

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 276**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/82** (2006.01)  
**C12Q 1/68** (2006.01)  
**C12N 15/11** (2006.01)  
**A01H 1/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03775220 .1**  
96 Fecha de presentación: **23.10.2003**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1565560**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.08.2005**

54 Título: **Algodón insecticida COT102**

30 Prioridad:  
**29.10.2002 GB 0225129**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**11.10.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**11.10.2012**

73 Titular/es:  
**SYNGENTA PARTICIPATIONS AG  
SCHWARZWALDALLEE 215  
4058 BASEL, CH**

72 Inventor/es:  
**Ellis, Daniel Murray;  
Negrotto, David Vincent;  
Shi, Liang;  
Shotkoski, Frank Arthur y  
Thomas, Carla Randall**

74 Agente/Representante:  
**Lehmann Novo, Isabel**

ES 2 388 276 T3

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

## DESCRIPCIÓN

## Algodón insecticida COT102

La presente invención se refiere a métodos para detectar material derivado de una planta de algodón transgénica resistente a insectos.

- 5 Las plagas vegetales son un factor importante en la pérdida de las cosechas agrícolas importantes del mundo. Se pierden alrededor de 8 mil millones de dólares cada año en los Estados Unidos de América debido a infestaciones de plantas por plagas no mamíferas, incluyendo insectos. Además de las pérdidas en cosechas de campo, las plagas de insectos también son una carga para los cultivadores de vegetales y frutas, para productores de flores ornamentales, y para jardineros.
- 10 Las plagas de insectos se controlan principalmente mediante aplicaciones intensivas de plaguicidas químicos, que son activos mediante la inhibición del crecimiento de los insectos, prevención de la alimentación de reproducción de los insectos, o que provoca la muerte. De este modo se puede alcanzar un buen control de plagas de insectos, pero estos compuestos químicos pueden afectar también algunas veces a otros insectos beneficiosos. Otro problema que resulta del uso extendido de plaguicidas químicos es la aparición de variedades de insectos resistentes. Esto se ha aliviado parcialmente mediante diversas prácticas de manejo de la resistencia, pero hay una creciente necesidad de agentes de control de plagas alternativos. Los agentes de control de plagas biológicos, tales como las cepas de *Bacillus thuringiensis* que expresan toxinas plaguicidas como  $\delta$ -endotoxinas, también se han aplicado a plantas de cosechas con resultados satisfactorios, ofreciendo una alternativa o ayuda a plaguicidas químicos. Se han aislado los genes que codifican algunas de estas  $\delta$ -endotoxinas, y se ha demostrado que su expresión en hospedantes heterólogos proporciona otra herramienta para el control de plagas de insectos económicamente importantes. En particular, la expresión de toxinas insecticidas tales como  $\delta$ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* en plantas transgénicas, ha proporcionado protección eficiente frente a plagas de insectos seleccionadas, y se han comercializado plantas transgénicas que expresan tales toxinas, permitiendo a los granjeros reducir las aplicaciones de agentes de control de insectos químicos.
- 15 20 25 Recientemente, se ha identificado una nueva familia de proteínas insecticidas producidas mediante *Bacillus* sp. durante las etapas vegetativas de crecimiento (proteínas insecticidas vegetativas (VIPs)). Las patentes U.S. 5.877.012, 6.107.279, y 6.137.033, así como los documentos WO 96/10083, WO 02/078437 y WO 98/44137 describen genes de la toxina vip3A, aislados de la especie *Bacillus*. Las toxinas VIP3A poseen actividad insecticida frente a un amplio espectro de insectos lepidópteros, que incluye, pero no se limita a, gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda*, gusano cortador grasiento, *Agrotis ipsilon*, taladrador de la caña de azúcar, *Diatraea saccharalis*, y gusano picador, *Elasmopalpus lignosellus*, y, cuando se expresan en plantas transgénicas, por ejemplo algodón, confieren protección a la planta del daño por ingestión del insecto.
- 30 35 La familia del algodón, género *Gossypium*, un miembro de las Malváceas, consiste en 39 especies, de las cuales *Gossypium hirsutum* es la especie más habitualmente cultivada. También se cultivan otras tres especies: *G. arboreum*, *G. barbadense*, y *G. herbaceum*. Estas especies cultivadas se hacen crecer principalmente para las masas de fibras sedosas que se convierten en telas. El algodón es adecuado como fibra textil debido a que las hebras secas maduras se retuercen de tal manera que se pueden hilar de ellas hebras fuertes finas. Otros productos, tales como aceite de semilla de algodón, torta, y removedoras de hilachas de algodón son subproductos de la producción de fibras.
- 40 45 El daño a las cosechas de algodón por plagas de insectos en todo el mundo da como resultado cada año una pérdida significativa de producción. El control eficaz de estas plagas para minimizar la pérdida de producción es de gran importancia económica. Los ejemplos de plagas de insectos de algodón incluyen rosquilla verde gardana (*Spodoptera exigua*), picudo del algodonoero (*Anthonomus grandis grandis*), gusano medidor del repollo (*Trichoplusia ni*), insecto de planta anubarrado (*Neurocolpus nubilus*), áfido del algodón (*Aphis gossypii*), gusano pelotero (*Heliocoverpa zea*), gusanos cortadores (*Feltia subterranea*, *Peridroma saucia*, *Agrotis ipsilon*), taladrador del maíz europeo (*Ostilizia nubilalis*), cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*), trips de plántula (*Frankliniella spp.*), falso medidor (*Pseudoplusia includens*), insectos hediondos (*Nezara viridula*, *Acrosternum hilare*, *Euschistus servus*), chinche opaca de las plantas (*Lygus lineolaris*), perforador mayor de la bellota (*Heliothis virescens*) y moscas blancas (*Trialeurodes abutilonea*, *Benzisia tabaci*).
- 50 55 La transformación y regeneración de plantas de algodón es ahora un procedimiento bien consolidado, basado típicamente en transferencia de ADN extraño mediada por *Agrobacterium tumefaciens* en partes vegetales de algodón y la regeneración de dichas partes vegetales en cultivo tisular en plantas de algodón transgénicas, completamente fértiles.
- Existe la necesidad de generar una planta de algodón que sea resistente a insectos, de manera que se reduzca la pérdida de producción por daño a las cosechas de algodón por plagas de insectos. Una planta de algodón resistente a insectos podría reducir la necesidad de aplicar plaguicidas químicos, que pueden ser perjudiciales a otros insectos beneficiosos y al entorno. Enlazado a esa necesidad de dichas plantas de algodón resistentes a insectos está la necesidad de medios para detectar tales plantas.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un suceso de algodón transgénico resistente a insectos, denominado COT102, y a métodos para detectar material vegetal derivado de él. "Suceso COT102", en el contexto de esta solicitud, se refiere a la planta de algodón transgénica insecticida original descrita aquí. "Insecticida", como se usa aquí, se refiere a cualquier efecto inhibitorio sobre un insecto, incluyendo, pero sin limitarse a, alimentación reducida, crecimiento retardado, fecundidad reducida, parálisis o muerte. "Fecundidad" comprende todos los aspectos relacionados con la reproducción, tales como la capacidad reproductora, la frecuencia reproductora y el número de descendientes. También está abarcado por esta invención cualquier material vegetal derivado del suceso COT102, incluyendo semillas.

El suceso COT102 muestra un genotipo nuevo que comprende dos casetes de expresión. El primer casete comprende un promotor adecuado para la expresión en plantas, operablemente enlazado a un gen que codifica una toxina insecticida VIP3A, útil para controlar un amplio espectro de plagas de insectos lepidópteros, y una señal de poliadenilación adecuada. Los promotores adecuados se pueden aislar, *entre otros*, de plantas. Se han aislado y caracterizado numerosos promotores vegetales, incluyendo promotores constitutivos, encendibles y/o específicos de tejidos. Los promotores adecuados se pueden seleccionar del siguiente grupo no limitante: CaMV35S, FMV35S, ubiquitina, Act2, NOS, OCS, el promotor del virus de la hoja rizada amarilla del *Cestrum*, patatina, E9, el conector alcA/alcR, el conector GST, el conector RMS, oleosina, gelvina, la subunidad pequeña de ribulosa bifsosfato carboxilasa-oxigenasa, actina 7, el promotor MR7 (maíz), Gos 9 (arroz), los promotores GOS2, MasOcs (o superpromotor), el promotor RoID (*Agrobacterium rhizogenes*), el promotor SuperMAS, y el promotor Suc2 (*Arabidopsis*).

También se pueden incorporar elementos adicionales, tales como secuencias potenciadoras, en el casete de expresión a fin de estimular niveles de expresión génica, por ejemplo potenciadores transcripcionales o traduccionales, tales como el activador de la traducción del virus del grabado del tabaco (TEV), el potenciador CaMV35S, y el potenciador FMV35S. Como alternativa, puede ser deseable incluir una secuencia seleccionadora de dianas, por ejemplo, para dirigir el transporte de la toxina VIP3A a un compartimiento celular particular. Por ejemplo, si se desea proporcionar la proteína fuera de la célula, entonces se puede ligar una secuencia extracelular seleccionadora de dianas al polinucleótido que codifica la proteína VIP. Otros ejemplos de selección de dianas incluyen la selección de una diana de un orgánulo o compartimiento intracelular específico, por ejemplo al retículo endoplásmico usando una secuencia de retención "KDEL". Se han aislado y caracterizado numerosas señales de poliadenilación. Los ejemplos de señales de poliadenilación adecuadas funcionales en plantas incluyen aquellas del gen de nopalina sintasa (nos) de *Agrobacterium tumefaciens*, del gen del inhibidor de proteinasa II y del gen de alfa-tubulina (documento EP-A 652.286).

El segundo casete de expresión comprende un gen que, cuando se expresa, se puede usar como un marcador seleccionable. Se han caracterizado numerosos marcadores seleccionables, incluyendo algunos que confieren tolerancia a antibióticos, y otros que confieren tolerancia a herbicidas. Los ejemplos de genes marcadores seleccionables adecuados incluyen aquellos que confieren tolerancia a higromicina, canamicina o gentamicina. Otros marcadores seleccionables adecuados incluyen genes que confieren resistencia a herbicidas, tales como herbicidas a base de glifosato, o resistencia a toxinas tales como eutipina. También existen otras formas de selección, tales como sistemas de selección a base de hormonas, tales como el sistema de multiautotransformación (MAT) de Hiroyasu Ebinuma et al. (1997) PNAS Vol. 94 p. 2117-2121; los sistemas de selección visual, que usan la proteína fluorescente verde conocida,  $\beta$ -glucuronidasa, o cualquier otro sistema de selección tal como manosa isomerasa (Positech™), xilosa isomerasa y 2-desoxiglucosa (2-DOG).

Los casetes de expresión primero y segundo se pueden introducir en la planta en los mismos plásmidos o en plásmidos diferentes. Si los casetes de expresión primero y segundo están presentes en el mismo plásmido y se introducen en la planta vía un método de transformación mediada por *Agrobacterium*, pueden estar presentes en las mismas regiones de T-DNA o en regiones diferentes.

Según el primer aspecto de la invención, se proporciona un polinucleótido que comprende la secuencia de SEC ID NO: 1.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona un polinucleótido que comprende la secuencia de SEC ID NO: 2.

En todavía otro aspecto de la invención, se proporciona un polinucleótido como se describe anteriormente, que comprende la secuencia de SEC ID NO: 21.

El experto está familiarizado con métodos de transformación vegetal. En particular, se han caracterizado dos técnicas principales a lo largo de un amplio intervalo de especies vegetales: transformación mediante *Agrobacterium* y transformación mediante transferencia directa de ADN.

