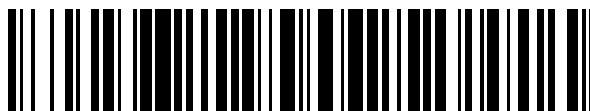


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 804**

51 Int. Cl.:
C12N 15/82 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04707435 .6**
96 Fecha de presentación: **02.02.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1592798**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.11.2005**

54 Título: **Evento de algodón MON 88913 y composiciones y procedimientos para su detección**

30 Prioridad:
12.02.2003 US 447184 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.06.2012

73 Titular/es:
**MONSANTO TECHNOLOGY LLC
800 NORTH LINDBERGH BOULEVARD
ST. LOUIS, MISSOURI 63167, US**

72 Inventor/es:
**CERNY, R. Eric;
DUONG, Can;
HART, Jesse L.;
HUBER, Scott A.;
KRIEB, Rachel L.;
LISTELLO, Jennifer J.;
MARTENS, Amy B. y
SAMMONS, Bernard**

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

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).

ES 2 382 804 T3

DESCRIPCIÓN

Evento de algodón MON 88913 y composiciones y procedimientos para su detección

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la biología molecular vegetal. Más específicamente, la invención se refiere a un evento de algodón tolerante al glifosato MON 88913 y a ensayos y procedimientos para detectar la presencia de ADN del evento de algodón MON 88913 en una muestra vegetal y composiciones del mismo.

Antecedentes de la invención

El algodón es un cultivo de fibra importante en muchas áreas del mundo. Los procedimientos de la biotecnología se han aplicado a algodón para la mejora de las características agronómicas y la calidad del producto. El procedimiento de introducción de transgenes en las plantas de algodón se ha demostrado la Patente Estadounidense Núm. 5.004.863. Un rasgo agronómico importante en la producción de algodón es la tolerancia a herbicidas, en particular, la tolerancia al herbicida glifosato. Esta característica ha sido introducida en las plantas de algodón y es un producto de éxito ahora utilizado en la producción de algodón. El evento de algodón comercial actual (1445) Ready® de Roundup proporciona excelente tolerancia al glifosato, el ingrediente activo en Roundup®, a través de la etapa de cuatro hojas (Nida et al., J. Agric. Food Chem. 44:1960-1966, 1996; Nida et al., J. Agric. Food Chem. 44:1967-1974, 1996). Sin embargo, debe limitarse la aplicación foliar más allá de la etapa de cuatro hojas debido a insuficiente tolerancia en tejidos reproductivos masculinos en ciertas condiciones. Esta falta de tolerancia reproductiva masculina parece ser el resultado de expresión insuficiente de CP4 PEPS en tejidos críticos, mayor sensibilidad de estos tejidos al glifosato y la acumulación de grandes cantidades de glifosato en estos tejidos de fuerte sumidero (Pline et al., Weed Sci. 50:438-447, 2002). Existe la necesidad de una planta de algodón más altamente tolerante al glifosato que el algodón 1445 Ready® de Roundup.

Sería ventajoso para ser capaz de detectar la presencia de un evento concreto a fin de determinar si la progenie de un cruzamiento sexual contiene un transgén de interés. Además, un procedimiento para detectar un evento concreto sería útil para el cumplimiento de reglamentaciones que requieren aprobación de premercado o marcado de los alimentos derivados de plantas de cultivo recombinante, por ejemplo. Es posible detectar la presencia de un transgén por cualquier procedimiento de detección de ácidos nucleicos bien conocido, como la reacción en cadena de polimerasa (PCR) o hibridación de ADN utilizando sondas de ácidos nucleicos. Estos procedimientos de detección suelen centrarse en elementos genéticos utilizados con frecuencia, tales como promotores, terminadores de transcripción 3', genes marcadores, etc. Como resultado, tales procedimientos pueden no ser útiles para discriminar entre los diferentes eventos, especialmente los que se producen usando la misma construcción de ADN a menos que se conozca la secuencia de ADN genómico cromosómico adyacente al ADN insertado ("ADN genómico flanqueante"). Se han descrito procedimientos de detección de ADN específicos del evento para un evento de algodón 1445 tolerante al glifosato (documento US 20020120964 y documento WO 0234946). Una secuencia de ADN que tiene superposición de 646 nt con la secuencia de unión de la SEC ID N° 3 se divulga en el documento US 6.462.258.

La presente invención se refiere a un evento de algodón tolerante al glifosato MON 88913, composiciones contenidas en el mismo, y al procedimiento para la detección de la región de inserción del transgén/genómica en el evento de algodón MON 88913 y su progenie.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona una planta de algodón tolerante al glifosato, o partes de la misma o una semilla de la misma, el genoma de la cual comprende:

(i) Una inserción de ADN que comprende un primer cassette de expresión que comprende un promotor 1-alfa del factor de alargamiento del virus-*Arabidopsis* del mosaico Figwort quimérico (FMV35S/Eflα), operativamente unido al líder de la traducción 1-alfa de alargamiento de *Arabidopsis* e intrón, operativamente unido al péptido de tránsito al cloroplasto 5-enol-piruvilsiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) de *Arabidopsis*, operativamente unido a un EPSPS tolerante al glifosato de la cepa CP4 de la especie *Agrobacterium*, operativamente unido a la región de terminación 3' de ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa E9 de guisante, y un segundo cassette de expresión que comprende el promotor CaMV35S-Act8 incluyendo el primer intrón del gen Act8, operativamente conectado a un péptido de tránsito al cloroplasto de EPSPS de *Arabidopsis*, operativamente conectado a un EPSPS tolerante al glifosato de la cepa CP4 de la especie *Agrobacterium*, operativamente unido a la región de terminación 3' de ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa E9 de guisante, y

(ii) una o más secuencias de unión de transgén/genómica seleccionadas de la SEC ID N° 1, SEC ID N° 2, SEC ID N° 3 y SEC ID N° 4 cubriendo el sitio de inserción que comprende la inserción de ADN en el genoma de algodón. Las partes de la planta incluyen polen, óvulo, flores, cápsulas, fibra, brotes, raíces y hojas. La invención se refiere a una progenie de la planta de algodón tolerante al glifosato anterior que comprende una inserción de ADN y secuencia de unión al transgén/genoma según lo definido más arriba.

Otro aspecto de la invención proporciona un conjunto de cebadores de ADN que comprende dos moléculas de ADN, en el que

5 (i) la primera molécula de ADN comprende al menos 11 o más nucleótidos contiguos de cualquier porción de la región transgén de la molécula de ADN de la SEC ID N° 3 o su complemento, y la segunda molécula de ADN de longitud similar comprende cualquier porción de la región de ADN genómico de algodón flanqueante 5' comprendida dentro de la SEC ID N° 3 o su complemento, en la que la primera y segunda moléculas de ADN se reasocian a hebras opuestas de la SEC ID N° 3 y en la que los extremos 3' de la primera y segunda moléculas de ADN están orientadas una hacia la otra; o

10 (ii) la primera molécula de ADN comprende al menos 11 o más nucleótidos contiguos de cualquier porción de la región del transgén de la molécula de ADN de la SEC ID N° 4, o su complemento, y la segunda molécula de ADN de longitud similar comprende cualquier porción de la región de ADN genómico de algodón flanqueante 3' comprendida dentro de la SEC ID N° 4, su complemento, reasociándose la primera y segunda moléculas de ADN a hebras opuestas de la SEC ID N° 4 y estando orientados los extremos 3' de la primera y segunda moléculas de ADN uno hacia el otro,

15 produciendo dicho conjunto de cebadores, cuando se utiliza en un procedimiento de amplificación de ADN, un amplicón que comprende la SEC ID N° 1 o SEC ID N° 2 de diagnóstico para MON88913.

En conformidad con otro aspecto de la invención, se proporciona un kit de detección de ADN que comprende el conjunto de cebadores anterior.

20 En conformidad con otro aspecto de la invención, se proporciona una molécula de ADN que comprende una secuencia seleccionada de la SEC ID N° 1, SEC ID N° 2, SEC ID N° 3 y SEC ID N° 4.

25 En conformidad con otro aspecto de la invención, se proporcionan procedimientos para detectar la presencia de ADN que corresponda específicamente al ADN del evento de algodón MON 88913 en una muestra. Dichos procedimientos comprenden: (a) poner en contacto la muestra que comprende ADN con un conjunto de cebadores de ADN que, cuando se utiliza en una reacción de amplificación de ácido nucleico con ADN genómico del evento de algodón MON 88913 produce un amplicón que es diagnóstico del evento de algodón MON 88913 (b) llevar a cabo una reacción de amplificación de ácido nucleico, produciendo de ese modo el amplicón; y (c) detectar el amplicón.

30 En conformidad con otro aspecto de la invención, se proporcionan procedimientos para detectar la presencia de ADN que corresponda específicamente al ADN del evento de algodón MON 88913 en una muestra. Dichos procedimientos comprenden: (a) poner en contacto la muestra que comprende ADN con una sonda de ADN que comprende la SEC ID N° 1 o SEC ID N° 2 que se hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con ADN genómico del evento de algodón MON 88913 y no se hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con un ADN de planta de algodón de control; (b) someter la muestra y sonda a condiciones de hibridación rigurosas; y (c) detectar la hibridación de la sonda respecto del ADN del evento de algodón MON 88913.

35 En conformidad con otro aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para determinar la zigocidad de la progenie del evento de algodón MON 88913 que comprende: (a) poner en contacto la muestra que comprende ADN de algodón con un conjunto de cebadores que comprende la SEC ID N° 21, SEC ID N° 22, SEC ID N° 23, SEC ID N° 24, y SEC ID N° 25 que cuando se utiliza en una reacción de amplificación de ácido nucleico con ADN genómico del evento de algodón MON 88913 produce un primer amplicón que es diagnóstico del evento de algodón MON 88913; y (b) llevar a cabo una reacción de amplificación de ácido nucleico, produciendo de ese modo el primer amplicón; y (c) y detectar el primer amplicón; y (d) poner en contacto la muestra que comprende ADN de algodón con dicho conjunto de cebadores que cuando se utiliza en una reacción de amplificación de ácido nucleico con ADN genómico de plantas de algodón produce un segundo amplicón que comprende el ADN de algodón genómico original homólogo a la región genómica de algodón de una inserción de transgén identificada como evento de algodón MON 88913; y (e) llevar a cabo una reacción de amplificación de ácido nucleico, produciendo de ese modo el segundo amplicón; y (f) y detectar el segundo amplicón; y (g) comparar el primer y el segundo amplicones en una muestra, indicando la presencia de ambos amplicones que la muestra es heterocigota para la inserción del transgén.

Un procedimiento para determinar la zigocidad que comprende poner en contacto una muestra de ADN de algodón con cebadores y sondas que comprenden la SEC ID N° 21, SEC ID N° 22, SEC ID N° 23, SEC ID N° 24, y SEC ID N° 25; utilizando una condición de PCR Taqman® de criterio de evaluación; y detectar los productos de amplificación.

50 Un procedimiento para combatir malezas en un cultivo o campo de evento de algodón MON 88913 que comprende la etapa de aplicar una cantidad herbicidamente efectiva de herbicida que contiene glifosato al campo del algodón MON 88913.

Lo anterior y otros aspectos de la invención serán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y dibujos anexos.

55 **Breve descripción de los dibujos**

Figura 1. Mapa de plásmidos de pMON51915.

Figura 2. Organización genómica de la inserción en el evento de algodón MON 88913.

Figura 3. Secuencia de unión al ADN 5' (SEC ID N° 1) y secuencia de unión al ADN 3' (SEC ID N° 2) de MON 88913.

5 Figur 4. Región de ADN genómica/transgén 5' de MON 88913 (SEC ID N° 3).

Figura 5. Región de ADN genómica/transgén 3' de MON 88913 (SEC ID N° 4).

Descripción detallada de las realizaciones preferentes

10 La presente invención se refiere a un evento de algodón MON 88913 tolerante al glifosato, a composiciones contenidas en el mismo, y al procedimiento para la detección de la región de inserción genómica/transgén en el evento de algodón MON 88913 y su progenie. Las siguientes definiciones y procedimientos se proporcionan para definir mejor la presente invención y para guiar a los expertos en la técnica en la práctica de la presente invención. a menos que se indique lo contrario, los términos y abreviaturas deben ser entendidos de acuerdo al uso habitual aquellos con experiencia común en la técnica relevante. Las definiciones de términos comunes en la biología molecular también pueden encontrarse en Rieger et al., Glossary of Genetics: Classical and Molecular, 5° edición, Springer-Verlag: Nueva York, 1991; y Lewin, Genes V, Oxford University Press: Nueva York, 1994. Se utiliza la nomenclatura para bases de ADN según lo expuesto en 37 CFR § 1.822.

15 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "algodón" significa *Gossypium hirsutum* e incluye todas las variedades de plantas que pueden cultivarse con algodón evento MON 88913. La planta de la presente invención es una planta de algodón, más concretamente la planta de algodón MON 88913.

20 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "que comprende" significa "incluyendo pero sin limitarse a".

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "cultivo" se refiere a las plantas cultivadas o partes de plantas, tal como se cultivan en un campo, parcela, fila, invernadero, planicie o recipiente.

25 "Glifosato" se refiere a la N-fosfoonometilglicina y sus sales. N-fosfoonometilglicina es un herbicida conocido que tiene actividad en un amplio espectro de especies de plantas. El glifosato es el ingrediente activo de Roundup®. (Monsanto Co.), un herbicida seguro con una vida media deseablemente corta en el medio ambiente. El glifosato es el ingrediente activo del herbicida Roundup® (Monsanto Co.). Los tratamientos con "herbicida glifosato" se refieren a tratamientos con el herbicida Roundup®, Roundup Ultra®, Roundup Pro® o cualquier otra formulación de herbicidas que contiene glifosato. Los ejemplos de formulaciones comerciales de glifosato son, sin restricción, los vendidos por la empresa Monsanto como herbicidas ROUNDUP®, ROUNDUP® ULTRA, ROUNDUP® ULTRAMAX, ROUNDUP® WEATHERMAX, ROUNDUP® CT, ROUNDUP® EXTRA, ROUNDUP® BIACTIVE, ROUNDUP® BIOFORCE, RODEO®, POLARISO, SPARK® y ACCORD, los cuales contienen glifosato como su sal de isopropilamonio; aquellos vendidos por la empresa Monsanto como herbicidas ROUNDUP® DRY y RIVAL®, que contienen glifosato como su sal de amonio; aquellos vendidos por la empresa Monsanto como ROUNDUP® GEOFORCE, que contiene glifosato como su sal de sodio; y aquel vendido por SyngentaCropProtection como herbicida TOUCHDOWN®, que contiene glifosato como su sal de trimetilsulfonio. Cuando se aplica a una superficie de la planta, el glifosato se mueve sistemáticamente a través de la planta. El glifosato es fitotóxico debido a su inhibición de la vía ácido siquímico, que proporciona un precursor para la síntesis de aminoácidos aromáticos. El glifosato inhibe la 5-enolpiruvil-3-fosfosiquimato enzimático sintasa (EPSPS) encontrada en las plantas. La tolerancia al glifosato puede lograrse mediante la expresión de variantes de EPSPS bacterianas y variantes de EPSPS de plantas que tienen menor afinidad para el glifosato y por lo tanto, mantienen su actividad catalítica en presencia de glifosato (Patentes Estadounidenses Núm. 5.633.435. 5.094.945. 4.535.060. and 6.040.497).

