

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 414 657**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2009** **E 09716827 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2013** **EP 2247736**

54 Título: **Acontecimiento de planta de maíz MON87460 y composiciones y procedimientos para la detección del mismo**

30 Prioridad:

29.02.2008 US 32568 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.07.2013

73 Titular/es:

MONSANTO TECHNOLOGY, LLC (100.0%)
800 North Lindbergh Boulevard
St. Louis, MO 63167, US

72 Inventor/es:

BEAZLEY, KIM A.;
CASTIGLIONI, PAOLO;
DIZIGAN, MARK A.;
KELLY, REBECCA A.;
KORTE, JOHN A.;
ROCK, AMANDA y
VOYLES, CHRISTINE

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 414 657 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

Acontecimiento de planta de maíz MON87460 y composiciones y procedimientos para la detección del mismo

Campo de la invención

- 5 Se desvelan en el presente documento células, semillas y plantas transgénicas que incluyen ADN recombinante que expresa una proteína de choque frío que confiere mejor tolerancia al estrés y/o mejor rendimiento a las plantas. La divulgación también incluye procedimientos para preparar, usar y detectar dichas células, semillas y plantas. En particular, la presente invención se refiere a plantas de maíz tolerantes al estrés designadas MON87460, y a procedimientos y composiciones para detectar la presencia de ADN de MON87460 en una muestra.

Antecedentes de la invención

- 10 Se desean plantas transgénicas con rasgos agronómicos mejorados tales como rendimiento, tolerancia a estrés ambiental, resistencia a plagas, tolerancia a herbicidas, composiciones de semilla mejoradas y similares, tanto por los agricultores, como por los productores de semillas. Aunque considerables intentos en el cultivo de plantas han proporcionado aumentos significativos de rasgos deseados, la capacidad para introducir ADN específico en
15 genomas vegetales proporciona oportunidades adicionales para la generación de plantas con rasgos mejorados y/o únicos.

Sumario de la invención

Se proporcionan en el presente documento composiciones y procedimientos relacionados con plantas de maíz transgénicas tolerantes a estrés por déficit de agua designadas MON87460, y descendencia y poblaciones de las mismas.

- 20 En un aspecto, la presente invención proporciona un cromosoma de maíz que comprende un polinucleótido de unión genómica/transgénica de SEC ID N°: 1 y un inserto transgénico heterólogo que comprende un promotor de actina de arroz truncado que está unido operativamente a un gen cspB, en el que un extremo 5' terminal de dicho inserto solapa con un extremo 3' terminal de SEC ID N°: 1. Otro aspecto de la invención es una semilla derivada de una planta de maíz transgénica designada MON87460, o descendencia de la misma, habiéndose depositado semilla
25 representativa de dicha planta de maíz con una remesa enviada el 31 de enero de 2008 a la Colección America de Cultivos Tipo (ATCC) y habiéndosele asignado el N° de Referencia PTA-8910, comprendiendo dicha semilla SEC ID N°: 1. Otro aspecto de la invención comprende plantas descendientes, o semillas, o partes regenerables de las plantas y semillas de la planta MON87460. También se proporcionan en el presente documento plantas descendientes, o semillas, o partes regenerables de las plantas y semillas que comprenden SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 7 o SEC ID N°: 24.

Otro aspecto de la invención proporciona una planta de maíz que tiene un cromosoma que comprende un polinucleótido de unión genómica/transgénica de SEC ID N°: 1 y un inserto transgénico heterólogo que comprende un promotor de actina de arroz truncado que está unido operativamente con un gen cspB, en el que un extremo 5' de dicho inserto solapa con un extremo 3' de SEC ID N°: 1.

- 35 La presente invención también se refiere a una semilla de una planta de maíz que tiene un cromosoma que comprende un polinucleótido de unión genómica/transgénica de SEC ID N°: 1 y un inserto transgénico heterólogo que comprende un promotor de actina de arroz truncado que está unido operativamente con un gen cspB, en el que un extremo 5' de dicho inserto solapa con un extremo 3' de SEC ID N°: 1. Es de particular interés un cromosoma en el que el polinucleótido heterólogo comprende un promotor de actina de arroz truncado para expresión de un gen cspB, y en el que dicho promotor de actina de arroz truncado está adyacente a la secuencia genómica de maíz de SEC ID N°: 5. En ciertas realizaciones, se proporciona un cromosoma de maíz que comprende SEC ID N°: 1 y un inserto transgénico heterólogo que comprende un promotor de actina de arroz truncado que está unido operativamente con un gen cspB. Un extremo 5' del inserto transgénico heterólogo puede solapar con un extremo 3' de SEC ID N°: 1 en ciertas realizaciones. En ciertas realizaciones, el cromosoma de maíz puede comprender SEC
40 ID N°: 7 o SEC ID N°: 24. En ciertas realizaciones, un cromosoma de la invención está localizado dentro de una célula de maíz que también contiene un segundo polinucleótido heterólogo no ligado para expresión de una proteína resistente a glifosato 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato sintasa (CP4 EPSPS). También se proporciona el uso de una semilla de maíz como se ha definido anteriormente para preparar un alimento o producto de pienso procesado, en el que la semilla de maíz tiene un cromosoma que comprende SEC ID N°: 1 y un inserto transgénico heterólogo que
50 comprende un promotor de actina de arroz truncado que está unido operativamente con un gen cspB y en el que el alimento o producto de pienso procesado comprende una cantidad detectable de un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2 o un complemento de las mismas. En ciertas realizaciones, el alimento o producto de pienso comprende harina gruesa de maíz, harina de maíz o gluten de maíz. En ciertas realizaciones, el polinucleótido puede comprender una secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4 o un complemento de las mismas. En otras realizaciones, el polinucleótido puede comprender además una
55 secuencia de nucleótidos contenida en SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7 o SEC ID N°: 24.

