacagg gaacggatct ttgctggtca gttcaacaag acaatggata ccggtgatcc 6180
 acttacattc caatcttct cctacgccac tatcaacacc gcgttcacct ttccaatgag 6240
 ccagagcagt ttcacagtag gtgctgatac ctccagttca ggcaacgaag tgtacattga 6300
 caggtttgag ttgattccag ttactgccac actogagtaa ggatccgtcg acctgcagcc 6360
 aagctttcgc gagctcgaga tccccgacat atgccccggt ttcggtgcca ctaacatgag 6420
 ttcttggaca aatttgattg gacctgatga gatgatccaa cccgaggata tagcaaaagct 6480
 cgttcgtgca gcaatggaac ggccaaaccg tgcttttgtc cccaagaatg aggtgctatg 6540
 catgaaggaa ctatcccgtt gatgtccagg agtctcaggg ttaatgtcta tgaatttaa 6600
 ataagtgtgt cggatatttg taatctcata tagattttca ctgtgcgacg aaaaaatatt 6660
 aaataaata tattattatc tacgttttga ttgagatata atcaatatta taataaaaaat 6720
 atccattaaa cacgatttga tacaatgac agtcaataat ctgatttgaa tatttataa 6780
 ttgtaacgaa ttacataaag atcgaataga aaatactgca ctgcaaatga aatttaacac 6840
 atactaataa atgctcaaa tatctttgcc aagatcaagc ggagtggagg cctcataatcc 6900
 ggtctcagtt acaagcacgg tatccccgaa ggcgctcca ccaatgcctc cgacatagat 6960
 gccgggctcg acgctgagga cattgcctac cctgagcatg gtctcagcgc cggcttaag 7020
 ctcaatccca tcccactctg aatctctat cccgcgccca gtccgggtgta agaacgggtc 7080
 tgtccatcca cctctgttgg gaattccggt ccgggtcacc tttgtccacc aagatggaac 7140
 tgcggccagc ttgcatgcct gcagtgacg gtgaccgggt cgtgccctc tctagagata 7200
 atgagcattg catgtctaag ttataaaaa ttaccacata tttttttgt cacacttgtt 7260
 tgaagtgcag tttatctatc tttatacata tatttaaact ttactctacg aataataata 7320
 tctatagtag tacaataata tcagtgtttt agagaatcat ataatgaac agttagcat 7380
 ggtctaaagg acaattgagt attttgacaa caggactcta cagttttatc tttttagtgt 7440
 gcatgtgttc tcttttttt ttgcaaatag ctccacctat ataatactc atccatttta 7500
 ttagtacatc catttaggtt ttagggtaa tggtttttat agactaattt ttttagtaca 7560
 tctattttat tctattttag cctctaaatt aagaaaacta aaactctatt ttagttttt 7620
 tatttaataa tttagatata aaatagaata aaataaagt actaaaaatt aaacaaatac 7680
 cctttaagaa attaaaaaa ctaaggaac atttttcttg tttcgagt tagatgccaag 7740
 cctgttaaac ccgctcagc agtctaaccg acaccaacca gcgaaccagc agcgtcgcgt 7800
 cgggccaaagc gaagcagacg gcacggcatc tctgtcgtg cctctggacc cctctcgaga 7860
 gttccgctcc accgttggaac ttgctccgct gtgggcatcc agaaattgag tggcggagcg 7920
 gcagacgtga gccggcacgg caggcggcct cctcctcctc tcacggcacc ggcagctacg 7980
 ggggattcct ttcccaccgc tccctcgtt tccctcctc gcccgccgta ataaatagac 8040
 accccctcca caccctctt ccccaacctc gtgttgttcg gagcgcacac acacacaacc 8100
 agatctccc caaatccacc cgtcggcacc tccgcttcaa ggtacgccc tctcctccc 8160
 cccccctccc tctctacct ctctagatcg gcgctccggt ccatggttag ggcccgttag 8220