45 Un "evento" transgénico es producido por la transformación de una célula de planta con ADN heterólogo, por ejemplo, una construcción de ácido nucleico (pMON51915, Figura 1) que incluye un transgén de interés; regeneración de una población de plantas resultantes de la inserción del transgén en el genoma de la célula vegetal y la selección de una planta especial caracterizada por inserción en la ubicación de una genoma particular. El término "evento" se refiere a la planta transformante original y la progenie del transformante que incluyen el ADN heterólogo. El término "evento" también incluye la progenie producida por un exocruzamiento sexual entre el evento y otra planta en la que la progenie incluye el ADN heterólogo. Incluso después de repetido retrocruzamiento con un progenitor recurrente, el ADN insertado y ADN genómico flanqueante desde el evento principal transformado está presente en la progenie del cruzamiento en la misma ubicación cromosómica. El término "evento" también se refiere al ADN del transformante original que comprende el ADN insertado y la secuencia genómica flanqueante inmediatamente adyacente al ADN insertado, que se espera ser transferido a una progenie que recibe el ADN insertado, que incluye el transgén de interés como resultado de un cruzamiento sexual de una línea parental que incluye el ADN insertado (por ejemplo, el transformante original y progenie resultante de la autofertilización) y una línea parental que no contiene el ADN insertado.

Se sabe que la expresión de genes foráneos en las plantas es influenciada por su posición cromosómica, tal vez

debido a la estructura de la cromatina (por ejemplo, heterocromatina) o la proximidad de elementos de regulación transcripcional (por ejemplo, potenciadores) cerca del sitio de integración (Weising et al., Ann. Rev. 22:421 Genet-477, 1988). Por este motivo, a menudo es necesario detectar un gran número de eventos para identificar un evento que se caracteriza por la expresión óptima de un gen de interés introducido. Por ejemplo, se ha observado en las plantas y en otros organismos que puede haber una amplia variación en los niveles de expresión de un transgén introducido entre eventos. También puede haber diferencias en los patrones de expresión espaciales o temporales, por ejemplo, las diferencias en la expresión relativa de un transgén en diversos tejidos vegetales, que pueden no corresponder con los patrones esperados de elementos reguladores transcripcionales presentes en la construcción génica introducida. Por este motivo, es común producir cientos a miles de distintos eventos y seleccionar esos eventos en cuanto a un evento único que tiene los niveles de expresión deseados de transgén y patrones para fines comerciales. Un evento que tiene niveles o patrones deseados de expresión del transgén es útil para introgresar el transgén en otros orígenes genéticos por cruzamiento sexual utilizando procedimientos convencionales de mejoramiento. La progenie de dichos cruces mantiene las características de expresión del transgén del transformante original. Esta estrategia se utiliza para garantizar la expresión génica fiable en un número de variedades que se adaptan bien a las condiciones de cultivo locales y las demandas del mercado.

Una planta de algodón tolerante al glifosato puede ser cultivada primero cruzando sexualmente una primera planta de algodón parental, que consiste en una planta de algodón desarrollada a partir de la célula vegetal de algodón transgénico obtenida de la transformación con los casetes de expresión de la planta contenidos en pMON51915 y que tolera la aplicación del herbicida glifosato, con una segunda planta de algodón parental que carece de la tolerancia al herbicida glifosato, produciendo así una pluralidad de primeras plantas progenie; y, seleccionando después una primera planta progenie que es tolerante al herbicida glifosato; y autofertilizando la primera planta progenie, produciendo de ese modo una pluralidad de segundas plantas progenie; y, seleccionando después de las segundas plantas progenie una planta tolerante al herbicida glifosato. Estas etapas además pueden incluir el retrocruzamiento de la primera planta progenie tolerante a glifosato o la segunda planta progenie tolerante a glifosato con la segunda planta de algodón parental o una tercera planta de algodón parental, produciendo así una planta de algodón que tolera la aplicación del herbicida glifosato. En la presente invención, la planta de algodón transgénica también se define como el evento de algodón MON 88913 y puede ser denominada en la presente memoria como MON 88913.

También debe entenderse que dos plantas transgénicas diferentes también pueden cruzarse para producir descendencia que contenga dos genes exógenos, independientemente añadidos por segregación. La autofertilización de la progenie apropiada puede producir plantas que son homocigotas para ambos genes exógenos agregados. El retrocruzamiento con una planta parental y exocruzamiento con una planta no transgénica también se contemplan, tal como la propagación vegetativa. Las descripciones de otros procedimientos de reproducción que se utilizan comúnmente para cultivos y rasgos diferentes pueden encontrarse en una de las varias referencias, por ejemplo, Fehr, en *Breeding Methods for Cultivar Development*, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison WI (1987).

Una "sonda" es un ácido nucleico aislado al que se adjunta una marca convencional detectable o molécula informante, por ejemplo, un isótopo radiactivo, ligando, agente de quimioluminiscencia o enzima. Dicha sonda es complementaria a una hebra de un ácido nucleico diana, en el caso de la presente invención, a una hebra de ADN genómico de MON 88913 de una planta MON 88913 o de una muestra que incluye ADN MON 88913. Las sondas de acuerdo a la presente invención incluyen no sólo ácidos desoxirribonucleico o ribonucleicos sino también poliamidas y otros materiales de sonda que se unen específicamente a una secuencia de ADN diana y pueden utilizarse para detectar la presencia de ese destino de esa secuencia de ADN diana.

Los cebadores de ADN son ácidos polinucleicos aislados que están reasociados a una hebra de ADN complementaria diana por hibridación de ácidos nucleicos para formar un híbrido entre el cebador y la hebra de ADN diana después extendido a lo largo de la hebra de ADN diana por una polimerasa, por ejemplo, una polimerasa de ADN. Un par de cebadores de ADN o un conjunto de cebadores de ADN de la presente invención se refieren al menos a dos moléculas de cebadores de ADN útiles para la amplificación de una secuencia de ácidos nucleicos diana, por ejemplo, por la reacción en cadena de polimerasa (PCR) u otros procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos convencionales.

Las sondas y cebadores generalmente son 11 los polinucleótidos o más en longitud, a menudo 18 polinucleótidos o más, 24 polinucleótidos o más, o 30 polinucleótidos o más. Dichas sondas y cebadores son seleccionados para que tengan longitud suficiente para hibridarse específicamente a una secuencia diana en condiciones de hibridación rigurosas. Preferiblemente, las sondas y cebadores de acuerdo con la presente invención tienen similitud de secuencia completa con la secuencia diana, aunque las sondas que difieren de la secuencia diana que mantienen la capacidad de hibridarse a secuencias diana pueden diseñarse mediante procedimientos convencionales.

Los procedimientos para preparar y utilizar sondas y cebadores se describen, por ejemplo, *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*, 2nd ed., vol. 1-3, ed. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 (de aquí en adelante, "Sambrook et al., 1989"); *Current Protocols in Molecular Biology*, ed. Ausubel et al., Greene Publishing and Wiley-Interscience, Nueva York, 1992 (con actualizaciones periódicas) (de aquí en adelante, "Ausubel et al., 1992"); e Innis et al., *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press: San

Diego, 1990. Los pares de cebadores de ADN de PCR pueden obtenerse de una secuencia conocida, por ejemplo, mediante el uso de programas informáticos destinados a ese fin como Primer (versión 0.5.RTM. 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA).

Los cebadores y sondas basados en ADN genómico flanqueante y secuencias de inserción de transgén divulgados en la presente memoria pueden utilizarse para confirmar (y, si es necesario, para corregir) las secuencias de ADN divulgadas por procedimientos convencionales, por ejemplo, por aislamiento de ADN genómico de MON 88913, reclonación de las regiones genómica/transgén y secuenciación de tales moléculas de ADN.

Las sondas de ácido nucleico y cebadores de la presente invenciones hibridan en condiciones rigurosas a una molécula de ADN diana. Cualquier procedimiento convencional de hibridación de ácidos nucleicos o amplificación puede utilizarse para identificar la presencia de ADN de un evento transgénico en una muestra. Las moléculas de ácido polinucleico o fragmentos de las mismas son capaces de hibridarse específicamente a otras moléculas de ácido nucleico en determinadas circunstancias. Tal como se utiliza en la presente memoria, se dice que dos moléculas de ácido polinucleico son capaces de hibridarse específicamente entre sí, si las dos moléculas son capaces de formar una estructura de ácidos nucleicos de doble hebra antiparalela. Se dice que una molécula de ácido nucleico es el "complemento" de otra molécula de ácido nucleico si presenta complementariedad completa. Tal como se utiliza en la presente memoria, se dice que las moléculas exhiben "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 hibridarse entre sí con una estabilidad suficiente para permitirles seguir reasociadas entre sí en condiciones al menos convencionales de "baja rigurosidad". Del mismo modo, se dice que las moléculas son "complementarias" si pueden hibridarse entre sí con una estabilidad suficiente para permitirles seguir reasociadas entre sí en condiciones de "alta rigurosidad" convencionales. Las condiciones rigurosas convencionales son descritas por Sambrook et al., 1989 y por Haymes et al., en: *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, DC (1985). Las salidas de complementariedad completa por lo tanto, son permitidas, siempre y cuando estas salidas no excluyan completamente la capacidad de las moléculas de formar una estructura de doble hebra. Para que una molécula de ácido nucleico sirva como cebador o sonda sólo necesita ser suficientemente complementaria en secuencia para poder formar una estructura de doble hebra estable bajo las concentraciones de sal y disolventes particulares empleadas.

Tal como se utiliza en la presente memoria, una secuencia de ADN sustancialmente homóloga es la secuencia de una molécula de ADN que se hibridará específicamente a el complemento de una molécula de ADN diana con la que está siendo comparada en condiciones de alta rigurosidad. Las condiciones de rigurosidad adecuadas que promueven la hibridación de ADN, por ejemplo, 6.0 x citrato de sodio (SSC) cloruro de y sodio en aproximadamente 45°C, seguido de un lavado de 2. x SSC a 50°C, son conocidos por aquellos con experiencia en la técnica o se pueden encontrar en los *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Por ejemplo, la concentración de sal en la etapa de lavado puede seleccionarse de una baja rigurosidad de aproximadamente 2.0 x SSC a 50°C a una alta rigurosidad de aproximadamente 0.2 x SSC a 50°C. Además, puede aumentarse la temperatura en la etapa de lavado de condiciones de baja rigurosidad a temperatura ambiente, aproximadamente 22°C, a condiciones de alta rigurosidad de aproximadamente 65°C. Tanto la temperatura como la sal pueden ser variadas, o bien la temperatura o la concentración de sal pueden mantenerse constantes mientras se cambia la otra variable. En una realización preferida, un ácido polinucleico de la presente invención se hibridará específicamente a una o más de las moléculas de ácido nucleico expuestas en la SEC ID N° 3 o 4, o complementos de las mismas o fragmentos de cualquiera en condiciones moderadamente rigurosas, por ejemplo en aproximadamente 2.0 x SSC y aproximadamente 65°C. En una realización particularmente preferida, un ácido nucleico de la presente invención se hibridará específicamente a uno o más moléculas de ácidos nucleicos expuestas en la SEC ID N° 3 o 4 o complementos o fragmentos de cualquiera en condiciones de alta rigurosidad. En un aspecto de la presente invención, una molécula de ácido nucleico marcadora preferente de la presente invención tiene la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEC ID N° 1 o 2 o complementos de la misma o fragmentos de cualquiera. En otro aspecto de la presente invención, una molécula de ácido nucleico marcador preferido de la presente invención comparte una parte sustancial de su identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico expuesta en SEC ID N° 1 o SEC ID N° 2 o complemento de las mismas o fragmentos de cualquiera, en la que la identidad de secuencia está entre 80% y 100% o 90% y 100%. En otro aspecto de la presente invención, una molécula de ácido nucleico marcador preferente de la presente invención comparte entre 95% y 100% de la identidad de la secuencia expuesta en SEC ID N° 1 o SEC ID N° 2 o sus complementos o fragmentos de cualquiera. La SEC ID N° 1 o SEC ID N° 2 puede utilizarse como marcador en procedimientos de reproducción de planta para identificar la progenie de cruzamientos genéticos similares a los procedimientos descritos para el análisis el marcador de ADN de repetición de secuencia simple, en "ADN markers: Protocols, applications, and overviews: (1997) 173-185, Cregan, et al., eds., Wiley-Liss NY.

La hibridación de la sonda en la molécula de ADN diana puede ser detectada por cualquiera de los procedimientos conocidos para los expertos en la técnica, estos pueden incluir, pero no se limitan a, marcas fluorescentes, marcas radiactivas, marcas basadas en anticuerpos y marcas de quimioluminiscencia.

En cuanto a la amplificación de una secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, mediante PCR) utilizando un par de cebadores de amplificación particular, las "condiciones rigurosas" son las condiciones que permiten que el par de cebadores se hibride sólo a la secuencia de ácido nucleico diana a la que un cebador que tiene la secuencia natural

correspondiente (o su complemento) se uniría y preferentemente para producir un producto de amplificación único, el amplicón, en una reacción de amplificación térmica de ADN.