Otro aspecto de la invención proporciona un procedimiento de detección de la presencia de SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 2 en una muestra tisular de maíz, comprendiendo el procedimiento:

- 5 (a) poner en contacto la muestra con un par de cebadores de ADN, comprendiendo dicho par de cebadores: i) un primer cebador derivado de secuencia de ADN en el genoma de la planta MON87460 adyacente al sitio de inserción del ADN heterólogo insertado (ADN transgénico) y un segundo cebador derivado del ADN heterólogo insertado; o ii) dos cebadores derivados de secuencia genómica en ambos lados del ADN heterólogo insertado; y el polinucleótido puede comprender además una secuencia de nucleótidos contenida en SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7 o SEC ID N°: 24.

- 10 De acuerdo con otro aspecto de la invención, se usa un par de cebadores de nucleótidos en un procedimiento de detección de ADN, en el que el par de cebadores cuando se usa en un procedimiento de amplificación de ácido nucleico produce un amplicón que contiene una cualquiera de SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 4. La detección de una cualquiera de SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 4 en un amplicón producido de esta manera es diagnóstico de la presencia de ácidos nucleicos de planta de maíz MON87460 en la muestra analizada en el procedimiento de detección. Dichos procedimientos comprenden: (a) poner en contacto la muestra que comprende ADN genómico MON87460 con un par de cebadores de ADN; y (b) realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico, produciendo de este modo un amplicón; y (c) detectar el amplicón, comprendiendo el amplicón SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 4.

- 20 De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporcionan procedimientos para detectar la presencia de ADN que corresponde específicamente al ADN MON87460 de la planta de maíz en una muestra. Dichos procedimientos comprenden: (a) poner en contacto la muestra que comprende ADN MON87460 con una sonda de ADN que comprende una cualquiera de SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 4, o moléculas de ADN sustancialmente homólogas de SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 4 que hibridan en condiciones de hibridación rigurosas con ADN genómico de planta de maíz MON87460 y no hibridan en condiciones de hibridación rigurosas con ADN de planta de maíz no MON87460; (b) someter a la muestra y la sonda a condiciones de hibridación rigurosas; y (c) detectar la hibridación de la sonda con el ADN MON87460 de planta de maíz.

- 25 De acuerdo con otro aspecto la invención, se proporcionan procedimientos para producir plantas de maíz tolerantes a estrés por déficit de agua y comprenden la etapa de cruzar una primera planta de maíz homocigota parental de acontecimiento MON87460 con una segunda planta de maíz homocigota parental que carece del rasgo de tolerancia a estrés por déficit de agua, produciendo de este modo plantas descendientes híbridas tolerantes a estrés por déficit de agua. En ciertas realizaciones, se proporciona un procedimiento para producir una planta de maíz tolerante a sequía que comprende cruzar una primera planta de maíz parental tolerable a sequía que comprende una SEC ID N°: 1 y un inserto transgénico heterólogo que comprende un promotor de actina de arroz truncado que está unido operativamente con un gen cspB, y una segunda planta de maíz parental, produciendo de este modo una pluralidad de plantas descendientes tolerantes a sequía. En otras realizaciones, el inserto puede comprender SEC ID N°: 7 o SEC ID N°: 24.

- 35 Otro aspecto de la invención es un procedimiento para determinar la cigosidad de la descendencia del acontecimiento de maíz MON87460 usando reacciones de amplificación de ADN y dos conjuntos de cebadores. Un primer conjunto de cebadores se usa para amplificación de ADN de maíz MON87460 y un segundo conjunto de cebadores se usa para amplificación de la secuencia de maíz nativa que abarca el sitio de inserción del transgén en ADN genómico MON87460. Cuando el molde para amplificación es un homocigoto de planta de maíz para el ADN MON87460 se produce un amplicón solamente del primer conjunto de cebadores. Cuando el molde para amplificación es una planta de maíz heterocigota para el ADN MON87460, se producen amplicones solamente tanto del primer conjunto de cebadores como del segundo conjunto de cebadores.

- 45 También están abarcados por la presente invención semillas de maíz híbridas que comprenden en su genoma una cualquiera de SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 4 en la que al menos un parental en el cruce usado para crear dicha semilla híbrida es MON87460.

Otras realizaciones específicas de la invención se desvelan en la siguiente descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 proporciona un mapa plasmídico de pMON73608.

La Figura 2 ilustra la organización genómica del inserto de transgén en la planta de maíz MON87460.