ES 2 816 640 T3

ttctacttct gttcatgttt gtgtagatc cgtgtttgtg ttagatccgt gctgctagcg 8280
 ttcgtacacg gatgcgacct gtacgtcaga cacgttctga ttgctaactt gccagtggtt 8340
 ctctttgggg aatcctggga tggctctagc cgttccgcag acgggatcga tttcatgatt 8400
 ttttttgttt cgttgcatag ggtttggtt gcccttttcc tttatttcaa tatatgccgt 8460
 gcacttgttt gtocgggtcat ctttcatgc tttttttgt cttggttgtg atgatgtgtg 8520
 ctgggtgggc ggtcgttcta gatcggagta gaattctggt tcaaactacc tgggtgattt 8580
 attaatlttg gatctgtatg tgtgtgccat acatattcat agttacgaat tgaagatgat 8640
 ggatggaaat atcgatctag gataggtata catgttgatg cgggttttac tgatgcatat 8700
 acagagatgc tttttgttcg cttggttgtg atgatgtgtg gtgggtgggc ggtcgttcat 8760
 tcgttctaga tcggagtaga atactgtttc aaactacctg gtgtatttat taatlttgga 8820
 actgtatgtg tgtgtcatac atcttcatag ttacgagttt aagatggatg gaaatatcga 8880
 tctagatag gtatacatgt tgatgtgggt tttactgatg catatacatg atggcatatg 8940
 cagcatctat tcatatgctc taaccttgag tacctatcta ttataataaa caagtattgt 9000
 ttataattat tttgatcttg atatacttgg atgatggcat atgcagcagc tatatgtgga 9060
 ttttttttagc cctgccttca tacgctatltt atttgcttgg tactgtttct tttgtcgatg 9120
 ctcaccctgt tgtttgggtg tacttctgca ggctcactct agaggatcca cacgacacca 9180
 tgtccgcccg cgaggtgcac atcgacgtga acaacaagac cggccacacc ctccagctgg 9240
 aggacaagac caagctcgac ggcggcaggt ggcgcacctc cccgaccaac gtggccaacg 9300
 accagatcaa gaccttcgtg gccgaatcca acggcttcat gaccggcacc gagggcacca 9360
 tctactactc aattaatggc gaggccgaga tcagcctcta cttcgacaac ccgttcgccg 9420
 gctccaacaa atacgacggc cactccaaca agtcccagta cgagatcatc acccagggcg 9480
 gctccggcaa ccagtcaccac gtgacctaca ccatccagac cacctcctcc cgctacggcc 9540
 acaagtcctg agtcatgagt catgagtcag ttaacctaga cttgtccatc ttctggattg 9600
 gccaaactaa ttaatgtatg aaataaaagg atgcacacat agtgacatgc taactactat 9660
 aatgtgggca tcaaagttgt gtgttatgtg taattactag ttatctgaat aaaagagaaa 9720
 gagatcatcc atatttctta tcctaaatga atgtcacgtg tctttataat tctttgatga 9780
 accagatgca tttcattaac caaatccata tacatataaa tattaatcat atataattaa 9840
 tatcaattgg gtttagcaaaa caaatctagt ctaggtgtgt tttgccaatg cggcccgcgga 9900
 ccgaattggg gatctgcatg aaagaaactg tcgcactgct gaaccgcacc ttgtcacttt 9960
 catcgaacac gacctgtgcc caagatgacg gtgctgcggc ctaagtgagg ctgaattgcc 10020
 ttggacagaa cgggactccc tacaattagt taggccaac ggtgcatcca tgtgtagctc 10080
 cggctcggg atctatcgcc atctgcaata gcatccatgg agctcgttcc atgtagttgg 10140
 agatgaacca atgatcgggc gtgtggacgt atgttcctgt gtactccgat agtagagtac 10200
 gtgttagctc tttcatgggt caagtgaat ttgtgttgg ttaattacc ctacgttagt 10260
 tgcgggacag gagacacatc atgaatttaa aggcgatgat gtcctctcct gtaatgttat 10320
 tcttttgatg tgatgaatca aaatgtcata taaaacattt gttgctcttt agttaggcct 10380
 gatcgtagaa cgaaatgctc gtgtagcggg gctacgagcc tatgacgcaa taactactgt 10440
 ttgcccggcc ggaactcgtt gacaaaaaaa agcatgttaa gtttatttac aattcaaaa 10500
 ctaacatatt atattccctc aaagcagggt cacgatcaca cctgtacctc aaaaaaacat 10560
 gaagaatata ttactccatt attatgagat gaaccacttg gcaagagtgg taagctatat 10620
 aaaaaaatga acattattac gagatgttat atgccattat attgattcga agatatatgt 10680
 ttctttctcc cacgggcacc taacgggatac atgataaagg caaggcagat cacgggaaat 10740
 tattcgaata catgttacgc cctattgccc gaaaaaaaat gcagggcagg tgttggccgt 10800
 agcgaattaa gcacttaagc tggaggttgc cacacttga tgcaagcgtc tgaccctct 10860
 aaaaaatcgg cgtatccgta cgtatccgta tcccctatcc aacatctagc tggcccacag 10920
 acggggctgg gcagatcgtg gatgccgggt cgacgtcgat cgtcagccat catagaccaa 10980
 tcgaccatct gttatggatg cttgctagct agactagtca gacataaaat ttggatactt 11040
 tctcccaact gggagacggg gactgatgtg cagctgcacg tgagctaaat ttttccctat 11100
 aatatgcat gaaatactgc attatcttgc cacagccact gccacagcca gataacaagt 11160
 gcagctggta gcacgcaacg catagctctg gactgttagc taggtagcca accggatcca 11220
 cacgaccca tgmtcgacac caacaaggtg tactgagatca gcaaccacgc caaccgctc 11280
 tacgcccga cctacctctc cctcgacgac tccggcgtgt ccctcatgaa caagaacgac 11340
 gacgacatcg acgactaaa cctcaagtgg ttctcttcc cgatcgacga cgaccagtac 11400
 atcatcacct cctacgccgc caacaactgc aaggtgtgga acgtgaacaa cgacaagatt 11460
 aatgtgtcaa cctactcctc caccaactcc atccagaagt ggcagatcaa ggccaacggc 11520
 tcctcctacg tgatccagtc cgacaacggc aaggtgctca ccgcccggc cgccaggcc 11580
 ctggcctca tccgctcac cgacgagtc tccaacaacc cgaaccagca atggaactgt 11640
 acgtccgtgc agaccatcca gctcccgcag aaccagatca tcgacaccaa gctcaaggac 11700
 taccgaagt actccccgac cggaacatc gacaacggca cctccccgca gctcatgggc 11760
 tggaccctcg tgcogtgcac catggtgaac gaccggaaca tcgacaagaa caccagatc 11820
 aagaccacc cgtactacat cctcaagaag taccagtact ggcagagggc cgtgggctcc 11880
 aacgtcgcgc tccgcccgca cgagaagaag tcctacacct acgagtgggg caccgagatc 11940
 gaccagaaga ccaccatcat caacaccctc ggcttccaga tcaacatcga cagcggcatg 12000
 aagttcgaca tcccggaggt gggcggcggg accgacgaga tcaagacca gctcaacgag 12060
 gagctcaaga tcgagtatcc acatgagacg aagatcatgg agaagtacca ggagcagctc 12120