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

Tal como se utiliza en la presente memoria, "ADN amplificado" o "amplicón" se refiere al producto del procedimiento de amplificación de ácido polinucleico dirigido a una molécula de ácido polinucleico diana que forma parte de un molde de ácido polinucleico. Por ejemplo, para determinar si una planta de algodón resultante de un cruzamiento sexual contiene ADN genómico de evento transgénico de la planta del evento de algodón MON 88913 de la presente invención, ADN que se extrae de una muestra de tejido de planta de algodón puede ser sometido a un procedimiento de amplificación de ácido polinucleico utilizando un par de cebadores que incluye un cebador obtenido de la secuencia de ADN en el genoma de la planta MON 88913 adyacente al sitio de inserción del ADN heterólogo insertado (ADN de transgén), y un segundo cebador obtenido del ADN heterólogo insertado para producir un amplicón que es un diagnóstico de la presencia del ADN del evento MON 88913. El amplicón de diagnóstico tiene una longitud y tiene una secuencia de ADN que también es diagnóstico del evento. El amplicón puede variar en la longitud de la longitud combinada de los pares de cebadores más un par de bases de nucleótidos, preferentemente más aproximadamente cincuenta pares de bases de nucleótidos (pb), más preferentemente más alrededor de doscientos cincuenta pares de nucleótidos y aún más preferentemente más aproximadamente cuatrocientos cincuenta pares de bases de nucleótidos o más. Alternativamente, un par de cebadores puede obtenerse de la secuencia genómica en ambos lados del ADN heterólogo insertado para producir un amplicón que incluye la secuencia de polinucleótidos de inserción completa (por ejemplo, un cebador directo aislado de la porción genómica de la SEC ID N° 3 y un cebador inverso aislado de la porción genómica de la SEC ID N° 4 que amplifica una molécula de ADN que comprende los dos cassettes de expresión del fragmento de ADN pMON51915 que se insertó en el genoma MON 88913, donde la inserción comprende aproximadamente 8.512 pb de la inserción, Figura 2). Un miembro de un par de cebadores obtenido de la secuencia genómica vegetal puede estar situado a una distancia de la secuencia de ADN insertada, esta distancia puede oscilar entre un par de bases de nucleótidos hasta alrededor de veinte mil pares de bases de nucleótidos. El uso del término "amplicón" excluye específicamente dímeros de cebadores que pueden formarse en la reacción de amplificación térmica de ADN.

La amplificación de ácidos polinucleicos puede realizarse por cualquiera de los diversos procedimientos de amplificación de ácidos polinucleicos, conocidos en la técnica, incluyendo la reacción en cadena de polimerasa (PCR). Los procedimientos de amplificación son conocidos en el arte y se describen, entre otras cosas, en Las Patentes Estadounidenses Núm. 4.683.195 y 4.683.202 y en protocolos de PCR: A Guide to Methods and Applications, ed. Innis et al., Academic Press, San Diego, 1990. Se han desarrollado procedimientos de amplificación por PCR para amplificar hasta 22 kb (kilobase) de ADN genómico y hasta 42 kb de ADN bacteriófago (Cheng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5695-5699, 1994). Estos procedimientos, así como otros procedimientos conocidos en la técnica de amplificación de ADN pueden utilizarse en la práctica de la presente invención. La secuencia de la inserción de ADN heterólogo o secuencia de ADN genómico flanqueante de MON 88913 puede verificarse (y si es necesario corregirse) por la amplificación de tales moléculas de ADN de la semilla o plantas MON 88913 cultivadas a partir de la semilla depositada en ATCC con número de referencia PTA-4854, utilizando cebadores obtenidos de las secuencias proporcionadas en la presente memoria, seguido de la secuenciación del ADN estándar del amplicón de PCR o fragmentos de ADN clonados del mismo. Los kits de detección de ADN que se basan en procedimientos de amplificación de ADN contienen cebadores de ADN que amplifican específicamente un amplicón de diagnóstico. El kit puede proporcionar un procedimiento de detección en base a gel de agarosa, criterio de evaluación Taqman®, o cualquier número de procedimientos de detección del amplicón de diagnóstico que se conocen en la técnica. Un kit que contiene cebadores de ADN que son homólogos o complementarios a cualquier porción de la SEC ID N° 3 o SEC ID N° 4 es un objeto de la invención.

El amplicón producido por estos procedimientos puede detectarse por una pluralidad de técnicas. Uno de dichos procedimientos es el análisis genético Bit (Nikiforov, et al. Nucleic Acid Res. 22:4167-4175, 1994) donde se diseña un oligonucleótido de ADN que se superpone con la secuencia de ADN genómico flanqueante y la secuencia de ADN insertada. El oligonucleótido se encuentra inmovilizado en los pocillos de una placa de microtitulación. Tras el PCR de la región de interés (usando un cebador en la secuencia insertada y uno en la secuencia genómica flanqueante adyacente), un producto de PCR de hebra simple puede ser hibridado al oligonucleótido inmovilizado y servir como una plantilla para una reacción de extensión de base simple utilizando una polimerasa de ADN y trifosfatos de didesoxinucleótido marcados (ddNTPs) específicos para la esperada base siguiente. La lectura puede ser fluorescente o basarse en ELISA. Una señal indica la presencia de la secuencia genómica/transgén debido a la exitosa amplificación, hibridación y extensión de base simple.

Otro procedimiento es la técnica de Pirosecuenciación descrita por Winge (Innov. Pharma. Pharma. Tech. 00: 18-24, 2000). En este procedimiento se diseña un oligonucleótido que se superpone a la unión de ADN de inserción y ADN genómico adyacente. El oligonucleótido se hibrida al producto de PCR de hebra simple de la región de interés (un cebador en la secuencia insertada y uno en la secuencia genómica flanqueante) y se incuba en presencia de una polimerasa de ADN, ATP, sulfrilasa, luciferasa, apirasa, adenosina 5' fosfosulfato y luciferina. Se añaden trifosfatos de desoxinucleótidos (dNTP) en forma individual y la incorporación da como resultado una señal luminosa que se

mide. Una señal luminosa indica la presencia de la secuencia genómica/transgén debido al éxito de amplificación, hibridación y extensión simple o multi-base.

La polarización de fluorescencia según lo descrito por Chen, et al., (Genome Res. 9:492-498, 1999) es un procedimiento que puede utilizarse para detectar el amplicón de la presente invención. Mediante este procedimiento se diseña un oligonucleótido que se superpone con la unión de ADN insertado y flanqueante genómico. El oligonucleótido es hibrida al producto de PCR de hebra simple de la región de interés (un cebador en el ADN insertado y uno en la secuencia de ADN genómica flanqueante) y se incuba en presencia de una polimerasa de ADN y un ddNTP marcados fluorescentemente. La extensión de base simple resulta en la incorporación del ddNTP. La incorporación puede medirse como un cambio en la polarización mediante un Fluorímetro. Un cambio en la polarización indica la presencia de la secuencia genómica/transgén debido al éxito de amplificación, hibridación y extensión de base simple.

TaqMan® (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) se describe como un procedimiento de detección y cuantificación de la presencia de una secuencia de ADN y se entiende plenamente en las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Brevemente, se diseña una sonda de oligonucleótidos FRET que se superpone con la unión de ADN genómico flanqueante y de inserción. La sonda FRET y cebadores de PCR (un cebador en la secuencia de ADN de inserción y uno en la secuencia genómica flanqueante) se ciclan en presencia de una polimerasa termoestable y dNTP. La hibridación de la sonda de FRET resulta en la escisión y liberación del resto fluorescente lejos del resto de desactivación en la sonda de FRET. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia genómica/transgén debido al éxito de amplificación y la hibridación.

Las balizas moleculares se describieron para su uso en la detección de secuencias, como se describe en Tyangi, et al. (Nature Biotech. 14:303-308, 1996). Brevemente, se diseña una sonda de oligonucleótidos FRET que se superpone con la unión de ADN de inserción y genómico flanqueante. La estructura única de la sonda FRET da como resultado que la misma contiene la estructura secundaria que mantiene los restos fluorescentes y de desactivación en estrecha proximidad. La sonda de TRASTE y cebadores PCR (un cebador en la secuencia de ADN de inserción y uno en la secuencia genómica flanqueante) se ciclan en presencia de una polimerasa termoestable y dNTP. Tras el éxito de la amplificación por PCR, la hibridación de la sonda FRET a la secuencia diana da como resultado la eliminación de la estructura secundaria de la sonda y la separación espacial de los restos fluorescentes y de desactivación. Se produce una señal fluorescente. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia de inserción de transgén/flanqueante debido al éxito de amplificación y la hibridación.

Los kits de detección de ADN pueden desarrollarse utilizando las composiciones divulgadas en la presente memoria y los procedimientos bien conocidos en la técnica de detección de ADN. Los kits son útiles para la identificación d ADN del evento de algodón MON 88913 en una muestra y se puede aplicar a procedimientos para la reproducción de las plantas de algodón que contienen ADN MON 88913. Los kits contienen secuencias de ADN que son útiles como cebadores o sondas y que son homólogos o complementarios a cualquier porción de la SEC ID N° 3 o SEC ID N° 4 o a las secuencias de ADN homólogas o complementarias al ADN contenido en cualquiera de los elementos genéticos de transgén de pMON51915 que se han insertado en el ADN MON 88913 (Figura 2). Estas secuencias de ADN pueden utilizarse en procedimientos de amplificación de ADN (PCR) o como sondas en procedimientos de hibridación de ácidos polinucleicos, es decir., análisis Southern, análisis Northern. Los elementos genéticos de transgén contenidos en el ADN MON 88913 (Figura 2) incluyen un primer cassette de expresión que comprende el promotor de mosaico Figwort construido como un elemento promotor quimérico con el promotor alfa-1 (At.Efla) del factor de alargamiento de *Arabidopsis* (FMV35S/Efla, Patente Estadounidense 6.462.258, SEC ID N° 28) operativamente unido al líder translocacional 1-alfa de alargamiento de *Arabidopsis* e intrón (Número de referencia a Genbank X16430 según se describe en iN Axelos et al., Mol. Gen. Genet. 219: 106-112, 1989), operativamente unido al péptido de tránsito al cloroplasto de EPSPS de *Arabidopsis* (TS-At.EPSPS:CTP2, Klee et al., Mol. Gen. Genet. 210:47-442, 1987), operativamente unido a la 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) tolerante al glifosato de la cepa CP4 de la especie *Agrobacterium* (aroA: CP4, Patente Estadounidense 5.633.435), operativamente unido a la región de terminación 3' de ribulosa 1,5- bisfosfato carboxilasa E9 de guisante (T-Ps.RbcS2:E9, Coruzzi, et al., EMBO J. 3: 1671-1679, 1984), y un segundo cassette de expresión que comprende el promotor CaMV35S- Act8 que incluye el primer intrón del gen Act8 (SEC ID N° 29, Patente Estadounidense 6.462.258) operativamente conectado a un péptido de tránsito al cloroplasto de EPSPS de *Arabidopsis* (TS-At.EPSPS:CTP2), operativamente conectado a una 5-enol- piruvilsiquimato-3-fosfato sintasa tolerante al glifosato (EPSPS) de la cepa CP4 de la especie *Agrobacterium* (aroA: CP4, Patente Estadounidense 5.633.435), operativamente unido a la región de terminación 3' de ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa E9 de guisante. (FMV35S/Efla, Patente Estadounidense 6.462.258, SEC ID N°: 28), operativamente unido al líder translocacional 1-alfa de alargamiento de *Arabidopsis* e intrón (Número de referencia a Genbank X16430 según se describe en iN Axelos et al., Mol. Gen. Genet. 219: 106-112, 1989), operativamente unido al péptido de tránsito al cloroplasto de EPSPS de *Arabidopsis* (TS-At.EPSPS:CTP2, Klee et al., Mol. Gen. Genet. 210:47-442, 1987), operativamente unido a una 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato sintasa tolerante al glifosato (EPSPS) de la cepa CP4 de la especie *Agrobacterium* (aroA: CP4, Patente Estadounidense 5.633.435), operativamente unido a la región de terminación 3' para ribulosa 1,5- bisfosfato carboxilasa E9 de guisante (T- Ps.RbcS2:E9, Coruzzi, et al., EMBO J. 3: 1671-1679, 1984), y un segundo cassette de expresión que comprende el promotor CaMV35S- Act8 que incluye el primer intrón del gen Act8 (SEC ID N° 29, Patente Estadounidense 6.462.258) operativamente conectado a un péptido de tránsito al cloroplasto de EPSPS de *Arabidopsis* (TS-At.EPSPS:CTP2), operativamente conectado a una 5-enol-

piruvilsiquimato-3-fosfato sintasa tolerante al glifosato (EPSPS) de la cepa CP4 de la especie *Agrobacterium* (aroA: CP4, Patente Estadounidense 5.633.435), operativamente unido a la región de terminación 3' de ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa E9 de guisante.

Se incluyen los siguientes ejemplos para demostrar ejemplos de ciertas realizaciones preferentes de la invención.

5 Ejemplos

Ejemplo 1

El evento de algodón transgénico MON 88913 fue generado por una transformación mediada por *Agrobacterium* de células de algodón con un fragmento de ADN obtenido de pMON51915 (Figura 1). La construcción de transformación de la planta, pMON51915 se cruzó en *Agrobacterium* utilizando un procedimiento de cruzamiento triparental (Ditta et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 77:7347-7351, 1980). La transformación de células de algodón con transgenes puede realizarse mediante los procedimientos descritos, por ejemplo, en la Patente Estadounidense 5.004.863, Patente Estadounidense 5.159.135 y Patente Estadounidense 5.518.908. La transformación de algodón se realiza esencialmente como se describe en el documento WO/0036911 o según se describe en la Patente Estadounidense 5.846.797. Una modificación de estos procedimientos puede incluir, pero no se limita al siguiente ejemplo. 130 semillas Coker son esterilizadas en la superficie y se hacen germinar en la oscuridad. Los explantes de hipocotilo se cortan de las plantas de semillero germinadas en longitudes de alrededor de 1-1,5 centímetro. La cepa ABI de *Agrobacterium tumefaciens* transformada para contener pMON51915 se cultiva en caldo de Luria sin antibióticos durante 16 horas en 28°C, después se diluye hasta aproximadamente 2×10^8 bacterias/mililitro (ml). El explante de hipocotilo es sumergido en el inóculo *Agrobacterium* durante 2-5 minutos y después se cultiva durante aproximadamente 45 horas en MS + 1,9 mg/l KNO₃ + 3% glucosa (TRM), 30 explantes por placa, 24 C, en la oscuridad. Los explantes se transfieren a TRM que contiene 150 mg/l de cefotaxima y 300 EM de Glifosato durante cuatro períodos de cultivo, cada período durante aproximadamente seis semanas. Los callos embriogénicos se segregan a partir del explante primario al final de los 3° y 4° períodos de cultivo y se colocan en el mismo medio. Los callos embriogénicos se subcultivan una vez suspendiendo brevemente en líquido TRM + 3% de glucosa, seguido por el vertido de la suspensión en placas de 'TRM' + 150 mg/l de cefotaxima + 300 µM de glifosato. Los embriones somáticos son cosechados de 3 a 8 semanas después del subcultivo del líquido y, después son cultivados en los medios Stewart y Hsu con glucosa al 0,5%. Las plántulas obtenidas de los embriones somáticos se hacen madurar hasta alrededor de 4-7 cm (hojas de 3-6) en cajas Magenta con Stewart & Hsu modificado con 40 mM NO₃/10 mM NH₄ + 2% sacarosa. Estas plantas, a continuación, son trasplantadas a tierra de maceta, macetas de 4", 100% de humedad, 16 horas de luz por día, durante 4-6 días, seguido por el 50% de humedad 5 a 10 días.