- 50 La Figura 3 proporciona la secuencia (SEC ID N°: 24) de la región de unión de ADN genómico y transgén de MON87460. La secuencia de ADN flanqueante genómica de maíz se muestra en letras minúsculas. La secuencia transgénica insertada de pMON73608 se muestra en letras mayúsculas.

Descripción detallada de la invención

- 55 Una planta de maíz transgénica, denominada en el presente documento "MON87460" o "Acontecimiento CspB-Zm MON87460" es tolerante a estrés por déficit de agua como resultado de la expresión de una proteína cspB de *E. coli*

en células de dicha planta transgénica. El uso del maíz tolerante a estrés por déficit de agua proporcionará beneficios importantes a cultivadores de maíz, proporcionando por ejemplo 5-10% más rendimiento de cultivo en hectáreas de tierra seca occidental donde la lluvia anual media es insuficiente para apoyar un rendimiento agrícolamente eficaz de plantas de maíz naturales. Adicionalmente, las plantas de maíz MON87460 proporcionan el beneficio de seguro de sequía en el cinturón del maíz central, oriental y meridional proporcionando mayores producciones de cultivo en condiciones de sequía en comparación con plantas de maíz naturales. Los cultivadores de maíz también se beneficiarán de ahorros en el coste de irrigación en regiones en las que el maíz típicamente se cultiva con irrigación.

Como se usa en el presente documento, "déficit de agua" significa un periodo en el que el agua disponible para una planta no se repone a la velocidad a la que es consumida por la planta. Un largo periodo de déficit de agua se denomina coloquialmente sequía, que puede dar como resultado pérdida de un cultivo, incluso un cultivo activado con los cromosomas de la presente invención. La falta de lluvia o irrigación puede no producir estrés por agua inmediato si hay un depósito disponible de agua subterránea para la velocidad de crecimiento de las plantas. Las plantas cultivadas en suelo con abundante agua subterránea pueden sobrevivir días sin lluvia o irrigación sin efectos adversos en la producción. Las plantas cultivadas en suelo seco probablemente padezcan efectos adversos con periodos mínimos de déficit de agua. El estrés grave por agua puede provocar marchitamiento y muerte de las plantas; la sequía moderada puede provocar producción reducida, crecimiento atrofiado o desarrollo retardado. Las plantas pueden recuperarse de algunos periodos de estrés por agua sin afectar significativamente al rendimiento. Sin embargo, el estrés por agua en el momento de la polinización puede tener un efecto irreversible en la reducción de la producción. Por lo tanto, un periodo útil en el ciclo de vida del maíz para observar la tolerancia a estrés por agua es el estadio vegetativo tardío del crecimiento antes del espigamiento. El ensayo de la tolerancia a estrés por agua se realiza con frecuencia mediante la comparación con plantas de control. Por ejemplo, las plantas de la presente invención pueden sobrevivir a déficit de agua con un mayor rendimiento que las plantas de control. En el laboratorio y en ensayos de campo la sequía puede simularse proporcionando a las plantas de la presente invención y plantas de control menos agua que una planta de control regada de forma óptima y midiendo las diferencias en los rasgos.

La planta de maíz MON87460 se produjo por transformación mediada por *Agrobacterium* de una línea de maíz endogámica con el vector pMON73608 (Figura 1). Este vector contiene la región codificante de *cspB* regulada por el promotor de actina de arroz, el intrón de actina de arroz, y la secuencia de poliadenilación tr7 3', y una región codificante *nptII* regulada por el promotor 35S de CaMV, y la secuencia de poliadenilación NOS 3'. Se caracterizaron acontecimientos generados a partir del vector pMON73608 por análisis molecular detallado.

Un acontecimiento transgénico en una planta se produce cuando se inserta ADN recombinante en una localización en un cromosoma en el núcleo. Es estadísticamente improbable que dos acontecimientos transgénicos separados cualesquiera sean iguales. Las plantas reproducidas a partir de un acontecimiento específico generalmente tienen homogeneidad en el rasgo. No todos los acontecimientos transgénicos proporcionarán semillas de plantas, plantas o núcleos transgénicos de la presente invención debido a una diversidad de factores tales como la localización, número de copias e integridad del ADN recombinante en el cromosoma, inserción no pretendida de otro ADN, etc. Como resultado se identifica un acontecimiento transgénico deseado explorando la planta transformada o su semilla descendiente con respecto a tolerancia a déficit de agua potenciado.

Se sabe que la expresión de genes ajenos en plantas está influida por su posición en el cromosoma, quizás debido a la estructura de la cromatina (por ejemplo, heterocromatina) o la proximidad de elementos de regulación transcripcionales (por ejemplo, potenciadores) cerca del sitio de integración (Weising y col., Ann. Rev. Genet 22: 421-477, 1988). Por esta razón, con frecuencia es necesario explorar un gran número de plantas para identificar una planta caracterizada por expresión óptima de un gen de interés introducido. Por ejemplo, se ha observado en plantas y en otros organismos que puede haber una amplia variación en los niveles de expresión de un transgén introducido entre plantas. Puede haber también diferencias en los patrones espaciales o temporales de expresión, por ejemplo, diferencias en la expresión relativa de un transgén en diversos tejidos vegetales, que pueden no corresponderse con los patrones esperados de elementos reguladores transcripcionales presentes en la construcción génica introducida. Una planta que tiene niveles o patrones deseados de expresión transgénica es útil para introgresión del transgén en otros fondos genéticos por cruce sexual usando procedimientos de cultivo convencionales. La descendencia de dichos cruces mantiene las características de expresión transgénica del transformante original. Esta estrategia se usa para asegurar la expresión génica fiable en variedades que están bien adaptadas a condiciones de crecimiento locales y demandas del mercado.