ES 2 816 640 T3

gagatcgaca acccgaccga ccagtcocat aactccatcg gcttcctcac catcacctcc 12180
ctggagctct accgctacaa cggctccgag atccgcatca tgcagatcca gacctccgac 12240
aacgacacct acaacgtgac ctctaccocg aaccaccagc aggccctgct gctgctgacc 12300
aaccactcct acgaggaggt ggaggagatc accaacatcc cgaagtccac cctcaagaag 12360
ctcaagaagt actacttctg agtcatgagt catgagtcag ttaacctaga cttgtccatc 12420
ttctggattg gccaacttaa ttaatgtatg aaataaaagg atgcacacat agtgacatgc 12480
taatcactat aatgtgggca tcaaagttgt gtgttatgtg taattactag ttatctgaat 12540
aaaagagaaa gagatcatcc atatttotta tcctaaatga atgtcacgtg tctttataat 12600
tctttgatga accagatgca ttcattaac caaatccata tacatataaa tattaatcat 12660
atataattaa tatcaattgg gttagcaaaa caaatctagt ctagggtgtg tttgccaatt 12720
atcgatgggc cccggccgaa gctggccgcg gaccgaattc ccatggagtc aaagattcaa 12780
atagaggacc taacagaact cgccgtaaag actggcgaa agttcataca gattctctta 12840
cgactcaatg acaagaagaa aatcttcgtc aactgggtgg agcacgacac gcttgtctac 12900
tccaaaaata tcaaagatac agtctcagaa gaccaaaggg caattgagac ttttcaaca 12960
agggtaatat ccggaacct cctcggattc cattgcccag ctatctgtca ctttattgtg 13020
aagatagtg aaaggaagg tggctcctac aaatgccatc attgcgataa aggaaaggcc 13080
atcgttgaag atgcctctgc cgacagtggc cccaaagatg gacccccacc cacgaggagc 13140
atcgatgaaa agaagacgt tccaaccacg tcttcaaagc aagtggattg atgtgatatc 13200
tccactgacg taagggatga cgcacaatcc cactatcctt cgcaagacc ttcctctata 13260
taaggaagtt catttcattt ggagaggaca gggtaaccgg ggatccacca tgtctccgga 13320
gaggagacca gttgagatta ggccagctac agcagctgat atggccgagg tttgtgatat 13380
cgtaaccat tacattgaga cgtctacagt gaactttagg acagagccac aaacaccaca 13440
agagtggatt gatgatctag agaggttgca agatagatac ccttggttgg ttgctgaggt 13500
tgagggtggt gtggctggta ttgcttacgc tgggcccctg aaggctagga acgcttagca 13560
ttggacagt gagagtactg ttaoctgtc acataggcat caaaggttgg gccttagatc 13620
cacattgtac acacatttgc ttaagtctat ggaggcga ggttttaagt ctgtggttgc 13680
tgttatagc cttccaaacg atccatctgt taggttgcag gaggcttgg gatacacagc 13740
ccgggtgaca ttgcgcgag ctggatacaa gcatggtgga tggcatgatg ttggtttttg 13800
gcaaagggat tttgagttgc cagctcctcc aaggccaagt aggccagtta cccagatctg 13860
agtgcacctg caggcatgcc cgtgaaatc accagtctct ctctacaaat ctatctctct 13920
ctataataat ggtgagtag ttcccagata agggaattag ggttcttata ttcctctcgt 13980
catgtggtga gcatataaga aacccttagt atgtatttgt atttgtaaaa tacttctatc 14040
aataaaattt ctaattccta aaaccaaatt ccagggcgag ctcgaaatcg agctcgagcc 14100
cgggtggatc ctctagagtc gacctgcaga agcttcggtc cggcgcgcct ctagtgaag 14160
acacgttcat gtcttcatcg taagaagaca ctcagtagc ttcggccaga atggcctaac 14220
tcaaggccat cgtggcctct tgctcttcag gatgaagagc tatgtttaa cgtgcaagcg 14280
ctactagaca attcagtaga ttaaaaocgt ccgcaatgtg ttattaagtt gtctaagcga 14340
caattggaa caagtggcta tcgccagata taagaactc gatccgaaat atcgtttcaa 14400
aactagaaaa cagcgcggct ttggctaagc cgcgcactat ataggattt gggcacctt 14460
tgatggaacg tgaagcgtg ctgcgcaacta gttatttagg ttgaacctg gatatacgg 14520
tctcactgcg ccaatgcaag gcttgaact tggtagtaa tacgtactcc ctccgtttct 14580
ttttatttgt cgtggatag tgcaattttg cactatcgag cgacaaataa aaagaaacgg 14640
agggagtata tgattgtcag atgtagatat gtttatttat atatcacata cagatatata 14700
aaacagatca ctttttcaga tatacagttc caatgctcag cctgatcacc ctgtcataaa 14760
ttgcacgltt ctaattgatg ttgcttcag tgcgtcatga gaaccttctg aagaaactga 14820
tgaaggttgc caacctttca aagtttcaga aaccactttg catgtacact aagggctgg 14880
ttggcagccc aaaaccagcc agcgttttcc tggcttttc tcccgggaga aagccatgc 14940
atagattgtc cctggattat ttatctgtgt cctttggcta aaaattcgtc ccaatttct 15000
gtaggaaact acctcggcct tgggaggcca ggcgattctc caccgcctcg tctcgtccat 15060
ccttcgatgc tcacgcgtgc ctctcggat gctatcctca ggcgattctc cgtcgtctcg 15120
tctcatccat cctcacgcgc gcctcctccg acgtatccc caggcgattc tccaccgtct 15180
cgtctcatcc atoctcatgt acgctcgtc cagatctatc cccagacgat tttccgtctg 15240
ctcatctcct tcatgctcgc gcgcgcctcc tccgacgcta tcccaggcg atttttctgc 15300
cgtctcgtct ccttcatgcc cgcgcgcgcc tctccgagc ctatcccag gcgattttcc 15360
gccgtctcgt ctocctcatg cccgcgcgtg cctcctccga cgctattccc acgagcgcct 15420
ccgcgcgcgc tatcccaga cgattttccg ctgtctcgtc tcttctatgc ccgcgcgcc 15480
ctcctccgac gctatccca cgagcgcct cgcgcgcgt ccaccgtct cccgcgcgc 15540
atccccctaa ttctataga tctggacccc gctctacttt cgttggcata cttttgctt 15600
gtgtgcgcgg gctggagtg aagttgocg attcgatcac gggggagaag tggatcttgg 15660
gtcttgagc gctagggcg ttgccaggac gccgtggtgt gcattcatgg gtccataaa 15720
tctttatcat taccgcctta ggagctagtt gtagttcaca catcatatcc ttttctgctc 15780
gacatcgtct ggggatgcc taggtgccct accgacctc cggcattgtc ttgacctta 15840
ttagactcta tgtcatctag agccttctt ggtggccttt tgaccccaa gcgacctat 15900
gatcttacc taacgaggtc tcccttggg gggcaagatc cactttgtcc acttaactga 15960
agatctgatc ctcatcttga aatctttaat cccaaggtga ctctacgtcg tatgtggatg 16020