El fragmento de ADN de pMON51915 contiene dos cassettes de expresión de transgén insertados en el genoma de MON 88913 (Figure 2) que conjuntamente confieren tolerancia al glifosato a MON 88913 y su progenie.

Las plantas y semillas MON 88913 tienen partes regenerables. Las partes regenerables de la semilla incluyen, pero no se limitan al embrión, el cotiledón y el meristema de raíz o brote. Las partes regenerables de la planta incluyen, pero no se limitan a las hojas, el pecíolo, el hipocotilo, secciones de tallo y meristemas de raíz y apical. La invención también incluye partes de plantas de evento de algodón MON 88913 que incluyen, pero no se limitan a polen, óvulo, flores, cápsulas, fibra, brotes, raíces y hojas. La invención también incluye componentes extraíbles de semilla MON 88913 que incluyen, pero no se limitan a la proteína, comida, harina, hollejos, aceite y pelusa.

Ejemplo 2

El evento de algodón MON 88913 tolerante al glifosato se seleccionó de muchos eventos de algodón transgénicos para la tolerancia a la lesión reproductiva y vegetativa del glifosato. La producción exitosa de un evento transgénico de calidad comercial actualmente requiere producir un gran número de eventos transgénicos. En la presente invención, MON 88913 fue un evento entre aproximadamente eventos 1000 R0 que se habían transformado con muchas construcciones de ADN diferentes que incluyen pMON51915. El evento MON 88913 se seleccionó de muchos eventos mediante una serie de análisis molecular y selecciones de tolerancia al glifosato.

Los eventos se seleccionaron en un ensayo de tolerancia al glifosato en invernadero, donde las plantas se clasificaron en cuanto a tolerancia reproductiva y vegetativa. Quince a veinticinco semillas R₁ de cada evento se plantaron en bandejas de células 15 con medio de crecimiento Metro Mix 350, que contiene una combinación de turba, vermiculita, nutrientes, agentes humectantes, y corteza y ceniza procesadas. Los fertilizantes adicionales incluidos en el medio fueron micronutrientes Osmocote 14-14-14, Osmocote Plus 15-9-12, y MicroMax. Todas las plantas se hicieron crecer en un invernadero. La temperatura de día promedio durante la temporada de crecimiento era 32 grados Celsius (°C), mientras que la temperatura de noche promedio era 24°C. El fotoperíodo se fijó en 16 horas de luz y ocho horas de oscuridad, con intensidad de luz máxima. La humedad relativa promedio durante el ciclo de crecimiento era 45 por ciento. Las plantas después se pulverizaron en las etapas de 4 y 8 hojas secuencialmente con 3,36 kg/ha (48 oz/A (oz=onzas, A=acre)) de Roundup Ultra® (herbicida que contiene glifosato). Siete días después de la aplicación de glifosato a la etapa de 4 hojas, las plantas se clasificaron en cuanto al daño vegetativo y se recolectó la segregación del fenotipo tolerante al glifosato. Estos datos se utilizaron para confirmar que la inserción del transgén del evento se llevó a cabo como un gen dominante simple, adhiriendo a los modelos

genéticos Mendelian. Los eventos de buena tolerancia vegetativa se transplantaron posteriormente en macetas de 25 cm (10 pulgadas) con el mismo medio de crecimiento Metro-Mix 350 descrito más arriba y se hicieron crecer hasta la madurez. Las plantas se trataron con Pix Plus (BASF, Research Triangle Park, N) según era necesario para regular la altura de la planta. A los tres meses posteriores a la plantación, las plantas se mapearon en cuanto a retención de cápsula en las primeras posiciones de fruta de las cinco primeras ramas de frutas. El valor máximo de retención para este mapeo de planta es 5 (cinco cápsulas retenidas). Esto proporcionó una medición indirecta, rápida de la fertilidad de la planta. Con esta selección de invernadero, la retención promedio para el evento comercial (algodón RR 1445) es menor que 1,0. Los eventos que tienen valores de retención de cápsula mayores que o iguales a dos tienen valor como nuevas selecciones de plantas tolerantes al glifosato.

Los eventos que cumplieron con los criterios de tolerancia reproductiva y vegetativa de Roundup® Ultra se analizaron por número de copia a través del análisis Southern blot. Los eventos de copia simple que mostraron tolerancia en los experimentos de invernadero iniciales además se caracterizaron en 1) ensayos de tolerancia de invernadero adicional en proporciones mayores de glifosato, 2) ensayos de campo replicados y con 3) selecciones moleculares adicionales. Los ensayos de tolerancia de invernadero se condujeron utilizando plantas homocigotos. Todos los experimentos contenían el evento de algodón 1445 de Roundup Ready® comercial actual (estándar comercial) para comparación. Las semillas se plantaron en 15 bandejas de células y se trataron con 4,48 kg/ha (64oz/A) de Roundup Ultra® en la etapa de 4 hojas y 6,72 kg/ha (96oz/A) en la etapa de 8 hojas. Las plantas después se transplantaron a macetas de 25 cm (10 pulgadas) y se mapearon cuatro plantas en la mitad de la temporada en las primeras posiciones de frutas de las primeras cinco ramas de frutas. También se recolectaron los datos del final de la temporada en todos los eventos e incluyen el peso de las semillas de algodón, número de cápsulas, tamaño de cápsula, y retención de cápsula.

Se utilizó el ensayo de campo para seleccionar el evento que mostró mejores porcentajes de crecimiento, retención de fruta, y rendimiento. Los ensayos de campo se dispusieron en un diseño de parcelas divididas aleatorizadas con tres réplicas y tres tratamientos. Los eventos se plantaron en dos filas, parcelas de 9,1 m (30 pies). Los tratamientos consistieron en, 4,48 kg/ha (64oz/A (1.5lb ae/A)) de Roundup Ultra® en las etapas de 4, 6, 10, 14 nodos, 6,72 kg/ha (96oz/A (2.25lb ae/A)) de Roundup Ultra® en las etapas de 4, 6, 10, 14 nodos sin pulverizar. Un mapeo de planta de media temporada se completo sobre diez plantas por maceta. Se recolectaron los datos de retención de cápsulas para las primeras y segundas posiciones de frutas de las primeras cinco ramas de frutas que proporciona una escala de valor de retención de cápsula de 0-10. Una planta con un valor de retención de cápsula igual a o mayor que 3 en la escala 0-10 tiene valor como nueva selección de planta tolerante al glifosato.

El ensayo de campo (10 ubicaciones) que compara el rendimiento de la fibra de algodón (libras/acre, lb/A) de MON 88913 y algodón RR 1445 mostró que MON 88913 proporcionó protección sustancial contra los efectos del glifosato (libras de ácido equivalente/acre, lb ae/A) en el rendimiento (Tabla 1). El rendimiento es una medición de la retención de cápsula, plantas de algodón manipuladas genéticamente para la tolerancia al glifosato que retienen un número sustancial de cápsulas en las primeras y segundas posiciones de frutas mantendrán una ventaja de rendimiento respecto de las plantas de algodón que no son tan tolerantes al glifosato. Una dosis efectiva de un herbicida que contiene glifosato para combatir las malezas en un campo de MON 88913 comprende aproximadamente 0,3 kg/ha (4 oz/A) y puede exceder 8,97 kg/ha (128 oz/A) dependiendo de la especie de maleza que deba ser combatida y la etapa de desarrollo de la maleza. El glifosato puede mezclarse con otros herbicidas para potenciar la actividad herbicida contra ciertas especies de maleza.

Tabla 1. Comparación del rendimiento de la fibra de MON 88913 y 1445 después del tratamiento con glifosato.

	Rendimiento (lb/A) de 10 lugares		
Tratamiento con glifosato	0 lb ae/A	1.5 lb ae/A	2.25 lb ae/A
1445	2421,84	1044,19	831,47
MON 88913	2551,58	2587,61	2412,3

Ejemplo 3

El ADN genómico de algodón para todas las reacciones de PCR y análisis Southern Blot se aisló utilizando un procedimiento CTAB (Rogers et al, Plant Mol. Biol. 5:69-76,1985) o Dneasy™ 96 Plant Kit (Cat. # 69181, Qiagen Inc., Valencia, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se recolectó tejido de hoja de plantas en la etapa de 2-4 hojas. Se recolectaron las hojas alineadas más pequeñas de cada planta y se congelaron inmediatamente en hielo seco. Se extrajo el ADN utilizando, por ejemplo, el siguiente procedimiento. El tejido se trituró utilizando cuentas de plástico con nitrógeno líquido. Se añadieron cinco ml de tampón de extracción a 0,75 gramos (g) de tejido y se incubaron a 55°C durante 45 minutos. El tampón de extracción CTAB consistía en 100mM Tris pH 8,0, 1,4M NaCl, 20mM EDTA, 2% CTAB con la adición de 5 µl (microlitros) de beta-mercaptoetanol, 5 µl de RNasa y 1% PVPP. Las muestras después se extrajeron con un volumen igual de cloroformo (5ml) y después se centrifugaron a 3700 RPM durante 15 minutos a temperatura ambiente. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo y el ADN se precipitó con

un volumen igual de isopropanol. Después de la centrifugación a 3700 RPM durante 15 minutos, los pélets se lavaron con etanol al 70%, se secaron con aire, ay se resuspendieron en 250µl de agua.

El ADN genómico de algodón adyacente a la inserción de transgén se obtuvo para el evento MON 88913 utilizando TAIL-PCR (Liu et al., Plant Journal 8: 457-463, 1995). La extensión del ADN genómico se condujo utilizando el kit GenomeWalker (CloneTech Laboratories, Palo Alto, CA) siguiendo el protocolo del fabricante. Brevemente, el ADN (~51g) se aisló utilizando el protocolo CTAB descrito previamente, se digirió con diversas endonucleasas de restricción (EcoRV, Scal) a 37° C durante toda la noche en un volumen total de 100 µl. Las endonucleasas de restricción se eliminaron con columnas de purificación por PCR QIAquick (cat #28104, Qiagen, Inc.). La ligación de las moléculas de adaptador fueron aquellas descritas en el protocolo del fabricante. El ADN se amplificó utilizando cebador FMV-1 (SEC ID N° 5) con el cebador AP1 (Clone Tech Laboratories) para la reacción primaria y el cebador FMV- 2 anidado (SEC ID N° 6) con el cebador AP2 (Clon eTech Laboratories) para la reacción secundaria.

El ADN genómico/transgén 3' de MON 88913 se aisló utilizando PCR inversa. El ADN genómico total (~10µg) se digirió con tres enzimas de restricción; *BclI*, *NcoI*, y *HindIII*. Las columnas de purificación por PCR QIAquick se utilizaron para purificar el ADN después de la digestión durante toda la noche a 37°C. El ADN se eluyó de las columnas con 50µl de agua y después se diluyeron hasta 1ml. El eluido diluido (85µl) se combinó con 10 µl de tampón (10X) y 5µl de T4 Ligasa para hacer circular los fragmentos. Después de la incubación durante toda la noche a 16°C, la ligasa se inactivó con calor a 70°C. Las muestras se amplificaron por PCR con una serie de cebadores anidados. Las combinaciones de cebadores para PCR incluyeron: par de cebadores 8099-E9-1/E9-2 (SEC ID N° 7/SEC ID N° 8) para muestras de *BclI* y *NcoI* y par de cebadores 8099-E9-1/Act8 rev (SEC ID N° 7/SEC ID N° 9) para la muestra *HindIII*; par de cebadores 8099-E9-2/E9-1 (SEC ID N° 10/SEC ID N° 11) para las muestras *BclI* y *NcoI*; par de cebadores 8099-E9-2/Act8 (SEC ID N° 10/SEC ID N° 12) para la muestra *HindIII*; par de cebadores 8099-E9-3/E9-1 (SEC ID N° 13/SEC ID N° 11) para las muestras *BclI* y *NcoI* y 8099-E9-3/Act8 (SEC ID N° 13/SEC ID N° 12) para la muestra *HindIII*. Las condiciones para PCR incluyeron: PCR primaria = 7 ciclos de 94°C durante 2 segundos, 72°C durante 10 minutos; 37 ciclos de 94°C durante 2 segundos, 67°C durante 10 minutos; 1 ciclo de 67°C durante 10 minutos; PCR secundaria y terciaria = 5 ciclos de 94°C durante 2 segundos, 72°C durante 10 minutos; 24 ciclos de 94°C durante 2 segundos, 67°C durante 10 minutos; 1 ciclo de 67°C durante 10 minutos.