La transformación mediada por *Agrobacterium* es un método usado habitualmente para la transformación de plantas dicotiledóneas. El ADN extraño a introducir en la planta se clona en un vector binario entre las secuencias de consenso de frontera izquierda y derecha. Esta es la región de T-DNA. El vector binario se transfiere en una célula de *Agrobacterium*, que se usa subsiguientemente para infectar tejido vegetal. La región de T-DNA del vector que

comprende el ADN extraño se inserta en el genoma de la planta. El casete del gen marcador y el casete del gen de rasgo pueden estar presentes en la misma región de T-DNA, en regiones diferentes de T-DNA en el mismo vector, o incluso en regiones diferentes de T-DNA en vectores diferentes.

5 Como alternativa, se puede usar la transferencia directa de ADN para introducir el ADN directamente en una célula vegetal. Un método adecuado de transferencia directa puede ser el bombardeo de células vegetales con un vector que comprende el ADN para la inserción usando una pistola de partículas (transformación biolística mediada por partículas); otro método establecido "filamentos", implica revestir el ADN sobre fibras de carburo de silicio, sobre las que se atraviesan las células. Otros métodos para transformar células vegetales incluyen transformación de protoplastos (opcionalmente en presencia de polietilenglicoles); tratamiento con ultrasonidos de tejidos vegetales, células o protoplastos en un medio que comprende el polinucleótido o vector; microinserción del polinucleótido o vector en un material vegetal (que emplea opcionalmente la técnica conocida de "filamentos" de carburo de silicio), electroporación, y similares.

10 Tras la transformación, las plantas transgénicas se deben de regenerar a partir del tejido vegetal transformado, y la progenie que posee el ADN extraño se selecciona usando un marcador apropiado tal como resistencia a higromicina. El experto está familiarizado con la composición de medios de regeneración adecuados.

15 Una planta anorgénica como se describe aquí tiene un efecto insecticida sobre insectos de una o más especies del grupo que comprende *Heliothis* sp., *Helicoverpa* sp. y *Spodoptera* sp. que la pueden infestar. "Infestar", como se usa aquí, se refiere a atacar, alimentarse o dañar de cualquier forma por uno o más insectos. De este modo, por ejemplo, la planta proporcionará un mecanismo de autodefensa frente a la infestación por insectos de plagas tales como *Helicoverpa zea* (gusano de la mazorca del maíz). Como resultado, se requiere un número reducido de pulverizaciones de insecticida durante el cultivo de dicha planta en comparación con una planta de maíz no transgénica de la misma variedad, y la pérdida de producción debido a plagas de insectos se mantiene en un nivel mínimo. La presente descripción no está limitada al propio suceso COT102, sino que se amplía además para incluir cualquier material vegetal derivado del mismo, incluyendo semillas en tanto que contienen al menos uno de los polinucleótidos de la presente invención. Incluye plantas que derivan de una reproducción cruzada con el suceso COT102 o un derivado del mismo mediante reproducción convencional u otros métodos. También incluye material vegetal derivado del suceso COT102 que puede comprender secuencias polinucleotídicas adicionales, modificadas o en menor número, en comparación con el suceso COT102, o presenta otras características fenotípicas. Por ejemplo, puede ser deseable transformar el material vegetal derivado del suceso COT102 para generar un nuevo suceso que posee un rasgo adicional, tal como un segundo gen de resistencia a insectos. Este procedimiento es conocido como apilamiento génico. El segundo gen de resistencia a insectos puede codificar, por ejemplo, lectinas insecticidas, inhibidores de proteasas insecticidas, y proteínas insecticidas que derivan de especies de *Bacillus thuringiensis*, *Xenorhabdus nematophilus*, o *Photorhabdus luminescens*.

20 Preferiblemente, el segundo gen de resistencia a insectos codifica un gen Cry de la bacteria *Bacillus thuringiensis*, gen Cry el cual produce una toxina con un modo de acción diferente, o un sitio de unión en el intestino del insecto a VIP, para el control de diferentes especies de insectos. La presente descripción se refiere además a material vegetal derivado del suceso COT102 que posee un rasgo adicional tal como resistencia a herbicidas, resistencia a nematodos o resistencia fúngica. Dicho rasgo de resistencia a herbicidas puede proporcionar resistencia a un herbicida que comprende ácido glifosato o una sal agrícolamente aceptable del mismo. En otro ejemplo, dicho rasgo de resistencia a herbicidas se proporciona mediante un gen que codifica EPSP sintasa, o un mutante del mismo.

25 Según todavía un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un método para detectar material vegetal derivado del suceso transgénico COT102, que comprende obtener una muestra para análisis; extraer ADN de la muestra; proporcionar un par de cebadores diseñados para unirse a un polinucleótido de SEC ID NO: 1 o SEC ID NO: 2; amplificar la región que se encuentra entre los sitios en los que se unen los cebadores; y detectar la presencia del producto de la amplificación. Los pares adecuados de cebadores para uso en este método de detección se pueden diseñar usando parámetros bien conocidos por los expertos en la técnica de biología molecular ahora que ya están disponibles las SEC ID NOs: 1 y 2. Por ejemplo, uno o ambos cebadores del par se pueden diseñar para ser específicos del vector, específicos del gen de rasgo, específicos del promotor, específicos para la secuencia de la unión entre el ADN insertado y el ADN genómico y/o específicos del marcador. En una realización, la secuencia de dichos cebadores se representa como SEC ID NO: 3 y SEC ID NO: 4.

30 Los cebadores alternativos que se pueden usar en combinación para detectar el suceso COT102 incluyen SEC ID NOs 18 y 19, que son específicas para el suceso COT102 y producen un amplicón de 962 pb amplicón 556 pb, o SEC ID NOs 24 y 25 que son específicas para el gen que confiere resistencia al antibiótico higromicina y producen un amplicón de 367 pb.

35 Existen muchos métodos de amplificación que se pueden usar según este aspecto de la invención. El principio subyacente, una técnica conocida por los expertos en la técnica, es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El producto de la amplificación procedente de una reacción de PCR se puede visualizar tificando con bromuro de etidio y excitando con luz UV, típicamente después de la separación de tamaños usando electroforesis en gel de agarosa.

Una realización de la presente invención emplea variaciones del principio de PCR, tal como TaqMan™. Éste implica marcar al menos uno de los cebadores implicados en el proceso de amplificación con un colorante fluorescente. Cuando no está unido, el cebador adopta una conformación de manera que no se puede detectar fluorescencia. Sin embargo, cuando el cebador se une a un trozo de ADN, la conformación cambia, y se puede detectar fluorescencia. De esta manera, el proceso de amplificación se puede monitorizar en tiempo real, correspondiendo la intensidad de la fluorescencia directamente al nivel de amplificación. Otras realizaciones de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, RACE PCR.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para detectar material vegetal derivado del suceso COT102, que comprende obtener una muestra para análisis; proporcionar una sonda diseñada para unirse al complemento de un polinucleótido de SEC ID NO: 1 o SEC ID NO: 2 cuando dicho polinucleótido es monocatenario; hibridar dicha sonda con la muestra; y detectar si la sonda se ha hibridado. En una realización, dicha sonda comprende la secuencia de SEC ID NO: 1 y/o SEC ID NO: 2.

La sonda puede ser, por ejemplo, un producto de PCR o un fragmento de digestión de restricción. En una realización adicional, la sonda como se describe aquí puede ser etiquetada con un marcador fluorescente, radioactivo, enzimático u otro marcador adecuado, para permitir que se detecte la hibridación. El experto sabrá cómo diseñar sondas adecuadas, ahora que tiene el beneficio de la presente descripción.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un kit de partes que comprende un medio para detectar en una muestra la presencia de material vegetal derivado del suceso COT102. Preferiblemente, dicho kit de partes comprende un medio para detectar en una muestra la presencia de un polinucleótido de SEC ID NO: 1 o SEC ID NO: 2. En una realización de la presente invención, dicho kit de partes puede comprender tecnología de detección de amplificación de ADN, tal como PCR o TaqMan™. En una realización adicional de la presente invención, dicho kit de partes puede comprender tecnología de detección de hibridación de la sonda, tal como transferencias Southern, transferencias Northern, o hibridación *in situ*. En una realización adicional de la presente invención, dicho kit de partes puede comprender cualquier combinación de las tecnologías de detección mencionadas anteriormente. En todavía otra realización, dicho kit de partes puede comprender, en forma de instrucciones, uno o más de los métodos descritos anteriormente.

## EJEMPLOS

La invención será manifiesta adicionalmente a partir de los siguientes ejemplos no limitantes, conjuntamente con los listados de secuencias asociados como se describe a continuación:

- SEC ID NO 1: Secuencia polinucleotídica que se extiende a lo largo de la unión donde el extremo 5' del inserto COT102 se inserta en el genoma de algodón en el suceso COT102.
- SEC ID NO 2: Secuencia polinucleotídica que se extiende a lo largo de la unión donde el extremo 3' del inserto COT102 se inserta en el genoma de algodón en el suceso COT102.
- SEC ID NOs 3-4: Secuencias polinucleotídicas adecuadas para uso como cebadores en la detección del suceso COT102.
- SEC ID NOs 5-7: Secuencias polinucleotídicas adecuadas para uso como sondas en la detección del suceso COT102.
- SEC ID NO 8: Secuencia de aminoácidos de la proteína de la toxina VIP3A.
- SEC ID NOs 9-17: Secuencias polinucleotídicas adecuadas para uso como cebadores TaqMan en la detección del suceso COT102.
- SEC ID NOs 18-20: Secuencias polinucleotídicas adecuadas para uso como cebadores en la detección del suceso COT102 vía ensayo de cigosidad.
- SEC ID NO 21: Secuencia polinucleotídica que caracteriza el suceso COT102.
- SEC ID NOs 22-25: Secuencias polinucleotídicas adecuadas para uso como cebadores en la detección del suceso COT102.

### Ejemplo 1: Clonación y transformación

#### 1.1 Clonación del vector

Se usaron técnicas de clonación génica estándar de restricción, digestión y ligación de fragmentos de vectores domésticos para construir el vector de transformación, pNOV3001. El vector incluyó un casete marcador seleccionable que comprende un promotor de ubiquitina (UBQ3), el intrón UBQ3, una secuencia génica que codifica una proteína que confiere resistencia a higromicina, y una secuencia de poliadenilación nos. El vector también incluyó el casete de expresión del gen diana, casete el cual comprendió un promotor de actina Act2, el intrón Act2,

una secuencia que codifica el gen de VIP3A que había sido optimizada en los codones para la expresión en maíz, y una secuencia de poliadenilación nos. El casete marcador seleccionable y el casete que contiene VIP3A se clonaron en la región T-DNA del vector pNOV3001, entre las secuencias frontera izquierda y derecha. El vector también comprendió un gen que confiere resistencia a un antibiótico, espectinomina, para la selección procariota.

5 El vector se transformó en la cepa EHA101 de *Agrobacterium tumefaciens*, usando técnicas de transformación de *Agrobacterium* estándar, y se seleccionaron células transformadas mediante su resistencia a espectinomina.

## 1.2 Transformación vegetal

El suceso COT102 se produjo mediante transformación mediada por *Agrobacterium* de *Gossypium hirsutum* L. cv Coker 312.

10 Las semillas de Coker 312 se esterilizaron en la superficie durante 30 segundos en etanol al 70% usando suficiente etanol para recuperar la cantidad de semilla a esterilizar. Las semillas se lavaron con etanol, se aclararon con agua estéril y se empaparon en una disolución al 12% de Clorox + Tween 20, durante 20 minutos. El procedimiento de lavado se llevó a cabo 3 veces. Las semillas se colocaron entonces sobre medio de germinación (Stewart y Hsu, 1977) y se dejaron germinar a 30°C durante 7-10 días. Cultivos de 2 ml de *Agrobacterium* que contiene el constructo pNOV3001 se hicieron crecer toda la noche en antibiótico apropiado, y después se diluyeron con medio MSNH (19:1) en una cápsula de petri estéril. Los hipocotilos se cortaron en longitudes de 6-8 mm y se colocaron en la disolución diluida de *Agrobacterium*, durante al menos 30 segundos. Los explantes de hipocotilos se retiraron de la disolución de *Agrobacterium* y se transfirieron sobre papel de filtro estéril, para eliminar las bacterias en exceso. Los hipocotilos se colocaron en medio T2 (sales MS, vitaminas B5, 0,1 mg/l de 2,4-D, 0,5 mg/ml de cinetina, 30 g/l de glucosa, 2 g/l de Phytigel – pH 5,8), y se cocultivaron con la *Agrobacterium* durante 72 horas en la oscuridad.