ES 2 816 640 T3

```

ctccgggtaa cctgccaaacc cggatcacc taagatctct ttcctaaggg gcgagatcta 16080
ggttcctacg agaaagaaga cgaccctgca ccattgcggt ccgtccggtc cagagtgcga 16140
acgtccggat gcgacacagg gaaggagtcg ctctgcagc gaggtcgcag actgtccaca 16200
cagcctcaga aggcaccgcc agacaatata tgtaataccc actctgtaag aaaaacctaa 16260
aaggagaaag tatattcctt tatctatatg tgtgttatat ttctactcac catcacatgt 16320
gaacatctca cttacacaaa taataatta acaaaagaca ctcaaataaa ttatgcatca 16380
tgctcgacct tattttgtgt gcattctggt acaatataaa aataatataa aaaacatata 16440
ttaatatcaa aatttggaga ttttaacccta atatgcaaat cggagttag aggaaagaaa 16500
gaaaaatgct atacaaaata aaggaataaa tatataaata aaggtaaac tattaatact 16560
ggtatattaa tttgaacagt tgacctaat atgaatatca caactggttt gaattcaaat 16620
atgaaatcca agaatttggg aataggaaaa atggagataa gaataaagga aaagaattct 16680
taactcggat gggcctggga aacgaatttc ggcccacttc ctgtgtcctt agctgtgcgg 16740
ctcagtcag tg 16752

```

```

5 <210> 7
   <211> 26
   <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

10 <220>
   <223> Cebador 09-0-2877

   <400> 7
   agggcctcat atccgtctc agttac 26

15 <210> 8
   <211> 29
   <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

20 <220>
   <223> Cebador 09-0-2880

   <400> 8
   cacgctgcac tgaggcatg caagctggc 29

25 <210> 9
   <211> 25
   <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

30 <220>
   <223> Cebador 02-0-197

   <400> 9
   ccgctgatac acaaggctg gtacc 25

35 <210> 10
   <211> 25
   <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

40 <220>
   <223> Cebador 02-0-198

   <400> 10
   ggagcccgtg tagagcatga cgatc 25

50 <210> 11
   <211> 29
   <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

   <220>
   <223> Cebador 09-0-3030