Alternativamente, la amplificación de ADN por PCR del extremo 3' del evento MON 88913 puede realizarse con condiciones que incluyen: 7 ciclos de 94°C durante 25 segundos, 72°C durante 3 minutos; 37 ciclos de 94°C durante 25 segundos, 67°C durante 3 minutos; 1 ciclo de 67°C durante 7 minutos. Todas las amplificaciones posteriores se condujeron con las siguientes condiciones: 7 ciclos de 94°C durante 2 segundos, 72°C durante 4 minutos ; 37 ciclos de 94°C durante 2 segundos, 67°C durante 4 minutos; 1 ciclo de 67°C durante 7 minutos. Todos los amplicones se visualizaron en geles de agarosa al 0,8% teñidos con bromuro de etidio. El ADN se prepara para la secuenciación mediante la purificación de las muestras de PCR directamente con el kit de purificación por PCR QIAquick (cat# 28104, Qiagen Inc.) o mediante la extracción del fragmento apropiado del gel y utilizando el kit de extracción en gel QIAquick (cat #28704, Qiagen Inc.).

Se diseñó una serie de cebadores de ADN para secuenciar la inserción del transgén y las regiones genómicas flanqueantes adyacentes de MON 88913. Se diseñaron cebadores de ADN que permitieron la amplificación de las regiones genómicas y transgén completas mediante cinco fragmentos de superposición. Se diseñaron únicos cebadores para permitir la amplificación de cada región EPSPS CTP2/aroA-CP4/RbcS2:E9 en forma separada. Para todos los fragmentos utilizados en la secuenciación, se llevaron a cabo amplificaciones por triplicado. Las combinaciones de par de cebadores de ADN utilizadas como cebadores de secuenciación para la región genómica/transgén 5' (SEC ID N° 14 y SEC ID N° 15), región genómica/transgén 3' (SEC ID N° 16 y SEC ID N° 17) y elementos genéticos de inserción (SEC ID N° 18 y SEC ID N° 11; SEC ID N° 19 y SEC ID N° 15; SEC ID N° 20 y SEC ID N° 11). Se utilizó ADN genómico total para todas las reacciones por PCR. Todos los amplicones se visualizaron en geles de agarosa al 0,8% manchados con bromuro de etidio. El ADN se preparó para secuenciar mediante purificación de las muestras de PCR directamente con el kit de purificación por PCR QIAquick o extrayendo el fragmento apropiado del gel y utilizando el kit de extracción en gel QIAquick. Se produjo la secuencia de ADN utilizando el equipo de análisis de secuencia de ADN (ABI Prism™ 377, PE Biosystems, Foster City, CA) y software de análisis de secuencia ADNSTAR (ADNSTAR Inc., Madison, WI).

Los fragmentos de ADN de las regiones flanqueantes de inserción genómica/transgén de MON 88913 se subclonaron utilizando un kit TOPO TA Cloning® (Invitrogen). La secuencia de ADN de la región genómica/transgén 5' se muestra en la Figura 4 y la secuencia de ADN de la región genómica/transgén 3' se muestra en la Figura 5. En la secuencia de ADN que se muestra en las Figuras 4 y 5, la secuencia de inserción transgén está en cursiva.

Ejemplo 4

Los pares de cebadores del evento de ADN se utilizan para producir un amplicón de diagnóstico del genoma del evento de algodón MON 88913. Los amplicones de diagnóstico del genoma MON 88913 comprenden al menos una secuencia de unión, SEC ID N° 1 o SEC ID N° 2. Los pares de cebadores del evento que producirán un amplicón de diagnóstico para MON 88913, en el que los pares de cebadores incluyen, pero no se limitan a la SEC ID N° 14 y SEC ID N° 15 para la secuencia de amplicón 5', y SEC ID N° 16 y SEC ID N° 17 para el amplicón 3' cuando se utiliza en el protocolo detallado en la Tabla 2. Además de estos pares de cebadores, cualquier par de cebadores,

- homólogo o complementario a la SEC ID N° 3 o SEC ID N° 4, que en una reacción de amplificación de ADN produce un amplicón de diagnóstico del genoma MON 88913 es un aspecto de la presente invención. Cualquier molécula de cebador de polinucleótido de ADN aislado simple que comprende al menos 11 nucleótidos contiguos de la SEC ID N° 3, o su complemento que es útil en un procedimiento de amplificación de ADN para producir un amplicón de diagnóstico de MON 88913 es un aspecto de la invención. Cualquier molécula de cebador de polinucleótido de ADN aislado simple que comprende al menos 11 nucleótidos contiguos de la SEC ID N° 4, o su complemento que es útil en un procedimiento de amplificación de ADN para producir un amplicón de diagnóstico de MON 88913 es un aspecto de la invención. Un ejemplo de las condiciones de amplificación para este análisis se ilustra en la Tabla 2 y Tabla 3, sin embargo, cualquier modificación de estos procedimientos que utilizan cebadores de ADN homólogos o complementarios a la SEC ID N° 3 o SEC ID N° 4 o secuencias de ADN de los elementos genéticos contenidos en la inserción de transgén de MON 88913 que producen un amplicón de diagnóstico de MON 88913, está dentro de la experiencia común de la técnica. Un amplicón de diagnóstico comprende una molécula de ADN homóloga o complementaria a al menos un ADN de unión genómico/transgén (SEC ID N° 1 o SEC ID N° 2) o porción sustancial del mismo.
- Un análisis para la muestra de tejido vegetal del evento MON 88913 debe incluir un control de tejido positivo del evento MON 88913, un control negativo de una planta de algodón que no sea un evento MON 88913, y un control negativo que no contenga ningún ADN de algodón genómico. Las secuencias de cebadores adicionales pueden ser seleccionadas de la SEC ID N° 3 y SEC ID N° 4 por los expertos en la técnica de los procedimientos de amplificación de ADN, y las condiciones seleccionadas para la producción de un amplicón por los procedimientos que se muestran en la Tabla 2 y Tabla 3 pueden diferir, pero dan como resultado un amplicón de diagnóstico del evento MON 88913. El uso de estas secuencias de cebadores de ADN con modificaciones a los procedimientos de la Tabla 2 y 3 está dentro del alcance de la invención. El amplicón producido por al menos una secuencia de cebadores de ADN obtenida de la SEC ID N° 3 o SEC ID N° 4 que es diagnóstico de MON 88913 es un aspecto de la invención.
- Los kits de detección de ADN que contienen al menos un cebador de ADN obtenido de la SEC ID N° 3 o SEC ID N° 4 que cuando se utiliza en un procedimiento de amplificación de ADN produce un amplicón de diagnóstico para MON 88913 es un aspecto de la invención. El amplicón producido por al menos una secuencia de cebadores obtenida de cualquiera de los elementos genéticos de pMON51915 que es diagnóstica de MON 88913 es un aspecto de la invención. Una planta de algodón o semilla en la que su genoma producirá un amplicón que comprende la SEC ID N° 1 o SEC ID N° 2 cuando se ensa ya en un procedimiento de amplificación de ADN es un aspecto de la presente invención. El ensayo para el amplicón MON 88913 puede realizarse utilizando un Stratagene Robocycler, MJEngine, Perkin-Elmer 9700, o termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient según se muestra en la Tabla 3, o mediante los procedimientos y equipos conocidos por los expertos en la técnica.

Tabla 2. Procedimiento de PCR y condiciones de mezcla de reacción para la identificación de la región de unión genómica/inserción transgén 5' de MON 88913.

Etapa	Reactivo	Cantidad	Comentarios
1	agua libre de nucleasa	Añadir hasta volumen final de 20 µl	
2	10X tampón de reacción (con MgCl ₂)	2,0 µl	1X concentración final de tampón, 1,5 mM concentración final de MgCl ₂
3	10 mM solución de dATP, dCTP, dGTP, y dTTP	0,4 µl	200 µM concentración final de cada dNTP
4	Cebador del evento (SEC ID N° 14) (resuspendido en tampón TE 1X o agua libre de nucleasa hasta una concentración de 10 µM)	0,4 µl	0,2 µM concentración final
5	Cebador del evento (SEC ID N° 15) (resuspendido en tampón TE 1X o agua libre de nucleasa hasta una concentración de 10 µM)	0,4 µl	0,2 µM concentración final

6	RNasa, libre de NDasa (500 ng/μl)	0,1 μl	50 ng/reacción
7	REDTaq ADN polimerasa (1 unidad/μl)	1,0 μl (recomendado para cambiar pipetas antes del siguiente paso)	1 unidad/reacción
8	ADN extraído (molde): • Muestras a ser analizadas * hojas individuales * hojas agrupadas (máximo de 50 hojas/ agrupación) • Control negativo • Control negativo • Control positivo	 • 10-200 ng de ADN genómico • 200 ng de ADN genómico • 50 ng de AND genómico de algodón (no MON 88913) • ningún AND plantilla • 50 ng de ADN genómico MON 88913	
	Mezclar suavemente y añadir 1-2 gotas de aceite mineral en la parte superior de cada reacción.		

Continuar con la amplificación de ADN en un Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin- Elmer 9700, o termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient utilizando los siguientes parámetros de ciclación. El MJ Engine o termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient debe funcionar en el modo calculado. Hacer funcionar el

5

Tabla 3. Parámetros de PCR sugeridos para diferentes termocicladores.

Ciclo N°	Ajustes: Stratagene Robocycler
1	94°C 3 minutos
38	94°C 1 minuto 60°C 1 minuto
1	72°C 10 minutos
Ciclo N°	Ajustes: MJ Engine o Perkin-Elmer 9700
1	94°C 3 minutos
38	94°C 10 segundos 60°C 30 segundos
1	72°C 10 minutos
Ciclo N°	Ajustes: Eppendorf Mastercycler Gradient
1	94°C 3 minutos

38	94°C 15 segundos 60°C 15 segundos
1	72°C 10 minutos

Ejemplo 5

- El ADN genómico de MON 88913 y ADN de algodón genómico de control (~15µg de cada uno) se digiere con diversas enzimas de restricción (140U) en un volumen total de 150µl incluyendo 15µl del tampón del fabricante correspondiente (NEB, Beverly, MA). Se utilizan endonucleasas de restricción, por ejemplo, BglII, BamHI, NcoI, HindIII, y BclI, en el análisis Southern de MON 88913. Las digestiones de endonucleasa se llevan a cabo a la temperatura apropiada durante al menos 6 horas. Después de la incubación, el ADN se precipita con 3M acetato de sodio y 2,5 volúmenes de etanol. Posteriormente, el ADN se lava con etanol al 70%, se seca y se resuspende en 40 µl de TBE. Se añade el tampón de carga (0,2x) a las muestras y después se conduce la electroforesis en geles de agarosa (0,8%) durante 16-18 horas a 30 voltios. Los geles se tiñen con bromuro de etidio, después se tratan con una solución de depurinación (0,125N HCL) durante 10 minutos, con una solución desnaturalizante (0,5M hidróxido de sodio, 1,5 M cloruro de sodio) durante 30 minutos, y finalmente con una solución neutralizante (0,5M Trizma base, 1,5M cloruro de sodio) durante 30 minutos. El ADN se transfiere a membrana Hybond-N (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Inglaterra) utilizando un Turboblotter (Schleicher y Schuell, Dassel, Alemania) durante 4-6 horas y después se fija a la membrana utilizando una luz UV.
- Las membranas son prehibridadas con 20 ml de solución DIG Easy Hyb (Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis, IN; cat. #1603558) durante 2-4 horas a 45°C. Las sondas de ADN radioactivas Radioactive (³²P dCTP) homólogas o complementarias a la SEC ID N° 1, o SEC ID N° 2, o SEC ID N° 3, o SEC ID N° 4, o una porción de las mismas se preparan utilizando un kit de marcado de ADN Radprime (Invitrogen, Carlsbad, CA; cat. #18428-011). Los nucleótidos no incorporados son eliminados utilizando columnas sephadex G-50 (Invitrogen). La solución de prehibridación se reemplaza con 10 ml de solución DIG Easy Hyb precalentada que contiene la sonda desnaturalizada hasta una concentración final de 1 millón de recuentos por ml. Las bandas de transferencia se hibridan a 45°C durante 16-18 horas.
- Las bandas de transferencia se lavan con una solución de baja rigurosidad (5X SSC, 0,1X SDS) a 45°C y después se lava repetidamente con una solución de alta rigurosidad (0,1X SSC, 0,1% SDS) a 65°C. Las bandas de transferencia se exponen a una selección con fósforo (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) durante >2 horas y la exposición se lee utilizando una máquina Data Storm 860 (Amersham Bio sciences).

Ejemplo 6

- Los procedimientos utilizados para identificar la progenie de algodón que contiene el evento MON 88913 heterocigota de la homocigota se describen en un ensayo de zigosidad para el que los ejemplos de las condiciones se describen en la Tabla 4 y Tabla 5. Los cebadores de ADN utilizados en el ensayo de zigosidad son cebador SQ1099 (SEC ID N° 21), SQ1100 (SEC ID N° 22), SQ1353 (SEC ID N° 23), cebador marcado 6FAM[™] (SEC ID N° 24,), y cebador marcado VIC[™] (SEC ID N° 25), 6FAM y VIC son productos de tintura fluorescente de Applied Biosystems (Foster City, CA) unidos al cebador de ADN.
- Las SEC ID N° 21, SEC ID N° 22 y SEC ID N° 23 cuando se utilizan en estos procedimientos de reacción producen un amplicón de ADN para el algodón no transgénico, dos amplicones de ADN para algodón heterocigota que contiene el evento MON 88913, y un amplicón de ADN para algodón homocigota MON 88913 que es distinto de cualquier otro algodón no MON 88913. Los controles para este análisis deben incluir un control positivo del algodón homocigota y heterocigota que contiene el ADN del evento MON 88913, un control negativo de algodón no transgénico, y un control negativo que no contiene ningún ADN molde. Este ensayo se optimiza para el uso con un Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700, o termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient. Otros procedimientos y equipos conocidos por los expertos en la técnica que producen amplicones que identifican la zigosidad de la progenie de los cruzamientos realizados con plantas de algodón MON 88913 están dentro de la experiencia de la técnica.