20 Los explantes de hipocotilos se transfirieron nuevamente sobre papel de filtro estéril y se transfirieron a placas que contienen medio MS2NK (sales MS, vitaminas B5, 2 mg/ml de NAA, 0,1 mg/l de cinetina, 30 g/l de glucosa, 2 g/l de Phytogel, 500 mg/l de cefotaxima, 10 mg/l de higromicina – pH 5,8). Las placas se envolvieron con parafilm y se incubaron en la luz a 30°C durante varios meses hasta que se formó callo.

25 El callo se rompió en trozos tan pequeños como fuese posible, y se colocó en un matraz Erlenmeyer de 50 ml que contiene 10 ml de medio MSNH líquido (sales MS, vitaminas B5, 30 g/l de glucosa – pH 5,8). El callo suspendido se agitó a 110 rpm en la luz a 30°C hasta que fueron visibles racimos de células ligeramente redondas blancas pequeñas. Las células se lavaron y se colocaron sobre medio MSNH sólido (sales MS, vitaminas B5, 30 g/l de glucosa, 2 g/l de Phytogel – pH 5,8). Las placas se comprobaron mensualmente para determinar el desarrollo de embriones somáticos.

30 Los embriones somáticos maduros se recogieron de las placas y se colocaron sobre placas que contienen medio SA (sales de Stewart y Hsu, 20 g/l de sacarosa, 20 g/l de agar – pH 5,8). Las placas de los embriones se colocaron en la oscuridad durante aproximadamente 14 días. Las raíces se recortaron de los embriones en maduración, y los embriones se transfirieron a medio SGA (sales de Stewart y Hsu, 5 g/l de sacarosa, 1,5 g/l de Phytogel, 5 g/l de agar – pH 6,8).

Después de que salió la primera hoja verdadera, las plantas jóvenes se movieron a tarros de latas de tamaño de una pinta que contienen medio SGA. Cuando las plantas alcanzaron 7-10 cm de altura, la parte superior se cortó y se transfirió a otro tarro. Al desarrollar un buen sistema de raíces, los esquejes así enraizados se transplantaron en macetas y se hicieron crecer en el invernadero.

## 40 1.3 Identificación y selección de transgénicos

Se cribaron plantas transgénicas putativas mediante PCR en busca de la presencia del gen de VIP3A. Los sucesos positivos se identificaron y se cribaron usando bioensayos de insectos para determinar la actividad insecticida frente a cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*) (véase el Ejemplo 7). Las líneas insecticidas se caracterizaron para determinar el número de copias mediante análisis TaqMan™ (véase el Ejemplo 2). Se observaron semillas T1 a partir de 3 sucesos de una sola copia y 2 sucesos de doble copia en un ensayo de campo para determinar la resistencia a insectos y la calidad agronómica. Se escogieron dos sucesos, COT101 y COT102, basándose en la posesión de una sola copia del transgén, buena expresión proteica como se identifica mediante ELISA (véase el Ejemplo 4), buena actividad insecticida frente a gusano del maíz (*Helicoverpa zea*) y comportamiento de campo. Al final del segundo año de ensayos de campo, se compararon los resultados entre los dos sucesos, y COT102 se adelantó.

## 50 1.4 Verificación de la secuencia de COT102

Se aisló ADN genómico a partir del suceso COT102. Éste se usó en la secuenciación de las uniones del sitio de inserción de ADN con el ADN genómico de algodón en el suceso COT102, usando técnicas de secuenciación de ADN estándar.

55

**Ejemplo 2: Detección de COT102 vía TaqMan™**

## 2.1 Extracción de ADN

5 Se extrajo ADN de tejido de hoja usando el Wizard™ Magnetic 96 DNA Plant System (Promega, #FF3760), según las instrucciones del fabricante, con una etapa adicional al comienzo del protocolo: tras la molienda del material de hoja, se añadieron a cada pocillo 0,9 ml de tampón de extracción de algodón (0,2M de Tris pH 8,0, 50 mM de EDTA, 0,25M de NaCl, 0,1% v/v de 2-mercaptoetanol, 2,5% p/v de polivinilpirrolidona), el tejido vegetal se resuspendió, y la placa se centrifugó a 4.000 rpm (2755 g) durante 10 minutos. Después de aspirar y desechar el sobrenadante, se añadieron 300 ul de tampón de lisis A (Promega) y se siguió el protocolo del fabricante a partir de este punto. Este procedimiento dio como resultado aproximadamente 85 ul de ADN genómico purificado, a una concentración de aproximadamente 10 ng/ul.

## 2.2 Reacciones de PCR TaqMan

Se llevaron a cabo reacciones de PCR TaqMan™ usando una mezcla de reacción estándar que comprende:

625 ul 2x Jumpstart Master Mix for Q-PCR (Sigma, #P2893), suplementado con 15 mM de MgCl<sub>2</sub> y 200 nM de Strata-ROX

15 25 ul 50x de mezcla de cebador/sonda FAM

25 ul 50x de mezcla de cebador/sonda TET

200 ul agua.

20 Las mezclas 50x de cebador/sonda comprenden 45 ul de cada cebador a una concentración de 1 mM, 50 ul de la sonda a una concentración de 100 uM y 860 ul 1x TE, y se almacenaron en un tubo de ámbar a 4°C. Los ejemplos de combinaciones adecuadas de secuencias cebadoras/sondas que se usaron son:

Nombre del cebador	Secuencia del cebador 5'-3'	SEC ID
GhCHI2b-F directo	GGTCCCTGGATACGGTGTCA	SEC ID nº 9
GhCHI2b-R inverso	TTGAGGGTTGGATCCTTTGC	SEC ID nº 10
Sonda GhCHI2b-TET	CCAACATCATCAATGGTGGCATCGAAT (marcador de 5' = TET, marcador de 3' = TAMRA)	SEC ID nº 11
Higromicina-F directo	CAGGCAGGTCTTGCAACGT	SEC ID nº 12
Higromicina-R inverso	CGAGAGCCTGACCTATTGCAT	SEC ID nº 13
Sonda Higromicin-FAM	ACACCCTGTGCACGGCGGG (marcador de 5' = FAM, marcador de 3' = TAMRA)	SEC ID nº 14
Vip3-F directo	ATGAAGACCCTGCGCTACGA	SEC ID nº 15
Vip3-R inverso	ACGCCAGTGGCATGTAGA	SEC ID nº 16
Sonda Vip3-FAM	AGCGAGGCCGAGTACCGCACC (marcador de 5' = FAM, marcador de 3' = TAMRA)	SEC ID nº 17

25 Se dispensaron 7 ul de mezcla maestra en cada pocillo de una placa de ensayo TaqMan™ de 384 pocillos. Se añadieron 3 ul de molde de ADN a los pocillos apropiados. Se añadieron como control a los pocillos específicos 3 ul de series de dilución de control de copia. Las reacciones se llevaron a cabo en un ABI7900 (Applied Biosystems) usando las condiciones de ciclo siguientes:

Etapas	Temperatura	Tiempo
1	50°C	2 min.
2	95°C	10 min.

## ES 2 388 276 T3

3	95°C	15 s
4	60°C	1 min.
5	Vaya a la etapa 3, repítase 40 veces	

Los datos se analizaron usando el software SDS2.0 (Applied Biosystems).

### Ejemplo 3: Detección de COT102 vía PCR

#### 3.1 Extracción de ADN genómico

5 El ADN genómico de COT102 se extrajo como se describe en el Ejemplo 2.1.

#### 3.2 Ensayo de cigosidad de PCR Multiplex

10 Se diseñaron cebadores de PCR para unirse a la secuencia de ADN genómico de algodón en dirección 5' del sitio en el que se insertó el casete de COT102 (SEC ID NO: 18); la propia secuencia del casete de COT102 (SEC ID NO: 19); y la secuencia de ADN genómico de algodón que se sustituyó cuando se insertó la secuencia de COT102 (SEC ID NO: 20). Cuando el inserto de COT102 está presente, los pares de cebadores SEC ID NO: 18 y 19 amplifican un fragmento de PCR de un tamaño de 962 pb. Se montó una reacción de PCR de 50 ul para cada muestra a ensayar, según lo siguiente:

1x JumpState ReadyMix REDTaq PCR (Sigma P-1107)	25 ul
40 pmoles cebador 1 (SEC ID nº 18)	4 ul
40 pmoles cebador 2 (SEC ID nº 19)	4 ul
40 pmoles cebador 3 (SEC ID nº 20)	4 ul
40 ng ADN genómico	4 ul
ddH2O	9 ul

15 Las reacciones de PCR se calentaron en un termociclador a 94°C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos según lo siguiente: 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto. La reacción se completó calentando a 72°C durante 5 minutos.

#### 3.3 Análisis

20 Se llevaron a cabo reacciones de PCR en un gel de agarosa, y las bandas de ADN se visualizaron en luz UV después de teñir con bromuro de etidio. La presencia de 3 bandas indicó que la muestra fue una planta homocigota COT102; 2 bandas (teniendo una de las cuales un tamaño de 962 pb) indicaron que la muestra fue una planta heterocigota COT102; 2 bandas (sin ninguna banda de tamaño de 962 pb) indicaron que la muestra fue una planta de algodón de tipo salvaje homocigota.

#### 3.4 PCR específica del suceso

25 Se diseñó un cebador de PCR para unirse hacia el extremo 3' del gen de VIP3A (SEC ID NO: 3). Se diseñó otro cebador de PCR para unirse a la hebra complementaria de la secuencia de ADN genómico de flaqueo en dirección 3' del extremo del sitio de inserción de COT102 (SEC ID NO: 4). Estos cebadores se usaron juntos en una reacción de PCR usando ADN genómico de COT102, dando como resultado la amplificación de un fragmento de 800 pb.  
30 Cuando los cebadores se usaron en una reacción de PCR usando una muestra de ADN genómico de algodón no transformado Coker312, no se amplificó ningún fragmento.

35 En un segundo par de cebadores, se diseñó un cebador para unirse al gen de higromicina (SEC ID NO: 19), y el otro cebador se diseñó para unirse a la secuencia de ADN genómico de flaqueo en dirección 5' del extremo del sitio de inserción de COT102 (SEC ID NO: 18). Estos cebadores se usaron juntos en una reacción de PCR usando ADN genómico de COT102, dando como resultado la amplificación de un fragmento de 962 pb. Cuando los cebadores se usaron en una reacción de PCR usando una muestra de ADN genómico de algodón no transformado Coker312, no se amplificó ningún fragmento.