```

ES 2 816 640 T3

<400> 11
 gagcatatcc agcaccagct ggtaccaag 29

5 <210> 12
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador 09-0-2787

15 <400> 12
 gcaggcatgc cgcggata 19

 <210> 13
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador 09-0-3036

25 <400> 13
 tggctaccc gatgatgtga ttgcc 26

 <210> 14
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Cebador 09-0-3046

35 <400> 14
 cgaagacagg atctgacaag gtccgatag 29

 <210> 15
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Cebador 09-0-3045

45 <400> 15
 gacttcatga actcttgtt tgtgactgca gagac 35

 <210> 16
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Cebador 09-0-2980

 <400> 16
 ctcatgactc aggactgtg gc 22

60 <210> 17
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Cebador 08-0-2463

<400> 17
 atcagcctct acttcgac 18

5 <210> 18
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador 08-0-2759

<400> 18
 ctccatgatc ttogtctcat gtg 23

15 <210> 19
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador 09-0-2775

<400> 19
 caccaactcc atccagaagt ggc 23

25 <210> 20
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Cebador 09-0-3083

<400> 20
 gccttgcatg ggcgcagtga gaaccg 26

35 <210> 21
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Cebador 09-0-2799

<400> 21
 cggcgcgcct ctagtgaag acacgtt 27

45 <210> 22
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Cebador 09-0-3005

<400> 22
 cactggactg agccgcacag ctaaggacac 30

55 <210> 23
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Cebador 09-0-3230

65

<400> 23
 ggaacattca gacttgggag totggact 28

5 <210> 24
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador 09-0-3229

<400> 24
 gaacagggtc ctggaatcaa gggcagc 27

15 <210> 25
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador 09-0-3231

<400> 25
 cggttctcac tgcgcaatg caaggc 26

25 <210> 26
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Cebador 09-0-3084

<400> 26
 catgacgacc atgaagcaac atc 23

35 <210> 27
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Secuencia de unión 5'

<400> 27
 caacacagat ctgatagttt 20

45 <210> 28
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Secuencia de unión 3'

<400> 28
 cgtcaatttg gaacaagtg 20

55 <210> 29
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Cebador 08-O-2677

65

ES 2 816 640 T3

<400> 29
 cgttgtagc actgcacgt agt 23

5 <210> 30
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador 08-o-2678

<400> 30
 ggtaaccgct ctccagtg aa 22

15 <210> 31
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sonda 08-QP74

<400> 31
 aagcttcaac acagatc 17

25 <210> 32
 <211> 90
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Amplicón

35 <400> 32

cgttgtagc actgcacgt agttaccgg accgaagctt caacacagat ctgatagttt 60
 aaacgctctt caactggaag agcggttacc 90

40 <210> 33
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Cebador directo 11-0-4127

<400> 33
 ggaccctgtt cacaacacag ggct 23

50 <210> 34
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Cebador inverso 11-0-4128

<400> 34
 ggccgaagct tcggtccgg 19

60 <210> 35
 <211> 149
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 816 640 T3

<220>

<223> Amplicón

5 <400> 35

```
ggaccctggt cacaacacag ggctctggct ttggagcctc tcgtttgtag cacttgcacg 60
tagttaccg gaccgaagct tcaacacaga tctgatagtt taaacgctct tcaactggaa 120
gagcggttac ccggaccgaa gtttcggcc 149
```

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un amplicón que consiste en la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 32 o el complemento de longitud completa del mismo.
- 10 2. Un método para detectar el amplicón de la reivindicación 1 en una muestra biológica procedente de una planta, tejido o semilla del evento de maíz DP-004114-3, en donde dicha planta comprende una secuencia de nucleótidos que consiste en la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 32 o el complemento de longitud completa de la misma, en donde dicha secuencia de nucleótidos es detectable en dicha muestra usando un método de amplificación de ácidos nucleicos o un método de hibridación de ácidos nucleicos, en donde se ha depositado una muestra representativa de dicho evento de maíz DP004114-3 en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) con el n.º de registro PTA-11506.
- 15 3. El método de la reivindicación 2, en donde dicha muestra biológica comprende una planta, tejido o semilla del evento de maíz transgénico DP-004114-3.
- 20 4. El método de la reivindicación 3, en donde dicha muestra biológica es una muestra de ADN extraída de una planta de maíz transgénico del evento DP-004114-3 y en donde dicha muestra de ADN comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 32 o el complemento de la misma.
- 25 5. El método de la reivindicación 2, en donde dicha muestra biológica se selecciona entre el grupo que consiste en harina de maíz, maíz molido, jarabe de maíz, aceite de maíz, almidón de maíz y cereales producidos total o parcialmente para que contengan subproductos de maíz.
- 30 6. Un método para determinar la cigosidad del ADN de una planta de maíz que comprende el evento de maíz DP-004114-3 en una muestra biológica que comprende:
- (a) poner en contacto dicha muestra con un par de cebadores seleccionado entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 29 y 30, de tal forma que
- (1) cuando se usa en una reacción de amplificación de ácido nucleico que comprende ADN del evento de maíz DP-004114-3, dicha reacción produce un primer amplicón que consiste en la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 32 o el complemento de longitud completa del mismo, que es diagnóstico para el evento de maíz DP-004114-3 y
- (2) cuando se usa en una reacción de amplificación de ácido nucleico que comprende ADN genómico de maíz distinto de ADN de DP-004114-3, dicha reacción produce un segundo amplicón que es diagnóstico para el ADN genómico de maíz distinto de ADN de DP-004114-3;
- (b) llevar a cabo una reacción de amplificación de ácido nucleico; y
- (c) detectar los amplicones producidos de este modo, en donde la detección de la presencia de ambos amplicones indica que dicha muestra es heterocigota para el ADN del evento de maíz DP-004114-3, en donde la detección únicamente del primer amplicón indica que dicha muestra es homocigota para el ADN del evento de maíz DP-004114-3.
- 45 7. Un par de cebadores polinucleotídicos que comprenden un primer cebador polinucleotídico y un segundo cebador polinucleotídico 20, en donde el primer cebador polinucleotídico comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 29 y el complemento de la misma; y el segundo cebador polinucleotídico comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 30 y el complemento de la misma, que funcionan juntas en presencia de un molde de ADN de DP-004114-3 en una muestra para producir un amplicón diagnóstico para el evento DP-004114-3.
- 50 8. Un kit para detectar ácidos nucleicos que son únicos para el evento DP-004114-3 que comprende un par de cebadores que comprende en las SEQ ID NO: 29 y 30 y los complementos de las mismas, que funcionan como un par de cebadores en un método de detección de ácidos nucleicos y que tras la amplificación de o la hibridación con una secuencia de ácido nucleico diana en una muestra seguida de la detección del amplicón o la hibridación con la secuencia diana, son diagnósticos para la presencia de secuencias de ácido nucleico únicas para el evento DP-004114-3 en la muestra.
- 55