Tabla 4. Soluciones de reacción de ensayo de zigosidad

Etapas	Reactivo	Cantidad	Comentarios
1	agua libre de nucleasa	Añadir hasta 10 µl de volumen final	-
2	Universal Master Mix 2X (Applied Biosystems cat. # 4304437)	5 µl	concentración final 1 X

3	Cebadores SQ1099, SQ1100, SQ1353 (resuspendidos en agua libre de nucleasa hasta una concentración de 20 µM)	0,5 µl	concentración final 0,25 µM
4	Cebador 6FAM™ (resuspendido en agua libre de nucleasa hasta una concentración de 10 µM)	0,2 µl	concentración final 0,4 µM
5	Cebador VIC™ (resuspendido en agua libre de nucleasa hasta una concentración de 10 µM)	0,2 µl	concentración final 0,15 µM
6	REDTaq ADN polimerasa (1 unidad/µl)	1,0 µl (recomendado para cambiar pipetas antes de la siguiente etapa)	1 unidad/reacción
7	ADN extraído (molde): • Muestras a ser analizadas (hojas individuales) • Control negativo • Control negativo • Control positivo • Control positivo	3,0 µl • 4-80 ng de ADN genómico • 4 ng de ADN genómico de algodón no transgénico • Molde no ADN (solución en la que el ADN se resuspendió) • 4 ng de ADN genómico de algodón heterocigota del evento MON 88913 conocido • 4 ng de ADN genómico de algodón homocigota del evento MON 88913 conocido	Diluido en agua
8	Mezclar suavemente, añadir 1-2 gotas de aceite mineral en la parte superior de cada reacción.		

Continuar con la amplificación de ADN en un Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin- Elmer 9700, o termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient utilizando los siguientes parámetros de ciclación. Al hacer funcionar el PCR en Eppendorf Mastercycler Gradient o MJ Engine, el termociclador debe hacerse funcionar en el modo calculado. Al hacer funcionar PCR en Perkin-Elmer 9700, hacer funcionar el termociclador con la velocidad de rampa fijada al máximo.

Tabla 5. Condiciones del termociclador del ensayo de zigosis

Ciclo N°	Ajustes: Stratagene Robocycler
1	94°C 3 minutos
38	94°C 1 minuto 60°C 1 minuto
1	72°C 10 minutos
Ciclo N°	Ajustes: MJ Engine o Perkin-Elmer 9700
1	94°C 3 minutos

38	94°C 30 segundos 60°C 30 segundos
1	72°C 10 minutos
Ciclo N°	Ajustes: Eppendorf Mastercycler Gradient
1	94°C 3 minutos
38	94°C 15 segundos 60°C 15 segundos
1	72°C 10 minutos

Ejemplo 7

El análisis de las muestras de ADN de algodón genómico se condujeron utilizando un procedimiento de criterio de evaluación Taqman®. La producción de amplicones diagnóstico de ADN genómico MON 88913 se produjeron utilizando un conjunto de cebadores A que incluía los cebadores del evento: SEC ID N° 21, SEC ID N° 22, y sonda 6-FAM SEC ID N° 24; y un conjunto de cebadores B que incluía los cebadores del evento: SEC ID N° 26, SEC ID N° 27, y sonda 6-FAM SEC ID N° 28. El procedimiento utiliza un formato de 96 pocillos o 384 pocillos y un Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700 o MJ Research ADN Engine PT-225. El ADN extraído de las muestras de tejido de algodón tal como se describe previamente debe estar dentro del intervalo de 5-10 ng por reacción de PCR. Cada reacción contiene un volumen final de 10µl que consiste en 0,5µl de concentración igual de los cebadores del evento (20µM), 5,0µl de 2X universal master mix, 0,2 µl de la sonda 6-FAM (10 µM), 3µl de la muestra de ADN (5-10 ng) y agua hasta 10 µl. los parámetros del ciclador térmico son 1 ciclo 50°C durante 2 minutos, 1 ciclo 95°C durante 10 minutos, 10 ciclos a 95°C durante 15 segundos, 64°C durante 1 minuto después -1°C/ciclo, 30 ciclos 95°C durante 15 segundos, 54°C durante 1 minuto, después se mantiene a 10°C. La producción de amplicón se determinó mediante un lector de microplaca, por ejemplo, un TECAN Safire (Durham, NC) utilizando las condiciones descritas por el fabricante. Se utilizó un programa de análisis de datos (TaqPro™) para registrar la producción del amplicón marcado. Otro equipo y procedimientos de análisis conocidos en la técnica de detección de ADN pueden utilizarse para detectar los amplicones de la presente invención.

Se ha hecho un depósito de semilla de algodón MON 88913 de Monsanto Technology LLC, divulgada mas arriba y mencionada en las reivindicaciones, conforme al Tratado de Budapest en la Colección Norteamericana de Cultivos Tipo (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110. El número de referencia ATCC es PTA- 4854. El depósito se mantendrá en el depositario durante un período de 30 años, o 5 años después del último pedido, o durante la vida efectiva de la patente, lo que lleve más tiempo, y será reemplazada según sea necesario durante ese período.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Cerny, Eric

Duong, Can

Hart, Jesse

Huber, Scott

Krieb, Rachel

Listello, Jennifer

Martens, Amy

Sammons, Bernard

<120> Evento de algodón MON 88913 y Composiciones y Procedimientos para su Detección

<130> 11899.0239.00PC00 (MOBT:239P)

<150> 60/447,184 <151> 12-02-2003

<160> 28

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 20

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ADN quimérico de ADN genómico de algodón y ADN de inserción de transgén

10

<400> 1

attcaatgta gtcaaacact 20

<210> 2

15 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> ADN quimérico de ADN genómico de algodón y ADN de inserción de transgén

<400> 2

ttgaatatat attacaaagc 20

25 <210> 3

<211> 2880

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

30

<220>

<223> ADN quimérico de ADN genómico de algodón y ADN de inserción de transgén

<400> 3

ES 2 382 804 T3

```
gcttgggtacc gagctcggat ccactagtaa cggccgccag tgtgctggaa ttcgcccttt      60
tttactacga tgttaagtcc tattttacac agtttcttta agacagattt gaccgctcct      120
acgatacttg gagaaacggt ggtcgaatgt ctcttagaat acaacaacac gatgatcaaa      180
```

ES 2 382 804 T3

gcagtagcac	ctctgtagtg	attaacgaac	aagcgttgtc	tttttctatc	acccaaaacat	240
tggaaaacat	ggagaggaaa	agagtagaat	tttggaaaga	aaataatctt	ggtatgagag	300
agtgagattg	agcaaaaaat	tttgaagagg	tcttagcctt	ttatatgcgt	tcaaagtgga	360
ggaattttgg	aaatatccat	gtataatgag	acaaaatctg	cattttaa	aatggcatttcgc	420
gtcgccctgcg	tcgtgcgagt	gcgccccaac	cctgacgggt	ttggacttac	accctcat	480
acgcgaggca	ggattccaag	tttagtcatt	caatcactct	taaagtgagc	ttcaagctta	540
gacattacaa	attaaattaa	ataatataag	ataattgcgc	taaataaaca	aacat	600
ttgtgatcct	gaacgtaatc	aacgagggta	tgatggttat	gattcacgga	aagagcgaga	660
gaagagaacc	gtcgctcgaa	gaggatgatg	attcatccta	ttcatgcacg	actgtccaac	720
tccccacca	atcaaatcc	aaattatgac	atgagaagaa	catcatcca	cgtgggtctgt	780
gcttcacgcc	accatgtccc	acgtgggctc	cattttgggtg	gggcccttcc	ccaccgccca	840
agctgatccc	gggttggccca	tccctacttt	taattatcag	agccacctcc	ccaatctgca	900
aaacgacgga	aatggaaaac	tataat	tttttttca	acgtacttat	aaaat	960
tcaaaaaagt	atgaataaaa	ttgtgatatt	gcttggccta	agaggccaat	cttttgcaaa	1020
tctcgaagtc	gggaggcaca	ataaaaactt	ggaaagt	ttcaagtgtc	tgctttataa	1080
aattattgaa	atgcatgtat	tcgtacttgc	cttattt	tatcagacaattta	acattattat	1140
ttcatgaaaa	tgctctcca	cogatttcaa	tgacaaaacc	aataattact	actttttatt	1200
ttcaattatg	tcacggttca	catgtttatt	agggtttagg	ttgaggttaa	aactttcgac	1260
tctctattcg	taacgcttaa	agatgtaggg	tttaggttga	ggttaaaaca	atcatgtaat	1320
gtaaggatac	ctgaaaagct	gtcatttagtg	taagtgttta	ttactagggt	tgtttaaat	1380
catgttgatg	tcaagcttgg	ataaccatt	ttactaaaaa	aataaatgaa	gtcccaaagg	1440
gcattgggca	tcctatcaaa	gatgggaaat	tttttcaaaa	ttttaacct	aaaaagagg	1500
ggaaagtctt	agtccaaata	atcagccaca	tcagaatttg	attcgtttct	ttcaagcaaa	1560
ttataacctat	tggtctgcaat	atctttaagt	ggaatggctg	gccaaacttt	tccatattcag	1620
cttgattcat	ctctaaactt	gattattctt	ttttattaat	attaaattcc	acaacttgaa	1680
ctttaat	tttaattaat	taaaaaaatt	gtcacctttt	caagctgaaa	aagaaaaaga	1740
aaccttaatt	attatcacta	gtattaaatt	tcaaaacttg	atttgccta	aatttgaaaa	1800
ggggtctcct	tcaattcata	tatgtagtca	tgaagattat	aacttagctg	aaaatggcct	1860
ccattatttg	gcttattcaa	tcaaaagttt	acaaaactag	tgcaaat	ttatgataat	1920
gtctacaaga	accaaatacg	aattgagtaa	at	tttttttgg	ctaaaataaa	1980

ES 2 382 804 T3

```

atgaattatc attttaaaaa gttcttttta accatttctt ttactgaatt aaaaaaagggt 2040
tttattaatc atatatatta caaattaccc attaagtagc caaattacaa attttaattc 2100
aatgtagtca aacactgata gtttaaacat gactctctta aggtagccaa agcccgggct 2160
taattaaggc gcgccggcca agtcggcgcc gcccgcgta tcaagcttct gcaggctctg 2220
ctcgagtgga agctaattct cagtccaaag cctcaacaag gtcagggtac agagtctcca 2280
aaccattagc caaaagctac aggagatcaa tgaagaatct tcaatcaaag taaactactg 2340
ttccagcaca tgcacatgag tcagtaagtt tcagaaaaag acatccaccg aagacttaaa 2400
gttagtgggc atctttgaaa gtaatcttgt caacatcgag cagctggctt gtggggacca 2460
gacaaaaaag gaatggtgca gaattgtag gcgcacctac caaaagcatc ttgacctta 2520
ttgcaaagat aaagcagatt cctctagtag aagtggggaa caaaataacg tggaaaagag 2580
ctgtcctgac agcccactca ctaatgcgta tgacgaacgc agtgacgacc acaaaagaat 2640
tagcttgagc tcaggattta gcagcattcc agattgggtt caatcaacaa ggtacgagcc 2700
atatcacttt attcaaattg gtatcgccaa aaccaagaag gaactcccat cctcaaagggt 2760
ttgtaaggaa gaattcgata tcaagcttga tatcggaagt ttctctcttg agggaggttg 2820
ctcgtggaat gggacacata tggttgttat aataaaccat ttccattgtc atgagatttt 2880

```

<210> 4

<211> 1675

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ADN quimérico de ADN genómico de algodón y ADN de inserción de transgén

10 <400> 4

ES 2 382 804 T3

tgaccgaagt taatatgagg agtaaaacac ttgtagttgt accattatgc ttattcacta	60
ggcaacaaat atattttcag acctagaaaa gctgcaaatg ttactgaata caagtatgtc	120
ctcttggtgt ttagacattt atgaactttc ctttatgtaa ttttcagaa tccttgtcag	180
attctaataca ttgctttata attatagtta tactcatgga tttgtagttg agtatgaaaa	240
tatttttttaa tgcattttat gacttgccaa ttgattgaca acatgcatca atcgacctgc	300
agccactcga gtggaggcct catctaagcc cccatttgga cgtgaatgta gacacgtcga	360
aataaagatt tccgaattag aataatttgt ttattgcttt cgcctataaa tacgacggat	420
cgtaatttgt cgttttatca aaatgtactt tcattttata ataacgctgc ggacatctac	480
atttttgaat tgaaaaaaaa ttggttaatta ctctttcttt ttctccatat tgaccatcat	540
actcattgct gatccatgta gatttcccgg acatgaagcc atttacaatt gaatatatat	600
tacaaagcta ttgcttata acatatgcga aaaattttgt actataatca ggggtaaatt	660

ES 2 382 804 T3

taggaggggg	ctttagggtc	tgccttctct	taaaatgaaa	aattttctat	ttagttat	720
aaaatttttaa	aagtaaaaata	taaaaatttc	atttaatcct	ttaaaaatta	taaagatata	780
gactattaaa	atgatgaaat	tacaatttta	ttatcataaa	aattataaatt	taatttcgac	840
ccctaacaaa	attttctgat	tttgccccta	actgtaatat	ttgtataaaa	acattttctt	900
tttgcattha	atgatttctt	taattcagtc	caagaaagaa	atttattaat	tgcatatgcg	960
aaagttagtc	cttgccctagt	gatattaaag	gaaagaaaca	taaaatcaat	aaattaat	1020
ttaaagcaaa	tagtaaaaat	aaggaaaaac	tttctacgat	agtctataat	tcaaaaaaag	1080
aaataataat	ctttaaccat	tgaattttta	aataacatca	gaataatcta	tttatttaat	1140
ttaataaata	ataataacat	atatattaat	attaaaattt	ttattgagct	tagtgtcaca	1200
aatcaataaa	aaatttctta	caaaataaat	tatattat	tgagggtgtt	ttattat	1260
atatatttta	tacagacata	tagaaatata	aatacacata	ataaaatttg	aatccaaatt	1320
tttaattttt	aacatttata	atttactatt	caaccaa	atttattatt	atttatatca	1380
aatttttata	aatatattta	tcagataatg	cgattttttt	tacctatata	tagatgacat	1440
aatctacttt	aaattaagtc	ctaaaaataa	tatatcat	caaaaaaatt	cttaaaatga	1500
atctgataat	acttaacccc	ttttataaaa	caatcttaac	ccottatata	ttttaatatt	1560
aatatcatta	taaatataaa	tctattgagc	atatgtttta	aaccaagtaa	tgttgagtgc	1620
ggtagtaaaa	ctcattacac	attttaagta	gaacgtagtt	cgaaccttg	agaag	1675

<210> 5

<211> 29

<212> ADN

5 <213> Virus mosaico Figwort

<400> 5

ccactaactt taagtcttcg gtggatgtc 29

10 <210> 6

<211> 28

<212> ADN

<213> Virus mosaico Figwort

15 <400> 6

ctgaaactta ctgaccatga tgcattgtg 28

<210> 7
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Pisum sativum
 5
 <400> 7
 catttggacg tgaatgtaca cacgtc 26