Los acontecimientos generados por la transformación con pMON73608 se exploraron con respecto a número de insertos (número de sitios de integración dentro del genoma de maíz), número de copias (el número de copias del ADN-T dentro de un locus), la integridad de los casetes insertados y la ausencia de secuencia de cadena principal usando análisis de transferencia de Southern. Las sondas incluyeron las regiones codificantes de *cspB* y *nptII* intactas y sus promotores, intrones y secuencias de poliadenilación respectivas y la cadena principal del plásmido vector. A partir de aproximadamente 140 transformantes iniciales, se seleccionaron acontecimientos basándose en el número de copias y análisis de cadena principal con respecto al análisis fenotípico para identificar plantas que tenían un fenotipo mejorado a partir de la expresión de *cspB*. Los resultados de un ensayo basado en invernadero con respecto a tolerancia a déficit de agua, identificaron varios transformantes independientes que tenían tolerancia

a déficit de agua. Los ensayos de campo de 22 transformantes seleccionados con respecto a tolerancia a déficit de agua en condiciones de cultivo en campo dieron como resultado la identificación de 10 acontecimientos mejorados que se ensayaron adicionalmente con respecto a tolerancia a déficit de agua y estabilidad y mejora de la producción. Los resultados de estos análisis adicionales identificaron que MON87460 tenía fenotipos mejorados superiores. La caracterización molecular exhaustiva de MON87460 demostró que el acontecimiento contiene una única inserción de ADN-T con una copia de los casetes tanto *cspB* como *nptII*. El análisis de transferencia de Northern confirmó que los transcritos de tamaño esperado tanto para *cspB* como para *nptII* se generaron en MON87460. Los datos también demuestran sorprendentemente que el fragmento del extremo derecho de *Agrobacterium* no está presente en MON87460 y que se ha producido un truncamiento del promotor de actina de arroz que regula la expresión del gen *cspB* de modo que solamente están presentes 108 pb (de 844 pb presentes en pMON73608) del ADN de promotor.

Se realizaron PCR y análisis de secuencia de ADN para determinar los puntos de unión 5' y 3' del inserto y el genoma de la planta, confirmar la organización de los elementos dentro del inserto (Figura 2) y determinar la secuencia de ADN completa del inserto en la planta de maíz MON87460 (SEC ID N°: 5). Los análisis confirmaron que el ADN-T en la planta en MON87460 es idéntico a la secuencia correspondiente de pMON73608. El análisis de secuencia también identificó 1060 pb de secuencia flanqueante 5' y 1260 pb de 3' para el inserto de MON87460. La comparación con la secuencia de ADN natural de la línea endogámica usada para transformación mostró que se producía una delección de 22 pb de ADN genómico de maíz en el sitio de integración del ADN-T MON87460.

Es ventajoso poder detectar la presencia de ADN genómico/transgén de MON87460 para determinar si la descendencia de un cruce sexual contiene el ADN genómico/transgén de interés. Además, un procedimiento para detectar MON87460 es útil cuando se cumplen las regulaciones que requieren la aprobación antes de su comercialización y el marcaje de alimentos derivados de las plantas de cultivos recombinantes. Es posible detectar la presencia de un transgén por cualquier procedimiento de detección de ácido nucleico bien conocido tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o hibridación de ADN usando sondas polinucleotídicas. Estos procedimientos de detección generalmente usan moléculas de sonda y cebador de ADN que son específicas para los elementos genéticos, tales como promotores, líderes, intrones, regiones codificantes, terminadores de transcripción 3', genes marcadores, etc., que son los componentes de los transgenes de una construcción de ADN. Dichos procedimientos pueden no ser útiles para diferenciar entre diferentes acontecimientos transgénicos, particularmente los producidos usando la misma construcción de ADN transgénico a no ser que la secuencia de ADN genómico adyacente al ADN transgénico insertado sea conocida. La presente invención proporciona secuencias y ensayos para detección de los puntos de unión de los extremos de ADN genómico/transgén de MON87460.