**Ejemplo 4: Detección de COT102 vía transferencia Southern**

## 4.1 Extracción de ADN para uso en transferencia Southern

Se molieron aproximadamente 5 a 10 gramos de tejido vegetal en nitrógeno líquido usando un mortero y mano de almirez. El tejido vegetal se resuspendió en 12,5 ml de tampón de extracción A (0,2M de Tris pH 8,0, 50 mM de EDTA, 0,25M de NaCl, 0,1% v/v de B-mercaptoetanol, 2,5% p/v de polivinilpirrolidona), y se centrifugó durante 10 minutos a 4.000 rpm (2755 g). Después de desechar el sobrenadante, el pelete se resuspendió en 2,5 ml de tampón de extracción B (0,2M de Tris pH 8,0, 50 mM de EDTA, 0,5M de NaCl, 1% v/v de B-mercaptoetanol, 2,5% p/v de polivinilpirrolidona, 3% de Sarkosyl, 20% de etanol) y se incubó a 37°C durante 30 minutos. Durante la incubación, la muestra se mezcló una vez con un bucle estéril. Tras la incubación, se añadió un volumen igual de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se mezcló suavemente mediante inversión, y se centrifugó durante 20 minutos a 4.000 rpm. La capa acuosa se recogió, y se añadió 0,54 volúmenes de isopropanol, seguido de centrifugación durante 5 minutos a 4.000 rpm, para precipitar el ADN. El sobrenadante se desechó, y el pelete de ADN se resuspendió en 500 ul de TE. A fin de degradar cualquier ARN presente, el ADN se incubó a 37°C durante 30 minutos con 1 ul de RNasa A 30 mg/ml, se centrifugó durante 5 minutos a 4.000 rpm, y se precipitó mediante centrifugación a 14.000 rpm durante 10 minutos en presencia de 0,5 volúmenes de acetato de amonio 7,5 M y 0,54 volúmenes de isopropanol. Después de desechar el sobrenadante, el pelete se lavó con 500 ul de etanol al 70%, y se dejó secar antes de resuspender en 100 ul de TE.

## 4.2 Digestiones con enzimas de restricción

El ADN se cuantificó usando un espectrofotómetro o fluorómetro (usando 1x TNE y colorante de Hoechst). Las digestiones enzimáticas adecuadas se prepararon usando 8 ug de ADN por digestión en un volumen total de 50 ul. Las digestiones incluyeron *BamHI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *NcoI*, *SacI*, *SalI*, *SpeI* y *PstI*, tanto solos como en combinación. En particular, se usó una digestión doble con *BamHI* y *EcoRI* para detectar que el gen de VIP3A estaba intacto; se usó una digestión doble con *BamHI* y *EcoRI* para detectar el número del locus de VIP3A y que el gen de higromicina estaba intacto; y se usó una digestión con una sola enzima *BamHI* para detectar el número del locus de VIP3A. Las digestiones se incubaron toda la noche a una temperatura apropiada para cada enzima. Las muestras se hicieron girar en vacío a velocidad para reducir el volumen a 30 ul.

## 4.3 Electroforesis en gel

Se añadió colorante de carga de azul de bromofenol a cada muestra procedente de 4.2 anterior, y cada muestra se cargó en un gel de agarosa al 0,8% de TBE que contiene bromuro de etidio. El gel se hizo funcionar a 60 voltios toda la noche.

El gel se lavó en 0,25 M de HCl durante 15 minutos para despurinar el ADN, y después se lavó con agua. Se montó una transferencia Southern según lo siguiente: se colocaron 20 horas de papel de transferencia seco grueso en una bandeja y encima se colocaron 4 hojas de papel de transferencia seco delgado. Una hora del papel de transferencia delgado se prehumedeció en 0,4M de NaOH y se colocó encima del apilamiento, seguido de una hoja de membrana de transferencia Hybond-N+ (Amersham Pharmacia Biotech, #RPN303B), también prehumedecida en 0,4M de NaOH. El gel se colocó encima para asegurarse de que no hubiese burbujas de aire entre el gel y la membrana. Se colocaron tres hojas adicionales de papel de transferencia preempapado sobre la parte superior del gel, y la bandeja de tampón se llenó con 0,4M de NaOH. La conexión del apilamiento de gel con la bandeja de tampón usando una mecha preempapada en 0,4M de NaOH comenzó la transferencia de ADN a la membrana. La transferencia de ADN tuvo lugar durante aproximadamente 4 horas a temperatura ambiente. Después de la transferencia, la membrana Hybond se aclaró en 2x SSC durante 10 segundos, y el ADN se unió a la membrana vía reticulación mediante UV.

## 4.4 Hibridación

Se preparó una sonda de ADN adecuada mediante PCR. Se hirvieron 25 ng de ADN de sonda en 45 ul de TE durante 5 minutos, se colocó en hielo durante 7 minutos y después se transfirió a un tubo de Rediprime II (Amersham Pharmacia Biotech, #RPN1633). Tras añadir 5 ul de dCTP marcado con P32 al tubo de Rediprime, la sonda se incubó a 37°C durante 15 minutos. La sonda se purificó mediante centrifugación a través de una columna G50 de microrrotación (Amersham Pharmacia Biotech, #27-5330-01) según las instrucciones del fabricante para eliminar dNTPs no incorporados. La actividad de la sonda se midió usando un contador de centelleo.

La membrana Hybond se prehibridó humedeciendo con 20 ml de disolución de prehibridación Church precalentada (500 mM de NaPO<sub>4</sub>, 1 mM de EDTA, 7% de SDS, 1% de BSA) a 65°C durante 30 minutos. La sonda marcada se hirvió durante 5 minutos, y se colocó en hielo durante 10 minutos. Se añadió una cantidad apropiada de sonda (1 millón de recuentos por 1 ml de tampón de prehibridación) al tampón de prehibridación, y la hibridación transcurrió a 65°C toda la noche. Al siguiente día, el tampón de hibridación se desechó y le siguió un aclarado con 20 ml de disolución de lavado de Church 1 (40 mM de NaPO<sub>4</sub>, 1 mM de EDTA, 5% de SDS, 0,5% de BSA), y la membrana se lavó en 150 ml de disolución de lavado de Church 1 a 65°C durante 20 minutos. Este procedimiento se repitió dos veces con disolución de lavado de Church 2 (40 mM de NaPO<sub>4</sub>, 1 mM de EDTA, 1% de SDS). La membrana se expuso a una pantalla de fósforo o a una película de rayos X, para detectar dónde se unió la sonda.

**Ejemplo 5: Detección de COT102 vía ELISA**

## 5.1 extracción proteica

5 El tejido de algodón para análisis se cosechó y se congeló a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Se molió tejido fresco hasta un polvo fino, y se pesó en un tubo de polipropileno marcado. Se añadió a la muestra tampón de extracción (100 mM de Tris, 100 mM de borato de sodio, 5 mM de MgCl, 0,05% de Tween 20, 0,2% de ascorbato de sodio, agua, pH 7.8, 1 mM de AEBSF, 0,001 mM de leupeptina) en una relación de 2:1 (volumen de tampón de extracción: peso de muestra fresca) para tejido fresco, o 30:1 (volumen de tampón de extracción: peso de muestra seca) para tejido liofilizado. La muestra se sometió a vórtice y se homogeneizó usando un Brinkman PT 10/35 Polytron equipado con un generador reductor de espuma PTA 10TS, hasta que la mezcla se licuó. Los extractos se centrifugaron a  $10.000 \times g$  durante 15 minutos. El sobrenadante del extracto proteico se almacenó a  $2-8^{\circ}\text{C}$ .

## 5.2 Protocolo de ELISA

15 El procedimiento de ELISA usó técnicas estándar según lo siguiente. Se empapó una placa de 96 pocillos en etanol durante 2 horas, y se secó al aire. La placa se revistió con 50 ul de anticuerpo anti-VIP3A de cabra por pocillo, y se incubó toda la noche a  $2-8^{\circ}\text{C}$ . Después de lavar tres veces con disolución de lavado 1X de ELISA (100 mM de Tris, 0,5% de Tween 20, 75 mM de NaCl, pH 8,5), la placa se secó brevemente dando golpecitos hacia arriba y hacia abajo en una toalla de papel. Se añadieron a cada pocillo 150 ul de disolución de bloqueo (10 mM de  $\text{NaPO}_4$ , 140 mM de NaCl, 1% de BSA, 0,02% de azida sódica, valorado hasta pH 7,4 con NaPi monobásico y NaPi dibásico), seguido de la incubación a temperatura ambiente durante 45 minutos. La placa se lavó 3 veces como se describe anteriormente.

25 Patrones de VIP3A y muestras de extracto proteico se aplicaron a pocillos apropiados de la placa por triplicado, 50 ul de volumen total por pocillo. La placa se incubó a  $2-8^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora 30 minutos, seguido de temperatura ambiente durante otros 30 minutos. La placa se lavó tres veces con disolución de lavado de ELISA, y después se incubó a  $35-39^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora con 50 ul de anticuerpo anti-VIP3A de conejo, por pocillo. La placa se lavó tres veces con disolución de lavado de ELISA, y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos con 50 ul de fosfatasa alcalina de anti-conejo de burro, por pocillo. Tras tres lavados adicionales con disolución de lavado de ELISA, se añadieron 50 ul de disolución de sustrato de fosfatasa por pocillo, y la placa se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo añadiendo 50 ul de 3M de NaOH por pocillo. La absorbancia de la disolución en cada pocillo se midió a 405 nm, usando un lector de placas de múltiples pocillos Ceres 900C, y los resultados se analizaron usando el software de ajuste de curvas KC3 (Bio-Tek Instruments Inc.). La concentración de VIP3A en la muestra se calculó mediante referencia a los patrones de proteína VIP3A.

**Ejemplo 6: Detección de COT102 vía DipStick**

## 6.1 Extracción proteica

35 Se colocó un trozo de tejido de hoja de aproximadamente  $2 \text{ cm}^2$  en un tubo que contiene tampón de extracción. Para extraer la proteína del tejido se usó un agitador plástico, cortando y macerando el tejido.

## 6.2 Ensayo Dipstick

40 Se colocó una tira de ensayo en el tubo y se incubó durante 5-10 minutos para que el resultado se desarrollase. La tira de ensayo comprendió una primera banda a la que se unió el anticuerpo anti-VIP3A, y una segunda banda a la que se unió un anticuerpo de control. Tras la incubación, una línea roja doble en la ventana de resultados de la tira de ensayo indicó que estaba presente VIP3A. La línea inferior indicó la presencia de proteína Vip3A, mientras que la línea superior fue un control que indicó que el ensayo estaba funcionando correctamente.

**Ejemplo 7: Detección de COT102 vía bioensayo de insectos**

## 7.1 Bioensayos de hojas

45 Se llevaron a cabo ensayos de hoja en gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*), gusano del algodón (*Helicoverpa zea*) y gusano del tabaco (*Heliothis virescens*), según lo siguiente: se empaparon almohadillas con 300 ul a 500 ul de agua destilada, y se colocaron en placas Gelman. Se cortaron trozos de hoja que miden entre aproximadamente 0,5 pulgadas al cuadrado y 0,75 pulgadas al cuadrado de plantas de algodón de 8 a 12 pulgadas de altura, y se colocaron en las almohadillas. En cada placa y con una tapa, se colocaron entre 8 y 10 larvas de insectos. Las placas se incubaron a  $28^{\circ}\text{C}$ . En los días tercero y sexto tras la infestación, se puntuó el daño a la hoja en cada placa, y se comparó con las plantas de control.

## 7.2 Bioensayos de бага

Se saturaron cuatro almohadillas absorbentes con agua, y se colocaron dentro de una copa de plástico grande. Se colocaron tres filtros de vidrio extragrosos, cada uno empapado con 100 ul de agua destilada, en una copa de

plástico más pequeña, que se situó entonces dentro de la copa más grande. Se cortó una baga de 1,25 pulgadas de longitud, se sumergió en nistatina 10 mg/ml a 20 mg/ml, y se colocó sobre los filtros en la pequeña copa. Se colocaron 50 larvas de insectos en el cuadrado o baga, y se adjuntó una tapa a la copa más grande. Los cuadrados o bagas se reinfestaron con 50 larvas más después de 7 días.

5 El experimento se incubó a temperatura ambiente durante aproximadamente 3 semanas. Las bagas se cortaron entonces, abriéndolas para determinar el daño. El daño a la baga se comparó con las muestras de control.