Figura 1

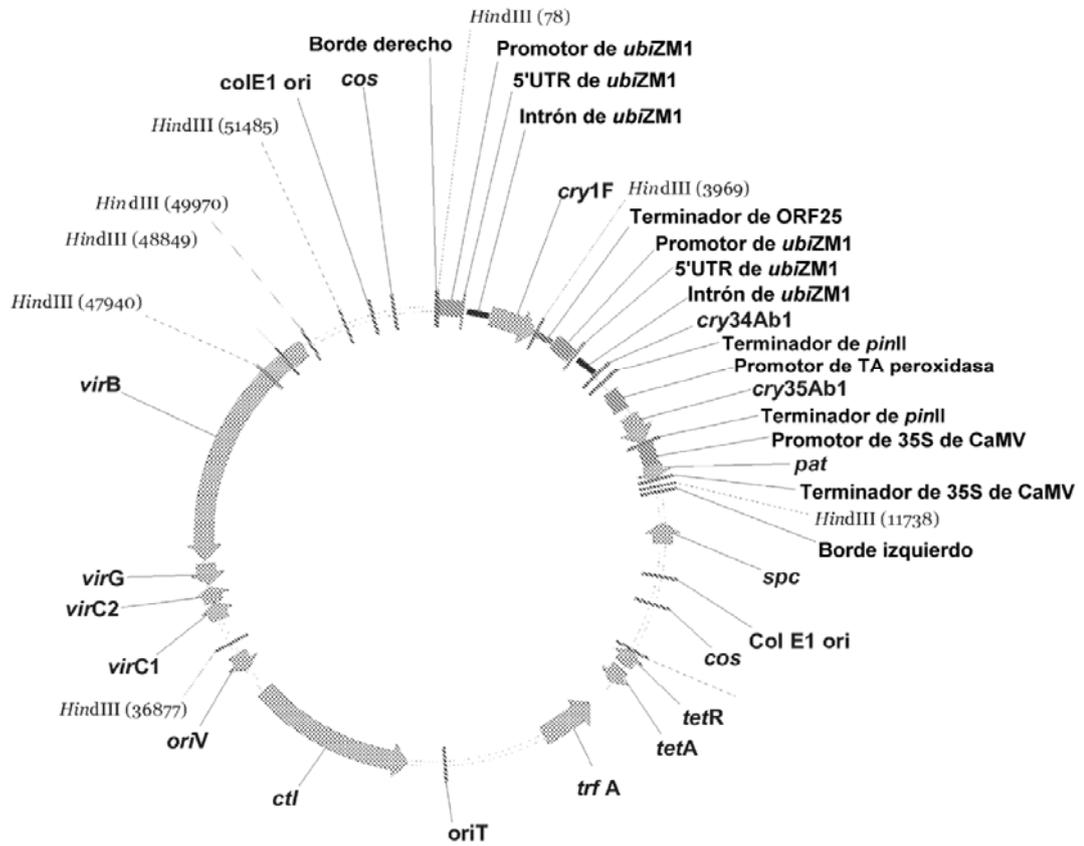


Figura 2

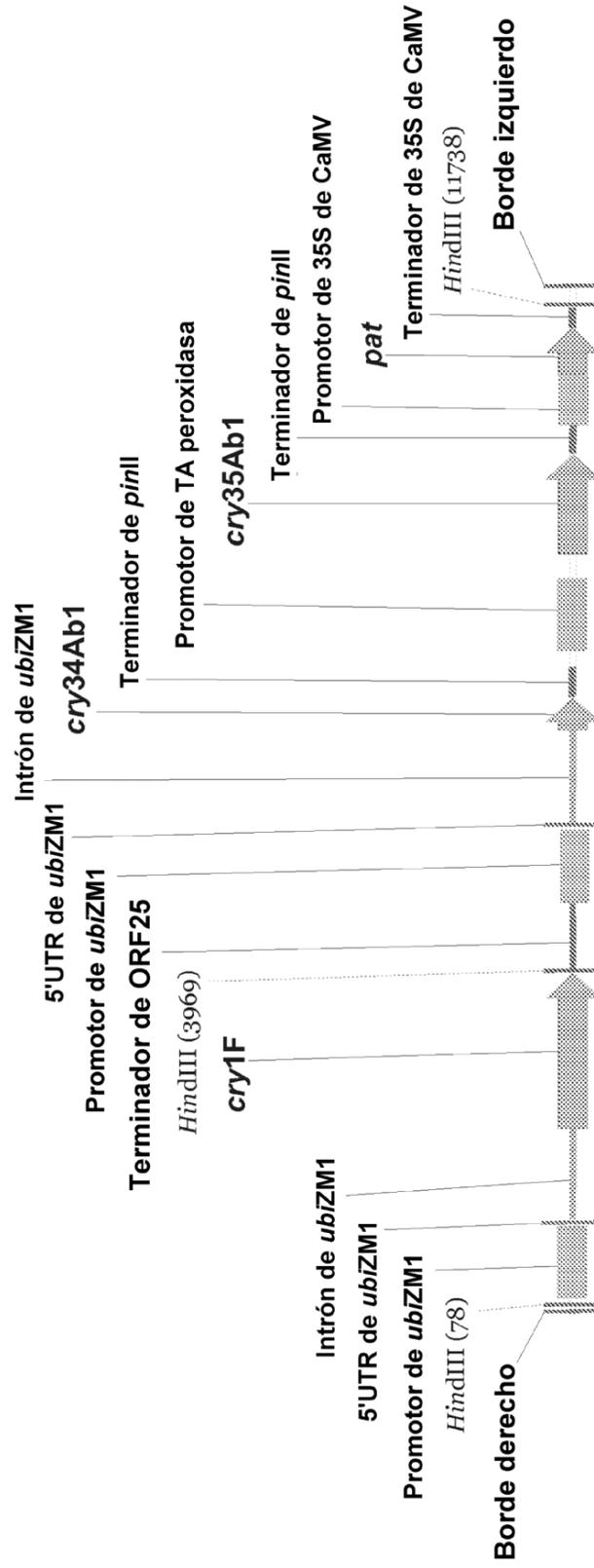