A no ser que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. Generalmente, la nomenclatura usada y los procedimientos de fabricación o de laboratorio descritos posteriormente se conocen bien y se emplean habitualmente en la técnica. Se usan procedimientos convencionales para estos procedimientos, tales como los proporcionados en la técnica y diversas referencias generales. A no ser que se indique de otro modo, se proporcionan las secuencias de ácido nucleico en el texto de la presente memoria descriptiva, cuando se lee de izquierda a derecha, en la dirección 5' a 3'. Las secuencias de ácido nucleico pueden proporcionarse como ADN o como ARN, según se especifique; la divulgación de una necesariamente define a la otra, como conoce un experto habitual en la técnica. Además, la divulgación en el presente documento de una secuencia de ácido nucleico dada define necesariamente su secuencia complementaria, como conoce un experto habitual en la técnica. Cuando se proporciona un término en singular, los inventores también contemplan aspectos de la invención descritos por el plural de ese término. La nomenclatura usada y los procedimientos de laboratorio descritos posteriormente son los bien conocidos y empleados habitualmente en la técnica. Cuando haya discrepancias en términos y definiciones usados en referencias que se incorporan por referencia, los términos usados en la presente solicitud tendrán las definiciones dadas. Otros términos técnicos usados tienen su significado habitual en la técnica en la que se usen, como se ejemplifica por una diversidad de diccionarios técnicos. Pueden encontrarse definiciones de términos habituales en biología molecular en Rieger y col., *Glossary of Genetics: Classical and Molecular*, 5ª edición, Springer-Verlag: Nueva York, 1991; y Lewin, *Genes V*, Oxford University Press: Nueva York, 1994.

Como se usa en el presente documento, el término "maíz" significa *Zea mays* e incluye todas las variedades de plantas que pueden cultivarse con la planta de maíz MON87460.

Un "acontecimiento" transgénico se produce por transformación de células vegetales con ADN heterólogo, es decir, una construcción de ácido nucleico que incluye un transgén de interés, regeneración de una población de plantas resultantes de la inserción del transgén en el genoma de la planta y selección de una planta particular caracterizada por la inserción en una localización del genoma particular. Se dice que la descendencia transgénica que tiene el mismo núcleo con cromosomas heterocigotos u homocigotos para el ADN recombinante representa el mismo acontecimiento transgénico. Una vez que se ha introducido un transgén para un rasgo en una planta, ese gen puede introducirse en cualquier planta sexualmente compatible con la primera planta cruzando, sin necesidad de transformar directamente la segunda planta. El ADN heterólogo y la secuencia genómica flanqueante adyacente al ADN insertado se transferirá a la descendencia cuando el acontecimiento se use en un programa de cultivo y el rasgo potenciado resultante de la incorporación del ADN heterólogo al genoma de la planta se mantendrá en la descendencia que recibe el ADN heterólogo.

El término “acontecimiento” también se refiere a la presencia de ADN del transformante original, que comprende el ADN insertado y la secuencia genómica flanqueante inmediatamente adyacente al ADN insertado, en una descendencia que recibe ADN insertado que incluye el transgén de interés como resultado de un cruce sexual de una línea parental que incluye el ADN insertado (por ejemplo, el transformante original y la descendencia resultante de autofecundación) y una línea parental que no contiene el ADN insertado. El término “descendencia” indica los descendientes de cualquier generación de una planta parental preparada de acuerdo con la presente invención. Un “acontecimiento” transgénico puede por lo tanto ser de cualquier generación. El término “acontecimiento” se refiere al transformante original y la descendencia del transformante que incluye el ADN heterólogo. El término “acontecimiento” también se refiere a la descendencia producida por un cruce sexual externo entre el transformante y otra variedad que incluye el ADN heterólogo. Incluso después de retrocruzamiento repetido con un parental recurrente, el ADN insertado y el ADN flanqueante del parental transformado está presente en la descendencia del cruce en la misma localización cromosómica.

La presente invención se refiere al acontecimiento de ADN MON87460, células vegetales, tejidos, semillas y productos procesados derivados de MON87460. Las plantas de maíz MON87460 pueden autopolinizarse para producir líneas endogámicas que sean homocigotas para los polinucleótidos MON87460. La semilla homocigota puede cultivarse para producir plantas de maíz con acontecimiento MON87460 de descendencia homocigota útiles para cruzar con otras plantas de maíz endogámicas para producir semilla de maíz híbrida heterocigota. La semilla de maíz híbrida MON87460 puede cultivarse para hibridar con plantas de maíz que muestren tolerancia a déficit de agua y rendimiento potenciado en condiciones de estrés en comparación con plantas de control.

Los productos que pueden derivar de MON87460 incluyen productos alimentarios y productos básicos producidos a partir del acontecimiento de maíz MON87460. Se espera que dichos productos alimentarios y productos básicos contengan polinucleótidos que, si se detectan en niveles suficientes, son diagnósticos de la presencia de materiales del acontecimiento de maíz MON87460 dentro de dichos productos básicos y productos alimentarios. Los ejemplos de dichos productos alimentarios y productos básicos incluyen, pero sin limitación, aceite de maíz, harina gruesa de maíz, harina de maíz, gluten de maíz, tortas de maíz, almidón de maíz y cualquier otro producto alimentario destinado para su consumo como una fuente de alimento por un animal o, de otro modo, pretendido como un agente de aumento de volumen, o pretendido como un componente en una composición de maquillaje para su uso cosmético, etc.