7.3 Bioensayos de hoja liofilizada

Se llevaron a cabo bioensayos usando tejido de hoja liofilizado sobre *Heliothis virescens*, según lo siguiente:

10 Hojas terminales se congelaron instantáneamente en hielo seco en el momento de la recogida, y se liofilizaron toda la noche. El tejido liofilizado se molió en un mortero y mano de almirez hasta un polvo fino, y se resuspendió en disolución de agar al 0,2% para obtener una suspensión al 8% (0,08 g/ml) de polvo de hoja. La suspensión se depositó encima de la dieta artificial de insectos, en placas de 96 pocillos, y se dejó secar. En cada pocillo se introdujo una única larva de insecto neonato, y las placas se cerraron herméticamente. Las placas se incubaron a 28°C. En el sexto día después de la infestación, se puntuó la mortalidad de las larvas y se comparó con las muestras de control. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

15

variedad	% de suspensión de polvo de hoja	% de mortalidad larvaria (media de 5 ensayos)
Coker312	8	6,7
COT102	8	98,3

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> SYNGENTA LIMITED

20 <120> ALGODÓN INSECTICIDA COT102

<130> 70159

<160> 25

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

25 <211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> motivo nucleotídico COT102

30 <400> 1

**ggcaaatatt caggtaaaca aattga**  
26

<210> 2

<211> 26

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> motivo nucleotídico COT102

<400> 2

**ctatcagtgt ttaataaata tgggca**  
**26**

<210> 3

5 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> motivo nucleotídico COT102

10 <400> 3

**aaggacgtga gcgagatggt**  
**20**

<210>4

<211> 20

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> motivo nucleotídico COT102

<400> 4

**tgtgacaccg atccacctaa**  
**20**

20 <210> 5

<211> 290

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> motivo nucleotídico COT102

<400> 5

ES 2 388 276 T3

gacaaggaca gcttgagcga ggtgatctac ggcgacatgg acaagctgct gtgtccggac  
60

cagagcagagc aaatctacta caccaacaac atcgtgttcc cgaacgagta cgtgatcacc  
120

aagatcgact tcaccaagaa gatgaagacc ctgcgctacg aggtgaccgc caacttctac  
180

gacagcagca ccggcgagat cgacctgaac aagaagaagg tggagagcag cgaggccgag  
240

taccgcaccc tgagcgcgaa cgacgacggc gtctacatgc cactgggcgt  
290

<210> 6

<211> 347

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> motivo nucleotídico COT102

<400> 6

cgccgtgcac aggggtgcac gttgcaagac ctgcctgaaa ccgaactgcc cgctgttctg  
60

cagccggtcg cggaggccat ggatgcgatc gctgcggccg atcttagcca gacgagcggg  
120

ttcggcccat tcggaccgca aggaatcggg caatacacta atggcgtgat ttcatatgcg  
180

cgattgctga tccccatgtg tctcactggc aaactgtgat ggacgacacc gtcagtgcgt  
240

ccgtcgcgca ggctctcgat gagctgatgc tttgggcccga ggactgcccc gaagtccggc  
300

acctcgtgca cgcggatttc ggctccaaca atgtcctgac ggacaat  
347

10 <210> 7

<211> 7474

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> motivo nucleotídico COT102