Figura 3

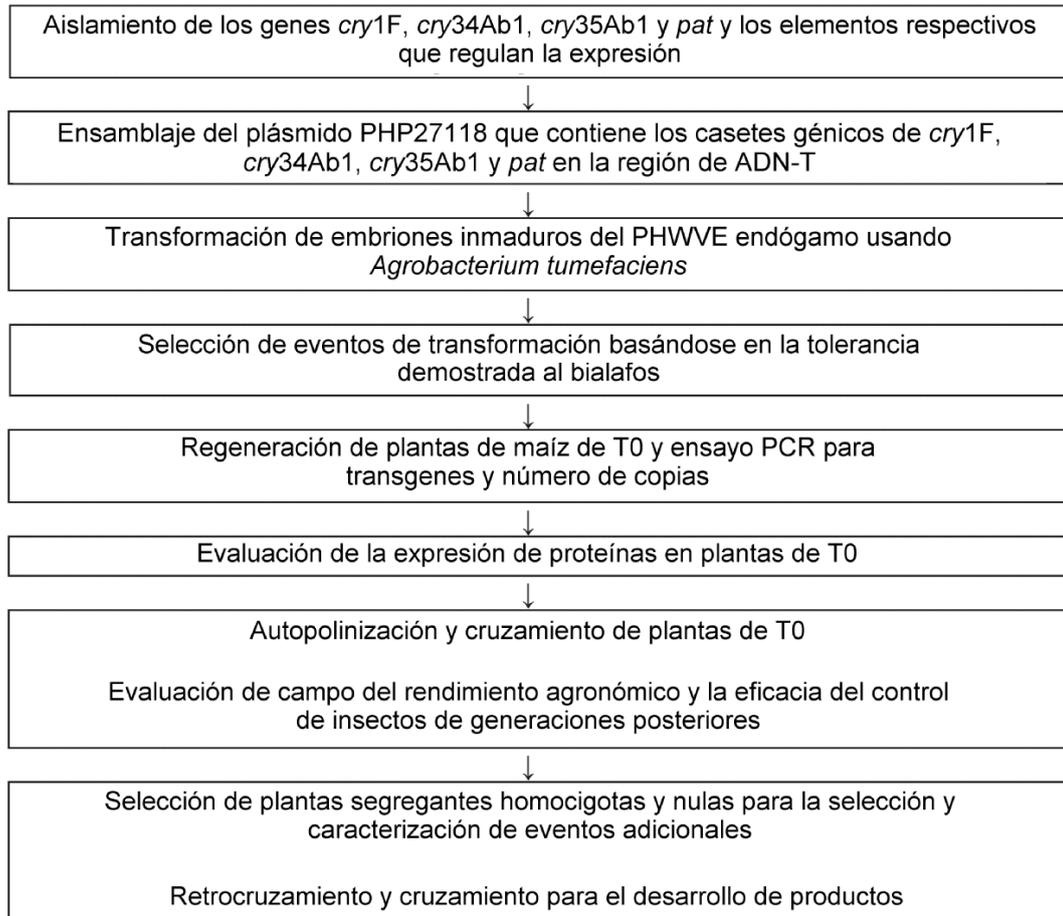


Figura 4