También se entiende que dos plantas transgénicas diferentes pueden cruzarse para producir descendencia que contenga dos genes exógenos añadidos de segregación independiente. La autofecundación de la descendencia apropiada puede producir plantas que sean homocigotas para ambos genes exógenos añadidos. Como alternativa, pueden cruzarse líneas endogámicas que contengan los genes exógenos individuales para producir semilla híbrida que es heterocigota para cada gen, y útil para la producción de plantas de maíz híbridas que muestran múltiples fenotipos beneficiosos como resultado de la expresión de cada uno de los genes exógenos. Pueden encontrarse descripciones de procedimientos de cultivo que se usan habitualmente para diferentes rasgos y cultivos en diversas referencias, por ejemplo, Allard, "Principles of Plant Breeding," John Wiley and Sons, NY, U. of CA, Davis, CA, 50-98, 1960; Simmonds, "Principles of Crop Improvement," Longman, Inc., NY, 369-399, 1979; Sneep y Hendriksen, "Plant Breeding Perspectives," Wageningen (ed), Center for Agricultural Publishing and Documentation, 1979. Es de particular interés en la presente invención el desarrollo de plantas de maíz con acontecimiento MON87460 que expresen proteína *cspB* y una proteína resistente a glifosato 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato sintasa (CP4 EPSPS) (Patente de Estados Unidos 5.633.435) de *Agrobacterium* sp. cepa CP4 que confiere tolerancia de las plantas a glifosato. “Glifosato” se refiere a N-fosfonometilglicina y sus sales. N-fosfonometilglicina es un herbicida bien conocido que tiene actividad en un amplio espectro de especies vegetales. El glifosato es el principio activo de Roundup® (Monsanto Co.), un herbicida seguro que tiene una semivida deseablemente corta en el ambiente. El glifosato es el principio activo del herbicida Roundup® (Monsanto Co.). Los tratamientos con “herbicida de glifosato” se refieren a tratamiento con el herbicida Roundup®, Roundup Ultra®, Roundup Pro® o cualquier otra formulación de herbicida que contenga glifosato. Los ejemplos de formulaciones comerciales de glifosato incluyen, sin restricción, las vendidas por Monsanto Company como herbicidas ROUNDUP®, ROUNDUP® ULTRA, ROUNDUP® ULTRAMAX, ROUNDUP® WEATHERMAX, ROUNDUP® CT, ROUNDUP® EXTRA, ROUNDUP® BIACTIVE, ROUNDUP® BIOFORCE, RODEO®, POLARIS®, SPARK® y ACCORD®, todos los cuales contienen glifosato como su sal de isopropilamonio; los vendidos por Monsanto Company como herbicidas ROUNDUP® DRY y RIVAL®, que contienen glifosato como su sal de amonio; el vendido por Monsanto Company como ROUNDUP® GEOFORCE, que contiene glifosato como su sal de sodio; y el vendido por Syngenta Crop Protection como herbicida TOUCHDOWN®, que contiene glifosato como su sal de trimetilsulfonio. Cuando se aplica a una superficie vegetal, el glifosato se mueve de forma sistémica a través de la planta. El glifosato es fitotóxico debido a su inhibición de la ruta del ácido siquímico, que proporciona un precursor para la síntesis de aminoácidos aromáticos. El glifosato inhibe la enzima 5-enolpiruvil-3-fosfosiquimato sintasa (EPSPS) hallada en plantas. Puede conseguirse tolerancia a glifosato mediante la expresión de variantes de EPSPS bacteriana y variantes de EPSPS vegetal que tienen menor afinidad por glifosato y por lo tanto conservan su actividad catalítica en presencia de glifosato (Patentes de Estados Unidos N° 5.633.435, 5.094.945, 4.535.060 y 6.040.497).

Como se usa en el presente documento cuando se hace referencia a una “molécula de ADN aislada”, se entiende que la molécula de ADN es una que está presente, sola o en combinación con otras composiciones, pero no dentro de su ambiente natural. Por ejemplo, una secuencia codificante, secuencia de intrón, secuencia líder no traducida,

secuencia promotora, secuencia de terminación de la transcripción, y similares, que se encuentran de forma natural dentro del ADN de un genoma de maíz no se considera que estén aisladas del genoma de maíz siempre que estén dentro del genoma de maíz. Sin embargo, cada uno de estos componentes, y subpartes de estos componentes, estarían "aislados" dentro del alcance de la presente divulgación siempre que las estructuras y componentes no estén dentro del genoma de maíz.

Para los fines de la presente divulgación, cualquier secuencia de nucleótidos transgénica, es decir, la secuencia de nucleótidos del ADN insertado en el genoma de las células del acontecimiento de planta de maíz MON87460 se consideraría que es una secuencia de nucleótidos aislada si está presente dentro del plásmido usado para transformar células de maíz de las que surgió el acontecimiento MON87460, dentro del genoma del acontecimiento MON87460, presente en cantidades detectables en tejidos, descendencia, muestras biológicas o productos básicos derivados del acontecimiento MON87460. La secuencia de nucleótidos o cualquier fragmento derivado de la misma se consideraría que está aislado o es aislable si la molécula de ADN puede extraerse de células, o tejidos, u homogeneizado de una planta o semilla u órgano vegetal; o puede producirse como un amplicón de ADN o ARN extraído de células, o tejidos, u homogeneizado de una planta o semilla u órgano vegetal, cualquiera de los cuales deriva de dichos materiales derivados del acontecimiento MON87460. En este sentido, las secuencias de unión como se exponen en SEC ID N°: 1 y SEC ID N°: 2, y secuencias de nucleótidos derivadas del acontecimiento MON87460 que también contienen estas secuencias de unión se consideran aisladas o aislables, si estas secuencias están presentes dentro del genoma de las células del acontecimiento MON87460 o presentes en cantidades detectables en tejidos, descendencia, muestras biológicas o productos básicos derivados del acontecimiento MON87460.