<400> 7

ES 2 388 276 T3

gtaaacaat tgacgcttag acaacttaat aacacattgc ggacgttttt aatgtacgcc  
60

atgctggccg cccggggtac ccaattcccg atctagtaac atagatgaca ccgcgcgcga  
120

taatttatcc tagtttgccg gctatatattt gttttctatc gcgtattaaa tgtataattg  
180

cgggactcta atcataaaaa cccatctcat aaataacgtc atgcattaca tgttaattat  
240

tacatgctta acgtaattca acagaaatta tatgataatc atcgcaagac cggcaacagg  
300

attcaatctt aagaaacttt attgccaat gtttgaacga tcggggaaat tcggggatcc  
360

cggtcggcat ctactctatt cctttgcctt cggacgagtg ctggggcgtc ggtttccact  
420

atcggcgagt acttctacac agccatcggc ccagacggcc gcgcttctgc gggcgatttg  
480

tgtacgcccc acagtcccgg ctccggatcg gacgattgcg tcgcatcgac cctgcgcccc  
540

agctgcatca tcgaaattgc cgtcaaccaa gctctgatag agttgggtcaa gaccaatgcg  
600

gagcatatac gcccgagacc gcggcgatcc tgcaagctcc ggatgcctcc gctcgaagta  
660

gcgcgtctgc tgctccatac aagccaacca cggcctccag aagaagatgt tggcgacctc  
720

gtattgggaa tccccgaaca tcgcctcgct ccagtcaatg accgctgtta tgcggccatt  
780

gtccgtcagg acattggtgg agccgaaatc cgcgtgcacg aggtgccgga cttcggggca  
840

gtcctcggcc caaagcatca gctcatcgag agcctgcgcg acggacgcac tgacgggtgc  
900

gtccatcaca gtttgccagt gatacacatg gggatcagca atcgcgcata tgaaatcacg  
960

ccatgtagtg tattgaccga ttccttgcgg tccgaatggg ccgaaccgcg tcgtctggct  
1020

aagatcggcc gcagcgatcg catccatggc ctccgcgacc ggctgcagaa cagcgggcag  
1080

ttcggtttca ggcaggctctt gcaacgtgac accctgtgca cggcgggaga tgcaataggt  
1140

caggctctcg ctgaatgcc caatgtcaag cacttccgga atcgggagcg cggccgatgc  
1200

aaagtgccga taaacataac gatctttgta gaaaccatcg ggcagctat ttaccgcgag  
1260

gacatatcca cgccctccta catcgaagct gaaagcacga gattcttcgc cctccgagag  
1320

ctgcatcagg tcggagacgc tgtcgaactt ttcgatcaga aacttctcga cagacgtcgc  
1380

ggtgagttca ggctttttca tatcttattg cccccctaga gtcgagatcc acctgaaata  
1440

aaacaataga acaagtagaa accaatcagc gaacatatac caaatcaaaa gccgtaagag  
1500

aatcaaaaac aacaccaaag agaaacggat ctaaacataa gaaacctaaa acagagagaa  
1560

tcgaacaaag aaaacacaaa aattgaatag atcgtccttg aaaatcctaa tttcacaatc  
1620

aagcaagaaa ttacacagat gtaaactacta cgaatcgata tottagtaat caggacaaaa  
1680

tttagaagct ggattgacga aacgaacaat attgtcaaaa gcaatttata caaaagattc  
1740

aataatccac ataacaaaaa ttggagatca gatacgaatc aaaaacaaaa agaatcagaa  
1800

aatatacctt gaaagagaga gtcgcgagag atttgcagag atcgctttag gctttgggag  
1860

agattgaaga gtcagaaaaa gacgaaagga tgaattatta tcttccacac gaaggtcttc  
1920

tttatatcgc aaacccaaaag cccaaaaccg tcttttctat taatgagaat aaaatatctt  
1980

tagccaaaac aaaaaaagga agatatcagt tgaggattat tatcacgaaa ctaaaggaag  
2040

gaatcatatg atacgtgtca tattttccac cgtgcgtttt taaaagaccg actcaagtag  
2100

aacatccta tgggtggtggt tggattaggt catccattac atctgcttca ctgacatttt  
2160

tctatttttc tttttgtata tacttttctt caaataattt ctttcttttc tatagaagaa  
2220

tttaatcaat aaggaaaaag ttcaaaaaag attctttcca ttaagactat gtcttggtta  
2280

accaaccca ttaagaataa gcaatcataa tatatataga gaataactaat actatatatg  
2340

agatttttct ttttaatttca tgttgattat gatagtttat cttcttgatt taatttatca  
2400

atacttggca taaaagattc taatctactc taataaagaa aagaaaaaaa agtatctacc  
2460

attgactaat taaaataagg aaacttatct accaaatttg agtatttttt agaacaatct  
2520

ttttggttta attccaaaac tctaaaccta attgttggga aaaaggacct aatttttaag  
2580

aaaagttaat aattagaaga tctgtatggt tttttttgat ccaagttttt atttcttttc  
2640

tcttttttct atgataaaaat ctatgttttt ttagtctaca attaaagtaa ttgttattat  
2700

tttctttatc tttttttggt gttggtgta attccctttt ttttttttaa cagcaacttc  
2760

ttaaaaaaaa aaacagttgg gccttgaatt tatttcaggc ctgcgttatt aagcccagat  
2820

aataactcaa aacaaaaaaa atgttgaacc ggaataaacc cgcgagatta aatgccggtt  
2880

ttcaggtaac atagaagaag aatatatgag gattgaagaa gtattcaaga ggcggaacaa  
2940

ttcacaagtc caagagctta aatttctcct cactcttctg ctacagactc ggaactcttt  
3000

ctctttgcta aaataagatg ttcaggattt ttggtgcccg acaattcatg tatctcacac  
3060

tctctctctt ctctgttctt actactctgt tacattacca ccaactcaag actttcttcc  
3120

acaatggcgt ttatgagact tggctccaaa tccgggtaccg gagctcgaat tcgaagcttg  
3180

catgcctgca gtgatcacca tggctcgaaa aatttagaac gaacttaatt atgatctcaa  
3240

atacattgat acatatctca tctagatcta ggttatcatt atgtaagaaa gttttgacga  
3300

atatggcacg acaaaatggc tagactcgat gtaattggta tctcaactca acattatact  
3360

tataccaaac attagttaga caaaatttaa acaactattt tttatgtatg caagagtcag  
3420

catatgtata attgattcag aatcgttttg acgagttcgg atgtagtagt agccattatt  
3480

taatgtacat actaatcgtg aatagtgaat atgatgaaac attgtatctt attgtataaa  
3540

tatccataaa cacatcatga aagacacttt ctttcacggg ctgaattaat tatgatataa  
3600

ttctaataga aaacgaatta aattacgttg aattgtatga aatctaattg aacaagccaa  
3660

ccacgacgac gactaacggt gcctggattg actcggttta agttaaccac taaaaaacg  
3720

gagctgtcat gtaacacgcg gatcgagcag gtcacagtca tgaagccatc aaagcaaaag  
3780

aactaatcca agggctgaga tgattaatta gtttaaaaat tagttaaacac gagggaaaag  
3840

gctgtctgac agccagggtca cgttatcttt acctgtggtc gaaatgattc gtgtctgtcg  
3900

atthtaatta ttttttgaa aggccgaaaa taaagttgta agagataaac ccgcctatat  
3960

aaattcatat atthtctctt ccgctttgaa ttgtctcgtt gtcctctca ctttcatcag  
4020

ccgttttgaa tctccggcga cttgacagag aagaacaagg aagaagacta agagagaaaag  
4080

taagagataa tccaggagat tcattctccg ttttgaatct toctcaatct catcttcttc  
4140

cgctctttct ttccaaggta ataggaactt tctggatcta ctttatttgc tggatctcga  
4200

tcttgtttcc tcaatttctt tgagatctgg aattcgttta atttggatct gtgaacctcc  
4260

actaaatctt ttggttttac tagaatcgat ctaagttgac cgatcagtta gctcagattat  
4320

agctaccaga atttggcttg accttgatgg agagatccat gttcatgtta cctgggaaat  
4380

gatttgtata tgtgaattga aatctgaact gttgaagtta gattgaatct gaacactgtc  
4440

aatgttagat tgaatctgaa cactgtttaa ggttagatga agtttgtgta tagattcttc  
4500

gaaactttag gatttgtagt gtcgtacgtt gaacagaaaag ctatttctga ttcaatcagg  
4560

gtttatttga ctgtattgaa ctctttttgt gtgtttgcag ctcataaaaa ggatccacca  
4620

tgaacaagaa caacaccaag ctgagcaccg gcgccctgcc gagcttcacg gactacttca  
4680

acggcatcta cggcttcgcc accggcatca aggacatcat gaacatgatc ttcaagaccg  
4740

acaccggcgg cgacctgacc ctggacgaga tcctgaagaa ccagcagctg ctgaacgaca  
4800

tcagcggcaa gctggacggc gtgaacggca gcctgaacga cctgatcgcc cagggcaacc  
4860

tgaacaccga gctgagcaag gagatcctta agatcgccaa cgagcagaac caggtgctga  
4920

acgacgtgaa caacaagctg gacgccatca acaccatgct gcgcgtgtac ctgccgaaga  
4980

tcaccagcat gctgagcgcg gtgatgaagc agaactacgc cctgagcctg cagatcgagt  
5040

acctgagcaa gcagctgcag gagatcagcg acaagctgga catcatcaac gtgaacgtcc  
5100

tgatcaacag caccctgacc gagatcacc cggcctacca gcgcatcaag tacgtgaacg  
5160

agaagttcga agagctgacc ttcgccaccg agaccagcag caaggtgaag aaggacggca  
5220

gcccggccga catcctggac gagctgaccg agctgaccga gctggcgaag agcgtgacca  
5280

agaacgacgt ggacggcttc gagttctacc tgaacacctt ccacgacgtg atggtgggca  
5340

acaacctgtt cggccgcagc gccctgaaga ccgccagcga gctgatcacc aaggagaacg  
5400

tgaagaccag cggcagcgag gtgggcaacg tgtacaactt cctgatcgtg ctgaccgccc  
5460

tgcaggccca ggccttctg accctgacca cctgtcgcga gctgctgggc ctggccgaca  
5520

tcgactacac cagcatcatg aacgagcact tgaacaagga gaaggaggag ttccgcgtga  
5580

acatcctgcc gaccctgagc aacaccttca gcaacccgaa ctacgccaaag gtgaagggca  
5640

gcgacgagga cgccaagatg atcgtggagg ctaagccggg ccacgcgttg atcggcttcg  
5700

agatcagcaa cgacagcatc accgtgctga aggtgtacga ggccaagctg aagcagaact  
5760

accaggtgga caaggacagc ttgagcgagg tgatctacgg cgacatggac aagctgctgt  
5820

gtccggacca gagcgagcaa atctactaca ccaacaacat cgtgttcccg aacgagtacg  
5880

tgatcaccaa gatcgacttc accaagaaga tgaagacctt gcgctacgag gtgaccgcca  
5940

acttctacga cagcagcacc ggcgagatcg acctgaacaa gaagaaggtg gagagcagcg  
6000

aggccgagta ccgcaccctg agcgcgaacg acgacggcgt ctacatgcca ctgggcgtga  
6060

tcagcgagac cttcctgacc ccgatcaacg gctttggcct gcaggccgac gagaacagcc  
6120

gcctgatcac cctgacctgt aagagctacc tgccgcgagct gctgctagcc accgacctga  
6180

gcaacaagga gaccaagctg atcgtgccac cgagcggctt catcagcaac atcgtggaga  
6240

acggcagcat cgaggaggac aacctggagc cgtggaaggc caacaacaag aacgcctacg  
6300

tggaccacac cggcggcgtg aacggcacca aggcacctgta cgtgcacaag gacggcggca  
6360

tcagccagtt catcggcgac aagctgaagc cgaagaccga gtacgtgatc cagtacaccg  
6420

tgaagggcaa gccatcgatt cacctgaagg acgagaacac cggctacatc cactacgagg  
6480

acaccaacaa caacctggag gactaccaga ccatcaacaa gcgcttcacc accggcaccg  
6540

acctgaaggg cgtgtacctg atcctgaaga gccagaacgg cgacgaggcc tggggcgaca  
6600

acttcatcat cctggagatc agcccgagcg agaagctgct gagcccggag ctgatcaaca  
6660

ccaacaactg gaccagcacc ggcagcacca acatcagcgg caacaccctg acctgtacc  
6720

agggcggccg cggcatcctg aagcagaacc tgcagctgga cagcttcagc acctaccgcg  
6780

tgtacttcag cgtgagcggc gacgccaacg tgcgcatccg caactccogc gaggtgctgt  
6840

tcgagaagag gtacatgagc ggcgccaaag acgtgagcga gatgttcacc accaagttcg  
6900

agaaggacaa cttctacatc gagctgagcc agggcaacaa cctgtacggc ggcccgatcg  
6960

tgcacttcta cgacgtgagc atcaagtagg agctctagat ccccgaattt ccccgatcgt  
7020

tcaaacattt ggcaataaag tttcttaaga ttgaatcctg ttgccggtct tgcgatgatt  
7080

atcatataat ttctgttgaa ttacgttaag catgtaataa ttaacatgta atgcatgacg  
7140

ttatztatga gatgggtttt tatgattaga gtcccgcaat tatacattta atacgcgata  
7200

gaaaacaaaa tatagcgcgc aaactaggat aaattatcgc gcgcggtgtc atctatgtta  
7260

ES 2 388 276 T3

ctagatcggg aattgggtac cgagctcgaa ttcggcgcgc ccaattgatt taaatggccg  
7320

ctgcgcccaa ttcctgcagc gttgcggttc tgtcagttcc aaacgtaaaa cggcttgtcc  
7380

cgcgtcacgc gcgggggtca taactgact cccttaattc tccgctcatg atcagattgt  
7440

cgtttccgc cttcagttta aactatcagt gttt  
7474

<210> 8

<211>789

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> motivo proteico VIP3A

<400> 8

Met Asn Lys Asn Asn Thr Lys Leu Ser Thr Arg Ala Leu Pro Ser Phe  
1 5 10 15

Ile Asp Tyr Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Lys Asp  
20 25 30

Ile Met Asn Met Ile Phe Lys Thr Asp Thr Gly Gly Asp Leu Thr Leu  
35 40 45

Asp Glu Ile Leu Lys Asn Gln Gln Leu Leu Asn Asp Ile Ser Gly Lys  
50 55 60

Leu Asp Gly Val Asn Gly Ser Leu Asn Asp Leu Ile Ala Gln Gly Asn  
65 70 75 80

Leu Asn Thr Glu Leu Ser Lys Glu Ile Leu Lys Ile Ala Asn Glu Gln  
85 90 95

Asn Gln Val Leu Asn Asp Val Asn Asn Lys Leu Asp Ala Ile Asn Thr  
100 105 110

Met Leu Arg Val Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Ser Met Leu Ser Asp Val  
 115 120 125

Met Lys Gln Asn Tyr Ala Leu Ser Leu Gln Ile Glu Tyr Leu Ser Lys  
 130 135 140

Gln Leu Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Ile Ile Asn Val Asn Val  
 145 150 155 160

Leu Ile Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ala Tyr Gln Arg Ile  
 165 170 175

Lys Tyr Val Asn Glu Lys Phe Glu Glu Leu Thr Phe Ala Thr Glu Thr  
 180 185 190

Ser Ser Lys Val Lys Lys Asp Gly Ser Pro Ala Asp Ile Leu Asp Glu  
 195 200 205

Leu Thr Glu Leu Thr Glu Leu Ala Lys Ser Val Thr Lys Asn Asp Val  
 210 215 220

Asp Gly Phe Glu Phe Tyr Leu Asn Thr Phe His Asp Val Met Val Gly  
 225 230 235 240

Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr Ala Ser Glu Leu Ile  
 245 250 255

Thr Lys Glu Asn Val Lys Thr Ser Gly Ser Glu Val Gly Asn Val Tyr  
 260 265 270

Asn Phe Leu Ile Val Leu Thr Ala Leu Gln Ala Gln Ala Phe Leu Thr  
 275 280 285

Leu Thr Thr Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ala Asp Ile Asp Tyr Thr  
 290 295 300

Ser Ile Met Asn Glu His Leu Asn Lys Glu Lys Glu Glu Phe Arg Val  
 305 310 315 320

Asn Ile Leu Pro Thr Leu Ser Asn Thr Phe Ser Asn Pro Asn Tyr Ala

ES 2 388 276 T3

				325						330						335
Lys	Val	Lys	Gly	Ser	Asp	Glu	Asp	Ala	Lys	Met	Ile	Val	Glu	Ala	Lys	
			340					345					350			
Pro	Gly	His	Ala	Leu	Ile	Gly	Phe	Glu	Ile	Ser	Asn	Asp	Ser	Ile	Thr	
		355					360					365				
Val	Leu	Lys	Val	Tyr	Glu	Ala	Lys	Leu	Lys	Gln	Asn	Tyr	Gln	Val	Asp	
	370					375					380					
Lys	Asp	Ser	Leu	Ser	Glu	Val	Ile	Tyr	Gly	Asp	Met	Asp	Lys	Leu	Leu	
385					390					395					400	
Cys	Pro	Asp	Gln	Ser	Glu	Gln	Ile	Tyr	Tyr	Thr	Asn	Asn	Ile	Val	Phe	
				405					410					415		
Pro	Asn	Glu	Tyr	Val	Ile	Thr	Lys	Ile	Asp	Phe	Thr	Lys	Lys	Met	Lys	
			420						425					430		
Thr	Leu	Arg	Tyr	Glu	Val	Thr	Ala	Asn	Phe	Tyr	Asp	Ser	Ser	Thr	Gly	
		435					440					445				
Glu	Ile	Asp	Leu	Asn	Lys	Lys	Lys	Val	Glu	Ser	Ser	Glu	Ala	Glu	Tyr	
	450					455					460					
Arg	Thr	Leu	Ser	Ala	Asn	Asp	Asp	Gly	Val	Tyr	Met	Pro	Leu	Gly	Val	
465					470					475					480	
Ile	Ser	Glu	Thr	Phe	Leu	Thr	Pro	Ile	Asn	Gly	Phe	Gly	Leu	Gln	Ala	
				485					490					495		
Asp	Glu	Asn	Ser	Arg	Leu	Ile	Thr	Leu	Thr	Cys	Lys	Ser	Tyr	Leu	Arg	
			500					505					510			
Glu	Leu	Leu	Leu	Ala	Thr	Asp	Leu	Ser	Asn	Lys	Glu	Thr	Lys	Leu	Ile	
		515					520					525				
Val	Pro	Pro	Ser	Gly	Phe	Ile	Ser	Asn	Ile	Val	Glu	Asn	Gly	Ser	Ile	
	530					535					540					

ES 2 388 276 T3

Glu Glu Asp Asn Leu Glu Pro Trp Lys Ala Asn Asn Lys Asn Ala Tyr  
 545 550 555 560

Val Asp His Thr Gly Gly Val Asn Gly Thr Lys Ala Leu Tyr Val His  
 565 570 575

Lys Asp Gly Gly Ile Ser Gln Phe Ile Gly Asp Lys Leu Lys Pro Lys  
 580 585 590

Thr Glu Tyr Val Ile Gln Tyr Thr Val Lys Gly Lys Pro Ser Ile His  
 595 600 605

Leu Lys Asp Glu Asn Thr Gly Tyr Ile His Tyr Glu Asp Thr Asn Asn  
 610 615 620

Asn Leu Glu Asp Tyr Gln Thr Ile Asn Lys Arg Phe Thr Thr Gly Thr  
 625 630 635 640

Asp Leu Lys Gly Val Tyr Leu Ile Leu Lys Ser Gln Asn Gly Asp Glu  
 645 650 655

Ala Trp Gly Asp Asn Phe Ile Ile Leu Glu Ile Ser Pro Ser Glu Lys  
 660 665 670

Leu Leu Ser Pro Glu Leu Ile Asn Thr Asn Asn Trp Thr Ser Thr Gly  
 675 680 685

Ser Thr Asn Ile Ser Gly Asn Thr Leu Thr Leu Tyr Gln Gly Gly Arg  
 690 695 700

Gly Ile Leu Lys Gln Asn Leu Gln Leu Asp Ser Phe Ser Thr Tyr Arg  
 705 710 715 720