 <210> 8
 10 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Pisum sativum

 <400> 8
 15 gttgtcgaaa ccgatgatac g 21

 <210> 9
 <211> 27
 <212> ADN
 20 <213> Arabidopsis thaliana

 <400> 9
 tctgcaatca aaaacataaa gatctga 27

 25 <210> 10
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Pisum sativum

 30 <400> 10
 cctataaata cgacggatcg taattgtcg 30

 <210> 11
 <211> 21
 35 <212> ADN
 <213> Pisum sativum

<400> 11

accgatgata cgaacgaaag c 21

<210> 12

5 <211> 25

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 12

10 aatcgtaatc gagatccaac acaag 25

<210> 13

<211> 31

<212> ADN

15 <213> Pisum sativum

<400> 13

ccatattgac catcatactc attgctgac c 31

20 <210> 14

<211> 27

<212> ADN

<213> Agrobacterium tumefaciens

25 <400> 14

tttactacg atgttaagtc ctathtt 27

<210> 15

<211> 21

30 <212> ADN

<213> Agrobacterium tumefaciens

<400> 15

gaccagagga cttacgagca g 21

35

<210> 16

<211> 24

<212> ADN

<213> Agrobacterium tumefaciens

<400> 16

5 gattccgaat tcaagctca tggg 24

<210> 17

<211> 27

<212> ADN

10 <213> Agrobacterium tumefaciens

<400> 17

ctaagatcga actctccgac actaagg 27

15 <210> 18

<211> 33

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

20 <400> 18

gtctactgtt ttattgatt caatattga ttg 33

<210> 19

<211> 22

25 <212> ADN

<213> Agrobacterium tumefaciens

<400> 19

gcagctgtcg ctaccacct cg 22

30

<210> 20

<211> 25

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

35

<400> 20

ggttttctcg atcaagattc agatc 25

<210> 21
 <211> 29
 <212> ADN
 5 <213> Gossypium hirsutum

 <400> 21
 aattacccat taagtagcca aattacaaa 29

 10 <210> 22
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Virus mosaico Figwort

 15 <400> 22
 gggctttggc taccttaaga gagt 24

 <210> 23
 <211> 27
 20 <212> ADN
 <213> Gossypium hirsutum

 <400> 23
 cgcataatgtt ataagcaaat agctttg 27
 25
 <210> 24
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> sonda de ADN por PCR marcada

 <400> 24
 35 caatgtagtc aaacact 17

 <210> 25

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> sonda de ADN por PCR marcada

<400> 25

aggtgacata tagggaatat 20

10

<210> 26

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> Cebador de ADN para PCR

<400> 26

20 ggacatgaag ccattacaa ttga 24

<210> 27

<211> 23

<212> ADN

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador de ADN para PCR

30 <400> 27

cctacaagcc ccctcctaaa ttt 23

<210> 28

<211> 23

35 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

ES 2 382 804 T3

<220>

<223> Sonda de ADN para PCR

<400> 28

5 agctatttgc ttataacata tgc 23

REIVINDICACIONES

1. Una planta de algodón tolerante al glifosato, o partes de la misma, o una semilla de la misma, el genoma de la cual comprende
 - (i) una inserción de ADN que comprende un primer cassette de expresión que comprende un promotor 1-alfa del factor de alargamiento del virus-*Arabidopsis* del mosaico Figwort quimérico (FMV35S/Eflα), operativamente unido al líder de la traducción 1-alfa de alargamiento de *Arabidopsis* e intrón, operativamente unido al péptido de tránsito al cloroplasto 5-enol-piruvilsiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) de *Arabidopsis*, operativamente unido a un EPSPS tolerante al glifosato de la cepa CP4 de la especie *Agrobacterium*, operativamente unido a la región de terminación 3' de ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa E9 de guisante, y un segundo cassette de expresión que comprende el promotor CaMV35S-Act8 incluyendo el primer intrón del gen Act8, operativamente conectado a un péptido de tránsito al cloroplasto de EPSPS de *Arabidopsis*, operativamente conectado a un EPSPS tolerante al glifosato de la cepa CP4 de la especie *Agrobacterium*, operativamente unido a la región de terminación 3' de ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa E9 de guisante, y
 - una o más secuencias de unión de genómica/transgén seleccionadas de la SEC ID N° 1, SEC ID N° 2, SEC ID N° 3 y SEC ID N° 4 cubriendo el sitio de inserción que comprende la inserción de ADN en el genoma de algodón, y
 - (ii) siendo la planta de algodón tolerante al glifosato, o partes de la misma o una semilla de la misma la progenie de la planta de algodón cultivada a partir de semillas del evento de algodón MON88913 según lo depositado en la Colección Norteamericana de Cultivos Tipo (ATCC) con Núm. de referencia PTA-4854.
2. La planta de algodón tolerante al glifosato, o parte de la misma, o semilla de la misma de la reivindicación 1, en la que dicha inserción de ADN tiene uniones 5' y 3' con el ADN genómico de algodón que están compuestas por la SEC ID N° 1 y SEC ID N° 2, respectivamente.
3. La planta de algodón tolerante al glifosato, o parte de la misma de la reivindicación 2, en la que las uniones 5' y 3' de dicha inserción de ADN con el ADN genómico de algodón están además compuestas por la SEC ID N° 3 y SEC ID N° 4, respectivamente.
4. La parte tolerante al glifosato de una planta de algodón de la reivindicación 1, seleccionándose la parte de planta de polen, óvulos, flores, cápsulas, fibra, brotes, raíces y hojas.
5. La planta de algodón tolerante al glifosato, o parte de la misma, de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el ADN genómico de dicha planta de algodón, o parte de la misma, es capaz de producir al menos un amplicón que comprende la SEC ID N° 1 o SEC ID N° 2 diagnóstico de la inserción de ADN utilizando cebadores que tienen las secuencias de SEC ID N° 21, SEC ID N° 22 y SEC ID N° 23 en un procedimiento de amplificación de ADN.
6. Una planta de algodón progenie tolerante al glifosato de la planta de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, comprendiendo el genoma de la planta progenie una inserción de ADN y secuencias de unión genómicas/transgén según lo definido en las reivindicaciones 1 a 3.
7. Un conjunto de cebadores de ADN que comprende dos moléculas de ADN, en el que
 - (i) la primera molécula de ADN comprende al menos 11 o más nucleótidos contiguos de cualquier porción de la región del transgén de la molécula de ADN de la SEC ID N° 3 o su complemento, y la segunda molécula de ADN de longitud similar comprende cualquier porción de la región de ADN genómico de algodón flanqueante 5' comprendida dentro de la SEC ID N° 3 o su complemento, en la que la primera y segunda moléculas de ADN se reasocian a hebras opuestas de la SEC ID N° 3 y en la que los extremos 3' de la primera y segunda moléculas de ADN están orientadas una hacia la otra; o
 - (ii) la primera molécula de ADN comprende al menos 11 o más nucleótidos contiguos de cualquier porción de la región del transgén de la molécula de ADN de la SEC ID N° 4, o su complemento, y la segunda molécula de ADN de longitud similar comprende cualquier porción de la región de ADN genómico de algodón flanqueante 3' comprendida dentro de la SEC ID N° 4, o su complemento, reasociándose la primera y segunda moléculas de ADN a hebras opuestas de la SEC ID N° 4 y estando orientados los extremos 3' de la primera y segunda moléculas de ADN uno hacia el otro,
 produciendo dicho conjunto de cebadores, cuando se utiliza en un procedimiento de amplificación de ADN, un amplicón que comprende la SEC ID N° 1 o SEC ID N° 2 diagnóstico de MON88913.
8. Un kit de detección de ADN que comprende el conjunto de cebadores de ADN de la reivindicación 7.
9. Un procedimiento para detectar la presencia de un ADN correspondiente al evento de algodón MON 88913 en una muestra, estando dicho ADN presente en las semillas del evento de algodón MON88913 según lo depositado en la Colección Norteamericana de Cultivos Tipo (ATCC) con Núm. de referencia PTA-4854, comprendiendo el procedimiento:

- (a) poner en contacto la muestra que comprende ADN con un conjunto de cebadores de ADN, que cuando se utiliza en una reacción de amplificación de ácido nucleico con ADN genómico del evento de algodón MON 88913 produce un amplicón de diagnóstico que comprende la SEC ID N°: 1 y SEC ID N°: 2; y
- 5 (b) llevar a cabo una reacción de amplificación de ácido nucleico, produciendo de ese modo el amplicón de diagnóstico; y
- (c) detectar el amplicón de diagnóstico.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que la etapa de análisis se lleva a cabo realizando una reacción de amplificación de ácido nucleico utilizando un conjunto de cebadores que
- (i) comprende la SEC ID N°: 21, SEC ID N°: 22 y SEC ID N°: 24; o
- 10 (ii) comprende la SEC ID N°: 26, SEC ID N°: 27 y SEC ID N°: 28.
11. Un procedimiento para detectar la presencia de un ADN correspondiente al evento de algodón MON 88913 en una muestra, estando dicho ADN presente en las semillas del evento de algodón MON88913 según lo depositado en la Colección Norteamericana de Cultivos Tipo (ATCC) con Núm. de referencia PTA-4854, comprendiendo el procedimiento:
- 15 (a) poner en contacto la muestra que comprende ADN con una sonda que se hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con ADN genómico del evento de algodón MON 88913 y no se hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con un ADN genómico de planta de algodón de control, comprendiendo dicha sonda una secuencia que es homóloga o complementaria a la SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 2; y
- (b) someter la muestra y sonda a condiciones de hibridación rigurosas; y
- 20 (c) detectar la hibridación de la sonda al ADN.
12. Un procedimiento para determinar la zigosidad de la progenie del evento de algodón MON 88913, estando las semillas de dicho evento de algodón MON 88913 depositadas en la Colección Norteamericana de Cultivos Tipo (ATCC) con Núm. de referencia PTA- 4854, comprendiendo el procedimiento:
- 25 (a) poner en contacto una muestra que comprende ADN de algodón con un conjunto de cebadores que comprende la SEC ID N°: 21, SEC ID N°: 22 y SEC ID N°: 23 , SEC ID N°: 24 y SEC ID N°: 25 ; y
- (b) llevar a cabo una reacción de amplificación de ácido nucleico; y
- (c) detectar los productos de la reacción.
- 30 13. El procedimiento de la reivindicación 12, que comprende un procedimiento para determinar la zigosidad de la progenie del evento de algodón MON 88913 que comprende:
- (a) poner en contacto la muestra que comprende ADN de algodón con un conjunto de cebadores que comprende la SEC ID N°: 21, SEC ID N°: 22 y SEC ID N°: 23 , que cuando se utiliza en una reacción de amplificación de ácido nucleico con ADN genómico del evento de algodón MON 88913, produce un primer amplicón que es diagnóstico del evento de algodón MON 88913; y
- 35 (b) llevar a cabo una reacción de amplificación de ácido nucleico, produciendo de ese modo el primer amplicón;
- (c) detectar el primer amplicón; y
- (d) poner en contacto la muestra que comprende ADN de algodón con dicho conjunto de cebadores, que cuando se utiliza en una reacción de amplificación de ácido nucleico con ADN genómico de plantas de algodón produce un segundo amplicón que comprende el ADN genómico de algodón original homólogo a la región genómica de algodón de una inserción de transgén identificada como evento de algodón MON 88913;
- 40 (e) llevar a cabo una reacción de amplificación de ácido nucleico, produciendo de ese modo el segundo amplicón; y
- (f) detectar el segundo amplicón; y
- 45 (g) comparar el primer y segundo amplicones en una muestra, indicando la presencia de ambos amplicones que la muestra es heterocigota para la inserción del transgén.
14. Un procedimiento para combatir malezas en un cultivo de plantas de algodón tolerantes al glifosato en

conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende la etapa de aplicar una dosis efectiva de un herbicida que contiene glifosato a dicho cultivo de plantas de algodón.

15. Una molécula de ADN que comprende una secuencia seleccionada de la SEC ID N° 1, SEC ID N° 2, SEC ID N° 3 y SEC ID N° 4.

- 5 16. La molécula de ADN de la reivindicación 15, en la que la secuencia comprende la SEC ID N° 1.
17. La molécula de ADN de la reivindicación 15, en la que la secuencia comprende la SEC ID N° 2.
18. La molécula de ADN de la reivindicación 15, en la que la secuencia comprende la SEC ID N° 3.
19. La molécula de ADN de la reivindicación 15, en la que la secuencia comprende la SEC ID N° 4.