Como se usa en el presente documento, una unión transgénica/genómica es el punto en el que el ADN heterólogo de un vector de transformación que está insertado en el genoma está ligado al ADN genómico de la planta de maíz. Un polinucleótido de unión abarca la unión transgénica/genómica y es nuevo en cualquier acontecimiento de planta transgénica particular. Por lo tanto, la detección de un polinucleótido de unión en una muestra biológica es diagnóstico de la presencia de un acontecimiento de planta específico. En la presente invención, la presencia de polinucleótidos de unión SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 4 en una muestra es diagnóstico de la presencia de ADN MON87460 en una muestra.

Una "sonda" es un polinucleótido al que está unido un marcador detectable convencional o molécula indicadora, por ejemplo, un isótopo radiactivo, ligando, agente quimioluminiscente o enzima. Las sondas son complementarias de una cadena de un ácido nucleico diana, en el caso de la presente invención, de una cadena de ADN genómico de MON87460, bien de una planta MON87460 o bien de una muestra que incluye ADN MON87460. Las sondas de acuerdo con la presente invención incluyen no solamente ácidos desoxirribonucleico o ribonucleico, sino también poliamidas y otros materiales de sonda que se unen específicamente a una secuencia de ADN diana y pueden usarse para detectar la presencia de esa secuencia de ADN diana.

Los cebadores de ADN son polinucleótidos aislados que hibridan con una cadena de ADN complementaria por hibridación de ácido nucleico para formar un híbrido entre el cebador y la cadena de ADN diana, después se extienden a lo largo de la cadena de ADN diana por una polimerasa, por ejemplo una ADN polimerasa. Un par de cebadores de ADN o un conjunto de cebadores de ADN de la presente invención se refiere a dos cebadores de ADN útiles para amplificación de una secuencia de un ácido nucleico diana, por ejemplo, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otros procedimientos de amplificación de polinucleótidos convencionales.

Las sondas de ADN y cebadores de ADN son generalmente de 11 polinucleótidos o más de longitud, con frecuencia 18 polinucleótidos o más, 24 polinucleótidos o más, o 30 polinucleótidos o más. Dichas sondas y cebadores se seleccionan para ser de suficiente longitud para hibridar específicamente con una secuencia diana en condiciones de hibridación de alta rigurosidad. Preferentemente, 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 conservan la capacidad para hibridar con secuencias diana pueden diseñarse por procedimientos convencionales.

Los procedimientos para preparar y usar sondas y cebadores polinucleotídicos se describen, por ejemplo, en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., vol. 1-3, ed. Sambrook y col., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 (en lo sucesivo en el presente documento, "Sambrook y col., 1989"); Current Protocols in Molecular Biology, ed. Ausubel y col., Greene Publishing and Wiley-Interscience, Nueva York, 1992 (con actualizaciones periódicas) (en lo sucesivo en el presente documento, "Ausubel y col., 1992"); e Innis y col., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press: San Diego, 1990. Los pares de cebadores de ADN de PCR pueden derivar de una secuencia conocida, por ejemplo, usando programas de ordenador destinados a ese fin tales como Primer (Versión 0.5, © 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA).

Las sondas y cebadores de ácidos nucleicos de la presente invención hibridan en condiciones rigurosas con una molécula de ADN diana. Puede usarse cualquier procedimiento de hibridación o amplificación de ácido nucleico convencional para identificar la presencia de ADN de una planta transgénica en una muestra. Las moléculas de ácido polinucleico, también denominadas segmentos de ácido nucleico, o fragmentos de los mismos son capaces de hibridar específicamente con otras moléculas de ácido nucleico en ciertas circunstancias. Como se usa en el

presente documento, se dice que dos moléculas de ácido polinucleico son capaces de hibridar específicamente entre sí si las dos moléculas son capaces de formar una estructura de ácido nucleico bicatenaria antiparalela. Se dice que una molécula de ácido nucleico es el “complemento” de otra molécula de ácido nucleico si muestran complementariedad completa. Como se usa en el presente documento, se dice que las moléculas muestran “complementariedad completa” cuando cada nucleótido de una de las moléculas es complementario de un nucleótido de la otra. Se dice que dos moléculas son “mínimamente complementarias” si pueden hibridar entre sí con suficiente estabilidad para permitir que permanezcan hibridadas entre sí en al menos condiciones de “baja rigurosidad” convencionales. De forma similar, se dice que las moléculas son “complementarias” si pueden hibridar entre sí con suficiente estabilidad para permitir que permanezcan hibridadas entre sí en condiciones de “alta rigurosidad” convencionales. Las condiciones de rigurosidad convencional se describen por Sambrook y col., 1989, y por Haymes y col., En: Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach, IRL Press, Washington, DC (1985). Las desviaciones de la complementariedad completa son por lo tanto permisibles, siempre que dichas desviaciones no impidan completamente la capacidad de las moléculas para formar una estructura bicatenaria. Para que una molécula de ácido nucleico actúe como un cebador o sonda es necesario solamente que sea suficientemente complementaria en secuencia para poder formar una estructura bicatenaria estable en las concentraciones de sal y disolvente particulares empleadas.