Val Tyr Phe Ser Val Ser Gly Asp Ala Asn Val Arg Ile Arg Asn Ser  
 725 730 735

Arg Glu Val Leu Phe Glu Lys Arg Tyr Met Ser Gly Ala Lys Asp Val  
 740 745 750

Ser Glu Met Phe Thr Thr Lys Phe Glu Lys Asp Asn Phe Tyr Ile Glu  
 755 760 765

Leu Ser Gln Gly Asn Asn Leu Tyr Gly Gly Pro Ile Val His Phe Tyr  
770 775 780

Asp Val Ser Ile Lys  
785

<210> 9

<211> 20

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> motivo nucleotídico COT102

<400> 9

**ggccctgga tacggtgtca**  
20

10 <210> 10

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> motivo nucleotídico COT102

<400> 10

**ttgaggggtg gatcctttgc**  
20

<210> 11

<211> 27

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> motivo nucleotídico COT102

<220>

25 <221> base\_modificada

<222> (1)..(1)

<223> marcador TET en el extremo 5'

<220>

<221> base\_modificada

30 <222> (27)..(27)

<223> marcador TAMRA en el extremo 3'

<400> 11

**ccaacatcat caatggtggc atcgaat**  
**27**

<210> 12

5 <211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> motivo nucleotídico COT102

10 <400> 12

**caggcaggtc ttgcaacgt**  
**19**

<210> 13

<211> 21

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> motivo nucleotídico COT102

<400> 13

**cgagagcctg acctattgca t**  
**21**

20 <210> 14

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> motivo nucleotídico COT102

<220>

<221> base\_modificada

<222> (1)..(1)

<223> marcador FAM en el extremo 5'

30 <220>

<221> base\_modificada

<222> (19)..(19)

<223> marcador TAMRA en el extremo 3'

<400> 14

**acaccctgtg cacggcggg**  
**19**

<210> 15

<211> 20

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> motivo nucleotídico COT102

<400> 15

**atgaagaccc tgcgctacga**  
**20**

10

<210> 16

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> motivo nucleotídico COT102

<400> 16

**acgcccagtg gcatgtaga**  
**19**

<210> 17

20 <211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> motivo nucleotídico COT102

25 <220>

<221> base\_modificada

<222> (1)..(1)

<223> marcador FAM en el extremo 5'

<220>

30 <221> base\_modificada

<222> (21)..(21)

<223> marcador TAMRA en el extremo 3'

<400> 17

**agcgaggccg agtaccgcac c**  
**21**

<210> 18

<211> 19

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> motivo nucleotídico COT102

<400> 18

**ccaacctatt ctccctctc**  
**19**

10 <210> 19

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> motivo nucleotídico COT102

<400> 19

**gtatatgctc cgcattggt**  
**19**

<210> 20

<211> 19

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> motivo nucleotídico COT102

<400> 20

**gtggtgcatt agaagatgt**  
**19**

25 <210> 21

<211> 9356

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> motivo nucleotídico COT102