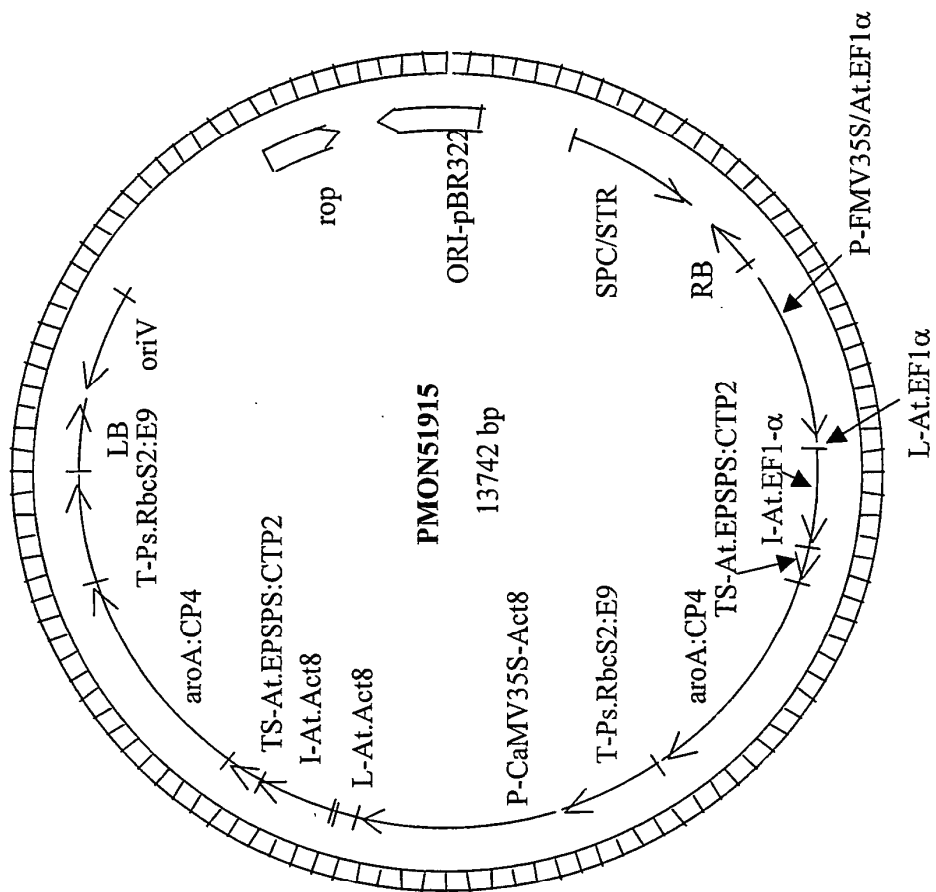


FIGURA 1

MON88913

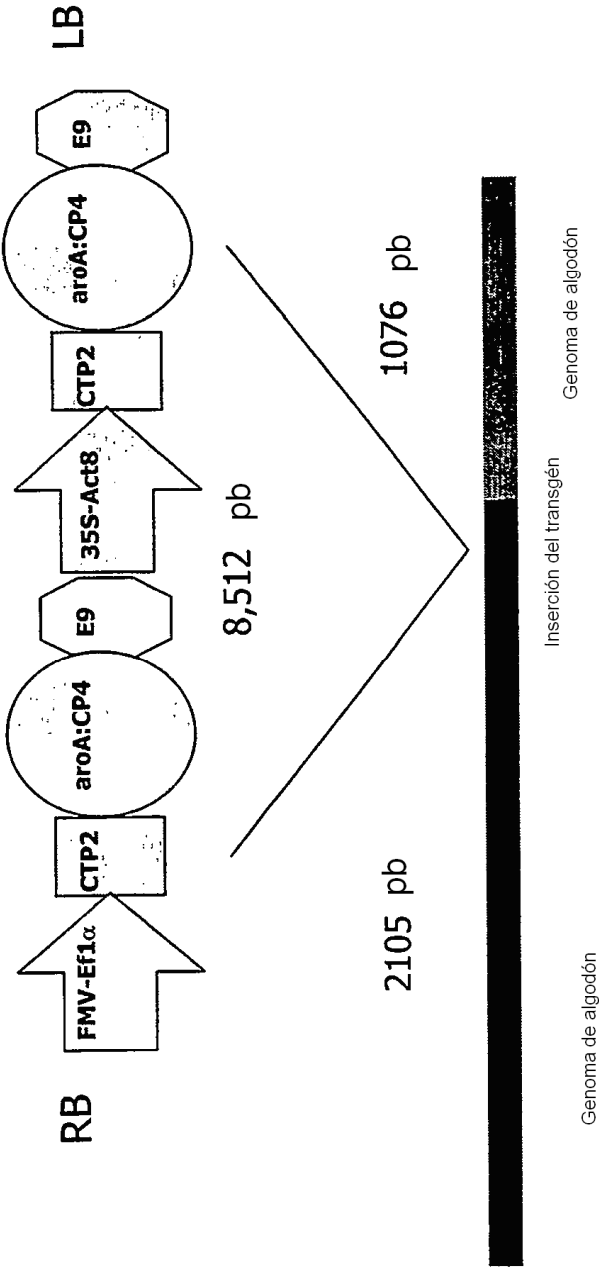


FIGURA 2

SEC ID N°: 1 secuencia de unión al ADN 5' :

ATTCAATGTA/GTCAAACACT

SEC ID N°: 2 secuencia de unión al ADN 3' ;:

TTGAATATAT/ATTACAAAGC

FIGURA 3

```

1 GCTTGGTACC GAGCTCGGAT CCACTAGTAA CGGCCGCCAG TGTGCTGGAA TTCGCCCTTT
61 TTTACTACGA TGTTAAGTCC TATTTTACAC AGTTTCTTTA AGACAGATTT GACCGCTCCT
121 ACGATACTTG GAGAAACGTT GGTCAATGT CTCTTAGAAT ACAACAACAC GATGATCAAA
181 GCAGTAGCAC CTCTGTAGTG ATTAACGAAC AAGCGTTGTC TTTTCTATC ACCAAAACAT
241 TGGAAAACAT GGAGAGGAAA AGAGTAGAAT TTTGGAAAGA AAATAATCTT GGTATGAGAG
301 AGTGAGATTG AGCAAAAAAT TTTGAGAGG TCTTAGCCTT TTATATGCGT TCAAAGTGGA
361 GGAATTTTGG AAATATCCAT GTATAATGAG AAAAAATCTG CATTTAAAT GGCATTTTCG
421 GTCGCCTGCG TCGTGCGAGT GCGCCCCAAC CCTGACGGGT TTGGACTTAC ACCCTCATAC
481 ACGCGAGGCA GGATTCCAAG TTTAGTCATT CAATCACTCT TAAAGTGAGC TTCAAGCTTA
541 GACATTACAA ATTAAATTAA ATAATATAAG ATAATTGCGC TAAATAAACA AACATTTTTT
601 TTGTGATCCT GAACGTAATC AACGAGGGTA TGATGGTTAT GATTACGGA AAGAGCGAGA
661 GAAGAGAACG GTCGCTCGAA GAGGATGATG ATTCATCCTA TTCATGCACG ACTGTCCAAC
721 TCCCCACCCA ATCAAATTC AAATTATGAC ATGAGAAGAA CATCATCCCA CGTGGTCTGT
781 GCTTCACGCC ACCATGTCCC ACGTGGGCTC CATTTTGGTG GGGCCCTTCC CCACCGCCA
841 AGCTGATCCC GGGTTGGCCA TCCCTACTTT TAATTATCAG AGCCACCTCC CCAATCTGCA
901 AAACGACGGA AATGGAAC TATAATTTT TTTTTTTTCA ACGTACTTAT AAAATATTTT
961 TCAAAAAAGT ATGAATAAAA TTGTGATATT GCTTGGCCTA AGAGGCCAAT CTTTTGCAAA
1021 TCTCGAAGTC GGGAGGCACA ATAAAACTT GGAAAGTTTT TTCAAGTGTC TGCTTTATAA
1081 AATTATTGAA ATGCATGTAT TCGTACTTGC CTTATTTATC GACAATTTAA ACATTATTAT
1141 TTCATGAAAA TGTCCTTCCA CCGATTTCAA TGACAAAACC AATAATTACT ACTTTTTATT
1201 TTCAATTATG TCACGGTTCA CATGTTTATT AGGGTTTAGG TTGAGGTTAA AACTTTTCGAC
1261 TCTCTATTCTG TAACGCTTAA AGATGTAGGG TTAGGTTGA GGTAAACA ATCATGTAAT
1321 GTAAGGATAC CTGAAAAGCT GTCATTAGTG TAAGTGTTTA TTACTAGGGT TGTTTAAATT
1381 CATGTTGATG TCAAGCTTGG ATAACCCATT TTACTAAAAA AATAAATGAA GTCCCAAAGG
1441 GCATTGGGCA TCCTATCAAA GATGGGAAAT TTTTCAAAA TTTTAACCTA AAAAAGAGGT
1501 GGAAAGTCTT AGTCCAAATA ATCAGCCACA TCAGAATTTG ATTCGTTTCT TTCAAGCAAA
1561 TTATACCTAT TGGCTGCAAT ATCTTAAAGT GGAATGGTCG GCCAACTTT TCCATATCAG
1621 CTTGATTTCAT CTCTAACTT GATTATCTT TTTTATTAAT ATTAAATTC ACAACTTGAA
1681 CTTTAATTTT TTTAATTAAT TAAAAAATT GTCACCTTTT CAAGCTGAAA AAGAAAAAGA
1741 AACCTTAATT ATTATCACTA GTATTAAATT TCAAACTTG ATTTGTCCTA AATTTGAAAA
1801 GGGGTCTCCT TCAATTCATA TATGTAGTCA TGAAGATTAT AACTTAGCTG AAAATGGCCT
1861 CCATTATTG GCTTATTCOA TCAAAGTTT ACAAACCTAG TGCAAATTTA ATATGATAAT
1921 GTCTACAAGA ACCAAATACG AATTGAGTAA ATTTTTTTGG CTAAATATA TTACGAATTG
1981 ATGAATTATC ATTTTAAAA GTTCTTTTTA ACCATTTCTT TTACTGAATT AAAAAAGGT
2041 TTTATTAAATC ATATATATTA CAAATTACCC ATTAAGTAGC CAAATTACAA ATTTTAATTC
2101 AATGTAGTCA AACACTGATA GTTTAAACAT GACTCTCTTA AGGTAGCCAA AGCCCGGGCT
2161 TAATTAAGGC GCGCCGGCCA AGTCGGCCGC GGCCGCGTTA TCAAGCTTCT GCAGGTCTCG
2221 CTCGAGTGGA AGCTAATTCT CAGTCCAAAG CCTCAACAAG GTCAGGGTAC AGAGTCTCCA
2281 AACCATTAGC CAAAAGCTAC AGGAGATCAA TGAAGAATCT TCAATCAAAG TAACTACTG
2341 TTCCAGCACA TGCATCATGG TCAGTAAGTT TCAGAAAAAG ACATCCACCG AAGACTTAAA
2401 GTTAGTGGGC ATCTTTGAAA GTAATCTTGT CAACATCGAG CAGCTGGCTT GTGGGGACCA
2461 GACAAAAAAG GAATGGTGCA GAATTGTTAG GCGCACCTAC CAAAAGCATC TTTGCCTTTA
2521 TTGCAAAGAT AAAGCAGATT CCTCTAGTAC AAGTGGGGAA CAAAATAACG TGGAAAAGAG
2581 CTGTCTTGAC AGCCCACTCA CTAATGCGTA TGACGAACGC AGTGACGACC ACAAAGAAT
2641 TAGCTTGAGC TCAGGATTTA GCAGATTCC AGATTGGGT CAATCAACAA GGTACGAGCC
2701 ATATCACTTT ATTCAAATTG GTATCGCCAA AACCAAGAAG GAACTCCAT CCTCAAAGGT
2761 TTGTAAGGAA GAATTCGATA TCAAGCTTGA TATCGGAAG TTCTCTCTTG AGGGAGGTTG
2821 CTCGTGGAAT GGGACACATA TGGTTGTTAT AATAAACCAT TTCCATTGTC ATGAGATTTT

```

FIGURA 4

```

1  TGACCGAAGT TAATATGAGG AGTAAACAC TTGTAGTTGT ACCATTATGC TTATTCAC TA
61 GGCAACAAAT ATATTTTCAG ACCTAGAAAA GCTGCAAAATG TTACTGAATA CAAGTATGTC
121 CTCTTGTTGT TTAGACATTT ATGAACTTTC CTTTATGTAA TTTTCCAGAA TCCTTGTCAG
181 ATTCTAATCA TTGCTTTATA ATTATAGTTA TACTCATGGA TTTGTAGTTG AGTATGAAAA
241 TATTTTTTAA TGCATTTTAT GACTTGCCAA TTGATTGACA ACATGCATCA ATCGACCTGC
301 AGCCACTCGA GTGGAGGCCT CATCTAAGCC CCCATTTGGA CGTGAATGTA GACACGTCGA
361 AATAAGATT TCCGAATTAG AATAATTTGT TTATTGCTTT CGCCTATAAA TACGACGGAT
421 CGTAATTTGT CGTTTATCA AAATGTACTT TCATTTTATA ATAACGCTGC GGACATCTAC
481 ATTTTGAAT TGAAAAAAA TTGGTAATTA CTCTTCTTT TTCTCCATAT TGACCATCAT
541 ACTCATTGCT GATCCATGTA GATTCCCGG ACATGAAGCC ATTTACAATT GAATATATAT
601 TACAAAGCTA TTTGCTTATA ACATATGCGA AAAATTTTGT ACTATAATCA GGGGTAAATT
661 TAGGAGGGGG CTTGTAGGTC TCGCTTCTCT TAAAATGAAA AATTTTCTAT TTAGTTATTT
721 AAAATTTTAA AAGTAAAAATA TAAAAATTTT ATTTAATCCT TTAAAAATTA TAAAGATATA
781 GACTATTAAA ATGATGAAAT TACAATTTTA TTATCATAAA AATTATAATT TAATTTTCGAC
841 CCCTAACAAA ATTTTCTGAT TTTGCCCTA ACTGTAATAT TTGTATAAAA ACATTTTCTT
901 TTTGCATTTA ATGATTTCTT TAATTCAGTC CAAGAAAGAA ATTTATTAAT TGCATATGCG
961 AAAGTTAGTC CTTGCCTAGT GATATTAAAG GAAAGAAACA TAAAATCAAT AAATTAATTT
1021 TTAAAGCAAA TAGTAAAAAT AAGGAAAAAC TTTCTACGAT AGTCTATAAT TCAAAAAAAG
1081 AAATAATAAT CTTTAACCAT TGAATTTTAA AATAACATCA GAATAATCTA TTTATTTAAT
1141 TTAATAAATA ATAATAACAT ATATATTAAT ATTAAAATTT TTATTGAGCT TAGTGTCACA
1201 AATCAATAAA AAATTTCTTA CAAAATAAAT TATATTATTT TGAGGGTGT TTATTATTTT
1261 ATATATTTTA TACAGACATA TAGAAATATA AATACACATA ATAAAATTTG AATCCAAATT
1321 TTTAATTTTT AACATTTATA ATTTACTATT CAACCAAAAT TTTATTTATT ATTTATATCA
1381 AATTTTATA AATATATTTA TCAGATAATG CGATTTTTTT TACCTATATA TAGATGACAT
1441 AATCTACTTT AAATTAAGTC CTAAAAATAA TATATCATAC CAAAAAATTT CTTAAAATGA
1501 ATCTGATAAT ACTTAACCCC TTTTATAAAA CAATCTTAAC CCCTTATATA TTTTAATATT
1561 AATATCATTA TAAATATAAA TCTATTGAGC ATATGTTTTA AACCAAGTAA TGTGTAGTGC
1621 GGTAGTAAAA CTCATTACAC ATTTTAAGTA GAACGTAGTT CGAACCTTGG AGAAG

```

FIGURA 5