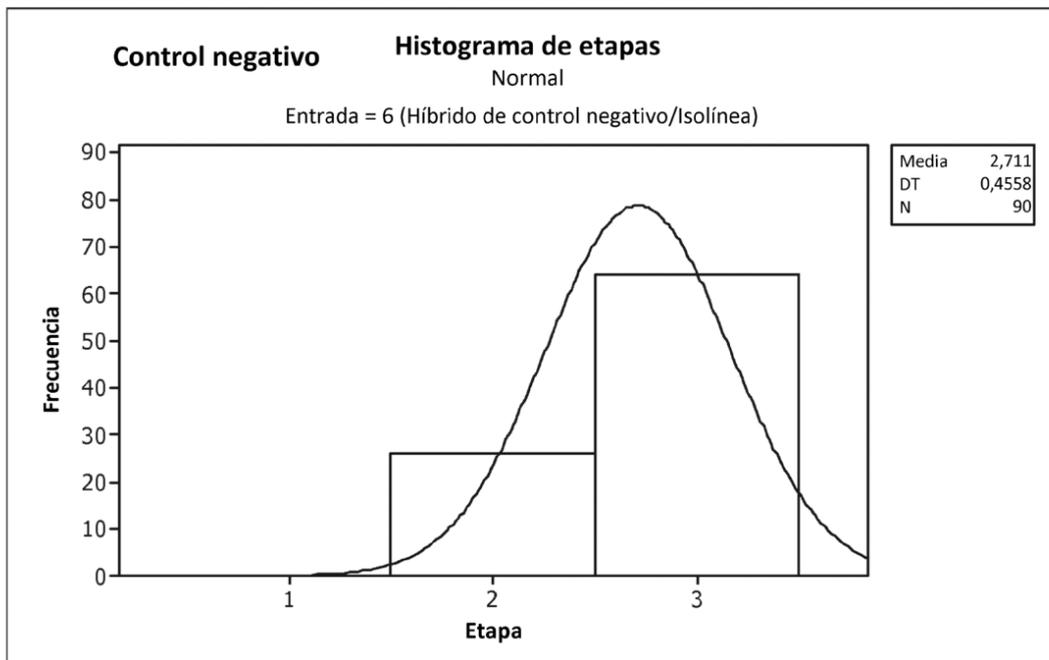
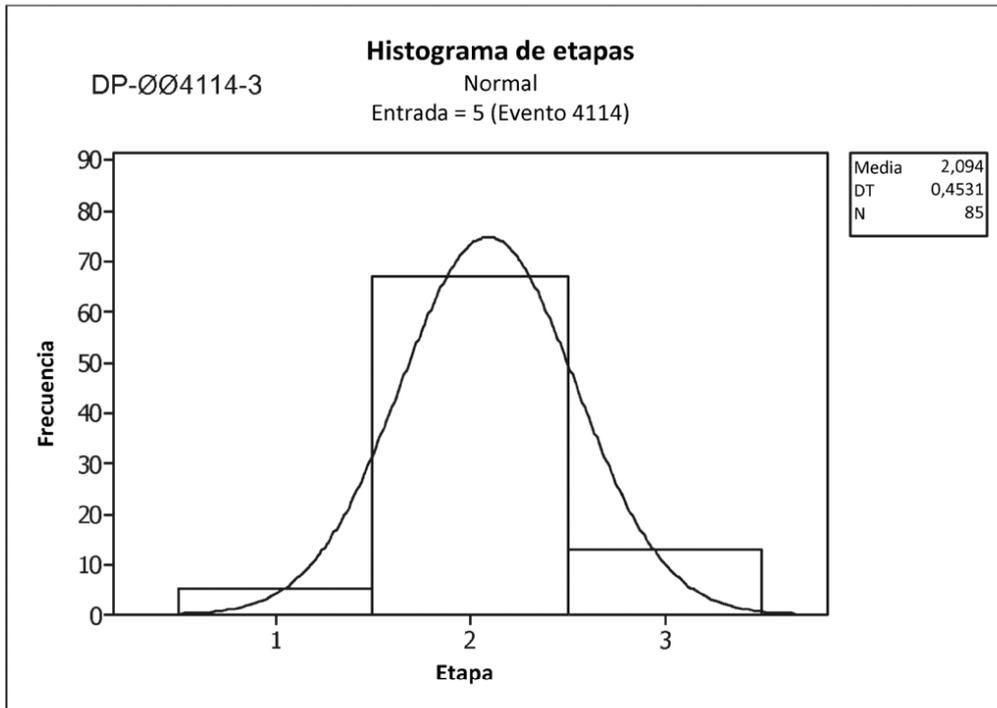


Figura 5