<400> 21

ES 2 388 276 T3

ctatagggca cgcgtggtcg acggccggg ctggtgtcga aactactttg taatatacaa  
60

ccaccttttc agttaaattg catccctaatt tctagccatg ccatgcattt agatattacc  
120

tgaatatttc aatcaaaatc catttccaaa tcatgtaagt .accagcacac aaacaattcc  
180

aactaagttc attgatgagc tccactcaac tattttaaag aaaatctacc ccaatcctta  
240

ctgatgagtg aaagcaccta gcagtgtgaa aagaaaacca aatatgcatt gatccatgga  
300

cagactaata tgcaacacct tagcactaga taaaatgcaa gacttttcac tctaaatag  
360

accatggtct tctagttaaa attgatgta attgaacca gtgtctctta ctttcgattc  
420

tattagaaaa cacacaacaa tgccatacaa actgcatttt tccctgaaaa aagaaaatca  
480

aacagcaatt gtataaggaa agtggcctta aatatatatt aactgaagat taaatgaaaa  
540

cagccaagtg ttcaagtaat tggaaacagc tattccctga ccttaaatat ataaaaaac  
600

tgtagattaa aggatatcaa cctcatttaa cactcaagat caaacttacc agtaaacaga  
660

gagtaggctt cccctaacat acctatatct tgacagttca gaaaattaca gcataacttt  
720

ttcacattgt cctaatacaa tttctaaata catcaaactt tggcaactta gaacaaacct  
780

aataaactgc tccaacttgg gcatggacag caaatgtaga tatggacaac tttgacccaa  
840

aattcaaaga taaaggcca aaagtggaac cactactagg gtcttttagt cgtaagtgtg  
900

gagctgcctt atcctaagtt tcccaaacc ttttatgctt catttgaggt tagaatctcg  
960

ggaaggcagg tcttttacia gcgtagcac aatttagttg catcattggt ggtgccaaac  
1020

catttttttc tcaaccaacc tattcttctt ctctgtttta aggtactatt cacagaagaa  
1080

gataggtagt ttttaaggag aattactatc caacattagc aaatagaaac ccaactatct  
1140

gctggcttca aaatgtagcg acagactaat accaaacaaa accatgagat tgtagagaga  
1200

taccttgggt ttgatatgaa tggccgacgt cctcaaaga gaaatcttcg tttctacat  
1260

aattaacaat gccaaagcaa aagatgagta atttggattt tttgaaaaat aaaccaataa  
1320

tacaattcaa atatgaaact ttgaaagaaa acactcattg taagatcaaa aaaggcaaat  
1380

attcaggtaa acaaattgac gcttagacaa cttataaaca cattgoggac gtttttaatg  
1440

tacgccatgc tggccgcccg gggtagccaa ttcccgatct agtaacatag atgacaccgc  
1500

gcgcgataat ttatcctagt ttgcgcgcta tattttgttt tctatcgcgt attaaatgta  
1560

taattgcggg actctaataca taaaaacca tctcataaat aacgtcatgc attacatggt  
1620

aattattaca tgcttaacgt aattcaacag aaattatatg ataatcatcg caagaccggc  
1680

aacaggattc aatcttaaga aactttattg ccaaagtgtt gaacgatcgg ggaaattcgg  
1740

ggatcccggg cgccatctac tctattcctt tgccctcgga cgagtgcggt ggcgtcgggt  
1800

tccactatcg gcgagtactt ctacacagcc atcgggtccag acggccgcgc ttctgcgggc  
1860

gatttggtga cgcccagacag tcccgggtcc ggatcggacg attgcgtcgc atcgaccctg  
1920

cgcccaagct gcatcatcga aattgcgcgc aaccaagctc tgatagagtt ggtcaagacc  
1980

aatgcgggagc atatacggcc ggagccgcgg cgatcctgca agctccggat gcctccgctc  
2040

gaagtagcgc gtctgctgct ccatacaagc caaccacggc ctccagaaga agatgttggc  
2100

gacctcgat tgggaatccc cgaacatcgc ctcgctccag tcaatgaccg ctggtatgcg  
2160

gccattgtcc gtcaggacat tggtggagcc gaaatccgcg tgcacgaggt gccggacttc  
2220

ggggcagtc tggcccaaa gcatcagctc atcgagagcc tgcgcgacgg acgcaactgac  
2280

ggtgctgtcc atcacagttt gccagtgata cacatgggga tcagcaatcg cgcataatgaa  
2340

atcacgccat gtagtgtatt gaccgattcc ttgcgggtccg aatgggcccga acccgctcgt  
2400

ctggctaaga tcggccgcag cgatcgcac catggcctcc gcgaccggct gcagaacagc  
2460

gggcagttcg gtttcaggca ggtcttgcaa cgtgacaccc tgtgcacggc gggagatgca  
2520

ataggtcagg ctctcgctga atgccccaat gtcaagcact tccggaatcg ggagcgcggc  
2580

cgatgcaaag tgccgataaa cataacgac tttgtagaaa ccatcggcgc agctatttac  
2640

ccgcaggaca tatccacgcc ctctacatc gaagctgaaa gcacgagatt cttcgcctc  
2700

cgagagctgc atcaggtcgg agacgctgtc gaacttttcg atcagaaact tctcgacaga  
2760

cgtcgcggtg agttcaggct ttttcatatc ttattgcccc cctagagtcg agatccacct  
2820

gaaataaaac aatagaacaa gtagaaacca atcagcgaac atataccaaa tcaaaagccg  
2880

taagagaaat caaaacaaca ccaaagagaa acggatctaa acataagaaa cctaaaacag  
2940

agagaatcga acaaagaaaa cacaaaaatt gaatagatcg tccttgaaaa tcctaatttc  
3000

acaatcaagc aagaaattac acagatgtaa aactacgaa tcgatatctt agtaatcagg  
3060

acaaaattta gaagctggat tgacgaaacg aacaatattg tcaaaagcaa tttatacaaa  
3120

agattcaata atccacataa caaaaattgg agatcagata cgaatcaaaa acaaaaagaa  
3180

tcagaaaata taccttgaaa gagagagtcg cgagagattt gcagagatcg ctttaggctt  
3240

tgggagagat tgaagagtca gaaaaagacg aaaggatgaa ttattatctt ccacacgaag  
3300

gtcttcttta tatcgcaaac caaaagccca aaaccgtctt ttctattaat gagaataaaa  
3360

tatctttagc caaaacaaaa aaaggaagat atcagttgag gattattatc acgaaactaa  
3420

aggaaggaat catatgatac gtgtcatatt ttccaccgtg cgtttttaaa agaccgactc  
3480

aagtagaaac atcctatggt ggtggttggg ttaggtcatc cattacatct gcttcaactga  
3540

catttttcta tttttctttt tgtatatact tttectcaaa taatttcttt cttttctata  
3600

gaagaattta atcaataagg aaaaagttca aaaaagattc tttccattaa gactatgtct  
3660

tggttaaccc aaccattaa gaataagcaa tcataatata tatagagaat actaatacta  
3720

tatatgagat ttttctttta atttcatggt gattatgata gtttatcttc ttgatttaat  
3780

ttatcaatac ttggcataaa agattcta'at ctactcta'at aaagaaaaga aaaaaagta  
3840

tctaccattg actaattaa ataaggaaac ttatctacca aatttgagta ttttttagaa  
3900

caatcttttt ggtttaattc caaaactcta aacctaattg ttgggaaaaa ggaccttaatt  
3960

tttaagaaaa gttaataatt agaagatctg tatgtttttt tttgatccaa gtttttattt  
4020

cttttctctt tttttcatga taaaatctat gtttttttag tctacaatta aagtaattgt  
4080

tattattttc tttatctttt tttgttggtg ttgtaattc cttttttttt ttttaacagc  
4140

aacttcttaa aaaaaaaaaac agttgggect tgaatttatt tcaggcctgc gttattaagc  
4200

ccagataata actcaaaaca aaaaaaatgt tgaaccggaa taaaccgcg agattaaatg  
4260

ccggttttca ggtaacatag aagaagaata tatgaggatt gaagaagtat tcaagaggcg  
4320

gaacaattca caagtccaag agcttaaatt tctcctcact cttctgctac agactcggaa  
4380

ctctttctct ttgctaaaat aagatgttca ggatttttgt tgcccgacaa ttcattatc  
4440

tcacactctc tctcttctct gttcttacta ctctgttaca ttaccaccaa ctcaagactt  
4500

tcttcacaaa tggcgtttat gagacttggc tccaaatccg gtaccggagc tcgaattcga  
4560

agcttgcatt cctgcagtga tcaccatggt cgacaaaatt tagaacgaac ttaattatga  
4620

tctcaaatac attgatacat atctcatcta gatctagggt atcattatgt aagaaagttt  
4680

tgacgaatat ggcacgacaa aatggctaga ctcgatgtaa ttggatatct aactcaacat  
4740

tataactata ccaaacatta gttagacaaa atttaacaa ctatTTTTTA tgtatgcaag  
4800

agtcagcata tgtataattg attcagaatc gttttgacga gttcggatgt agtagtagcc  
4860

attatttaat gtacatacta atcgtgaata gtgaatatga tgaaacattg tatcttattg  
4920

tataaatatc cataaacaca tcatgaaaga cactttcttt cacggtctga attaattatg  
4980

atacaattct aatagaaaac gaattaaatt acgttgaatt gtatgaaatc taattgaaca  
5040

agccaaccac gacgacgact aacgttgcct ggattgactc ggtttaagtt aaccactaaa  
5100

aaaacggagc tgtcatgtaa cacgcggatc gagcagggtca cagtcatgaa gccatcaaag  
5160

caaaagaact aatccaaggg ctgagatgat taattagttt aaaaattagt taacacgagg  
5220

gaaaaggctg tctgacagcc aggtcacggt atctttacct gtggtcgaaa tgattcgtgt  
5280

ctgtcgtatt taattatTTT tttgaaaggc cgaaaataaa gttgtaagag ataaaccgcg  
5340

ctatataaat tcatatattt tctctccgc tttgaattgt ctcgttgtcc tctcacttt  
5400

catcagccgt tttgaatctc cggcgacttg acagagaaga acaaggaaga agactaagag  
5460

agaaagtaag agataatcca ggagattcat tctccgTTTT gaatcttctt caatctcatc  
5520

ttcttccgct ctttctttcc aaggtaatag gaactttctg gatctacttt atttgctgga  
5580

tctcgatctt gttttctcaa tttccttgag atctggaatt cgtttaattt ggatctgtga  
5640

acctccacta aatcttttgg ttttactaga atcgatctaa gttgaccgat cagttagctc  
5700

gattatagct accagaattt ggcttgacct tgatggagag atccatgttc atgttacctg  
5760

ggaaatgatt tgtatatgtg aattgaaatc tgaactgttg aagttagatt gaatctgaac  
5820

actgtcaatg ttagattgaa tctgaacact gtttaagggtt agatgaagtt tgtgtataga  
5880

ttcttcgaaa ctttaggatt tgtagtgtcg tacggtgaac agaaagctat ttctgattca  
5940

atcagggttt atttgactgt attgaactct ttttgtgtgt ttgcagctca taaaaaggat  
6000

ccaccatgaa caagaacaac accaagctga gcacccgcgc cctgccgagc ttcacgact  
6060

acttcaacgg catctacggc ttcgccaccg gcatcaagga catcatgaac atgatcttca  
6120

agaccgacac cggcggcgcac ctgaccctgg acgagatcct gaagaaccag cagctgctga  
6180

acgacatcag cggcaagctg gacggcgtga acggcagcct gaacgacctg atcgcccagg  
6240

gcaacctgaa caccgagctg agcaaggaga tccttaagat cgccaacgag cagaaccagg  
6300

tgctgaacga cgtgaacaac aagctggacg ccatcaacac catgctgcgc gtgtacctgc  
6360

cgaagatcac cagcatgctg agcgacgtga tgaagcagaa ctacgccttg agcctgcaga  
6420

tcgagtacct gagcaagcag ctgcaggaga tcagcgacaa gctggacatc atcaacgtga  
6480

acgtcctgat caacagcacc ctgaccgaga tcaccccggc ctaccagcgc atcaagtacg  
6540

tgaacgagaa gttcgaagag ctgaccttcg ccaccgagac cagcagcaag gtgaagaagg  
6600

acggcagccc ggccgacatc ctggacgagc tgaccgagct gaccgagctg gcgaagagcg  
6660

tgaccaagaa cgacgtggac ggcttcgagt tctacctgaa caccttccac gacgtgatgg  
6720

tgggcaacaa cctgttcggc cgcagcgcgc tgaagaccgc cagcgagctg atcaccaagg  
6780

agaacgtgaa gaccagcggc agcgaggtgg gcaacgtgta caacttctg atcgtgctga  
6840

ccgccctgca ggcccaggcc ttctgacce tgaccacctg tcgcaagctg ctgggcctgg  
6900

ccgacatcga ctacaccagc atcatgaacg agcacttgaa caaggagaag gaggagtcc  
6960

gcgtgaacat cctgccgacc ctgagcaaca ccttcagcaa cccgaactac gccaaaggta  
7020

agggcagcga cgaggacgcc aagatgatcg tggaggctaa gccgggccac gcgttgatcg  
7080

gcttcgagat cagcaacgac agcatcaccg tgctgaaggt gtacgaggcc aagctgaagc  
7140

agaactacca ggtggacaag gacagcttga gcgaggtgat ctacggcgac atggacaagc  
7200

tgctgtgtcc ggaccagagc gagcaaactc actacaccaa caacatcgtg ttcccgaacg  
7260

agtacgtgat caccaagatc gacttcacca agaagatgaa gaccctgcgc tacgaggtga  
7320

ccgccaaactt ctacgacagc agcaccggcg agatcgacct gaacaagaag aaggtggaga  
7380

gcagcgaggc cgagtaccgc accctgagcg cgaacgacga cggcgtctac atgccactgg  
7440

gcgtgatcag cgagacctc ctgaccccga tcaacggctt tggcctgcag gccgacgaga  
7500

acagccgctt gatcacctg acctgtaaga gctacctgcg cgagctgctg ctagccaccg  
7560

acctgagcaa caaggagacc aagctgatcg tgccaccgag cggcttcac cagcaacatcg  
7620

tggagaacgg cagcatcgag gaggacaacc tggagccgtg gaaggccaac aacaagaacg  
7680

cctacgtgga ccacaccggc ggcgtgaacg gcaccaaggc cctgtacgtg cacaaggacg  
7740

gcggcatcag ccagttcatc ggcgacaagc tgaagccgaa gaccgagtac gtgatccagt  
7800

acaccgtgaa gggcaagcca tcgattcacc tgaaggacga gaacaccggc tacatccact  
7860

acgaggacac caacaacaac ctggaggact accagacat caacaagcgc ttcaccaccg  
7920

gcaccgacct gaagggcgtg tacctgatcc tgaagagcca gaacggcgac gaggcctggg  
7980

gcgacaactt catcatcctg gagatcagcc cgagcgagaa gctgctgagc ccggagctga  
8040

tcaacaccaa caactggacc agcaccggca gcaccaacat cagcggcaac accctgaccc  
8100

tgtaccaggg cggccgcggc atcctgaagc agaacctgca gctggacagc ttcagcacct  
8160

accgcgtgta cttcagcgtg agcggcgagc ccaacgtgcg catccgcaac tcccgcgagg  
8220

tgctgttcga gaagaggtag atgagcggcg ccaaggacgt gagcgagatg ttcaccacca  
8280

agttcgagaa ggacaacttc tacatcgagc tgagccaggg caacaacctg tacggcggcc  
8340

cgatcgtgca cttctacgac gtgagcatca agtaggagct ctagatcccc gaatttcccc  
8400

gatcgttcaa acatttggca ataaagtctt ttaagattga atcctgttgc cggctctgcg  
8460

atgattatca tataatttct gttgaattac gttaagcatg taataattaa catgtaatgc  
8520

atgacgttat ttatgagatg ggtttttatg attagagtcc cgcaattata catttaatac  
8580

gcgatagaaa acaaaatata gcgcgcaaac taggataaat tatcgcgcgc ggtgtcatct  
8640

atgttactag atcgggaatt ggttaccgag ctcgaaattcg gcgcgcccaa ttgatttaaa  
8700

tggccgctgc ggccaattcc tgcagcgttg cggttctgtc agttccaaac gtaaaacggc  
8760

ttgtcccgcg tcatcggcgg ggtcataac gtgactocct taattctccg ctcatgatca  
8820

gattgtcgtt tcccgccttc agtttaaact atcagtgttt aataaatatg ggcaatcttt  
8880

ccctacaccg actgtactgt tactgtaata gactccggcc tagactgatt ctgaattctg  
8940

tctgtttact gactgttact ctagtaaggg gattacacac tgagtttttag taaactcacc  
9000

ccgtttatta actgtgcagg taatccoccaa cattaggtgg atcggtgtca cagaaggact  
9060

cggagacgac cacacaactg cacatgtttt tttatttctg ttatttagtc aagcactttg  
9120

gtttttgatt tgggttgat taaggcctct ttattttctt aaccttttat ttgggaaatt  
9180

tatttagtat gcttaatata tgttagaagt agggcacggg ttcctaaaac aacaattggc  
9240

tttcaaaata tctcgtttcc gtaactggtt aaaagtatgc ttctgcagca aataaggttt  
9300

taaggggaatt aacgtttcac aagttttaaa tggctagagg ttttgagtag taagaa  
9356

<210> 22

<211> 20

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> motivo nucleotídico COT102

<400> 22

gatcgggggtc aggaaggtct  
20

10 <210> 23

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> motivo nucleotídico COT102

<400> 23

cagcatcatg aacgagcact  
20

<210> 24

<211> 20

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> motivo nucleotídico COT102

<400> 24

**cagcgagagc ctgacctatt**  
**20**

5 <210> 25

<211 > 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> motivo nucleotídico COT102

<400> 25

**caggacattg ttggagccga**  
**20**

**REIVINDICACIONES**

1. Un polinucleótido que comprende la secuencia de SEC ID NO: 1 o SEC ID NO: 2.
2. Un polinucleótido según la reivindicación 1, que comprende la secuencia de SEC ID NO: 21.
- 5 3. Un método para detectar material vegetal derivado de una planta que comprende SEC ID NO: 1 ó 2, en el que dicho método comprende:
  - (i) obtener una muestra para análisis;
  - (ii) extraer ADN de la muestra;
  - (iii) poner en contacto el ADN con un par de cebadores diseñados para unirse a un polinucleótido según la reivindicación 1 cuando dicho polinucleótido es monocatenario;
  - 10 (iv) amplificar la región que se encuentra entre los sitios en los que se unen los cebadores; y
  - (v) detectar la presencia del producto de la amplificación; con lo que la presencia del producto de la amplificación es indicativa de que la muestra deriva de una planta que comprende SEC ID NO: 1 ó 2.
4. Un método según la reivindicación 3, en el que el primer cebador tiene la secuencia de SEC ID NO: 3, y el segundo cebador tiene la secuencia de SEC ID NO: 4.
- 15 5. Un método según la reivindicación 3, en el que el primer cebador tiene la secuencia de SEC ID NO: 18, y el segundo cebador tiene la secuencia de SEC ID NO: 19.
6. Un método para detectar material vegetal derivado de una planta que comprende SEC ID NO: 1 ó 2, en el que dicho método comprende:
  - (i) obtener una muestra para análisis;
  - 20 (ii) proporcionar una sonda diseñada para unirse al complemento de un polinucleótido según las reivindicaciones 1 ó 2 cuando dicho polinucleótido es monocatenario;
  - (iii) hibridar dicha sonda con la muestra en condiciones de hibridación restrictivas; y
  - (iv) detectar si la sonda se ha hibridado; con lo que la hibridación de la sonda es indicativa de que la muestra deriva de una planta que comprende SEC ID NO: 1 ó 2.
- 25 7. El uso de un polinucleótido según la reivindicación 1, para detectar material vegetal derivado de una planta que comprende SEC ID NO: 1 ó 2.
- 30 8. Un kit de detección de ADN para detectar la presencia de material vegetal derivado de una planta que comprende SEC ID NO: 1 ó 2 en una muestra, en el que el kit de detección de ADN comprende al menos una molécula de ADN diseñada para unirse al complemento del polinucleótido según la reivindicación 1, en el que dicha al menos una molécula funciona como un cebador o sonda de ADN específico para una planta que comprende SEC ID NO: 1 ó 2 y/o su progenie.