Como se usa en el presente documento, una secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia de ácido nucleico que hibridará específicamente con el complemento de la secuencia de ácido nucleico con la que se compara en condiciones de alta rigurosidad. Las condiciones de rigurosidad apropiadas que promueven la hibridación de ADN, por ejemplo, cloruro sódico/citrato sódico (SSC) 6,0 x, a aproximadamente 45 °C, seguido de un lavado de SSC 2,0 x, a 50 °C, se conocen por los expertos en la materia o pueden encontrarse en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Por ejemplo, la concentración salina en la etapa de lavado puede seleccionarse de una baja rigurosidad de SSC aproximadamente 2,0 x, a 50 °C hasta una alta rigurosidad de SSC aproximadamente 0,2 x, a 50 °C. Además, la temperatura en la etapa de lavado puede aumentarse desde condiciones de baja rigurosidad a temperatura ambiente, aproximadamente 22 °C, hasta condiciones de alta rigurosidad a aproximadamente 65 °C. Tanto la temperatura como la sal pueden variarse, o puede mantenerse constante bien la temperatura o bien la concentración salina mientras que la otra variable se cambia.

En una realización preferida, un polinucleótido de la presente invención hibridará específicamente con una o más de las moléculas de ácido nucleico expuestas en SEC ID N°: 1 - 7 o complementos o fragmentos de las mismas en condiciones moderadamente rigurosas, por ejemplo a SSC aproximadamente 2,0 x, y aproximadamente 65 °C. En una realización particularmente preferida, un ácido nucleico de la presente invención hibridará específicamente con una o más moléculas de ácido nucleico expuestas en SEC ID N°: 1 - 7 o complementos o fragmentos de las mismas en condiciones de alta rigurosidad.

Como se usa en el presente documento, “ADN amplificado” o “amplicón” se refiere a los polinucleótidos que se sintetizan usando técnicas de amplificación, tales como PCR. El término “amplicón” como se usa en el presente documento excluye específicamente dímeros de cebadores que pueden formarse en una reacción de amplificación de ADN.

Con respecto a la amplificación de una secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, por PCR) usando un par de cebadores de amplificación particular, las “condiciones rigurosas” son condiciones que permiten que el par de cebadores hibride solamente con la secuencia de ácido nucleico diana con la que se unirá un cebador que tenga la secuencia natural correspondiente (o su complemento) y preferentemente que produzca un producto de amplificación único, el amplicón, en una reacción de amplificación térmica de ADN. La expresión “específico para (una secuencia diana)” indica que una sonda o cebador hibrida en condiciones de hibridación rigurosas solamente con la secuencia diana en una muestra que comprende la secuencia diana.

Un miembro de un par de cebadores derivado de la secuencia genómica de planta adyacente al ADN del inserto transgénico está localizado a una distancia de la secuencia de ADN insertada, esta distancia puede variar de un par de bases nucleotídicas a aproximadamente veinte mil pares de bases nucleotídicas. De forma similar, un miembro de un par de cebadores derivado del ADN del inserto transgénico está localizado a una distancia de la unión de la secuencia genómica vegetal, esta distancia puede variar de un par de bases nucleotídicas hasta aproximadamente la longitud completa del inserto transgénico. El amplicón puede variar en longitud de la longitud combinada del par de cebadores más un par de bases nucleotídicas, pero es preferentemente de aproximadamente cincuenta pares de bases nucleotídicas o más largo, por ejemplo, hasta 500 o incluso 1000 nucleótidos de longitud. Se producen de forma más fiable amplicones de tamaño más pequeño en general en reacciones de PCR, posibilitan tiempos de ciclo más cortos y pueden separarse y visualizarse fácilmente en geles de agarosa o adaptarse para su uso en ensayos de TaqMan, tales como Taqman de punto final y en Tiempo Real. Como alternativa, un par de cebadores puede derivar de la secuencia genómica en ambos lados del ADN heterólogo insertado para producir un amplicón que incluya la secuencia polinucleotídica del inserto completo (por ejemplo, un cebador directo aislado de SEC ID N°: 5 y un cebador inverso aislado de SEC ID N°: 6 que amplifica una molécula de ADN que comprende el fragmento de ADN pMON73608 que se insertó en el genoma MON87460, comprendiendo el inserto aproximadamente 3309 nucleótidos (SEC ID N°: 7), mostrados en mayúsculas en la Figura 3.

Para determinar si una planta de maíz resultante de un cruce sexual contiene ADN genómico vegetal transgénico de la planta de maíz MON87460 de la presente invención, se somete el ADN que se extrae de una muestra de tejido vegetal de maíz a un procedimiento de amplificación de polinucleótidos usando un par de cebadores que incluye un primer cebador derivado de la secuencia de ADN en el genoma de la planta MON87460 adyacente al sitio de inserción del ADN heterólogo insertado (ADN transgénico), y un segundo cebador derivado del ADN heterólogo insertado para producir un amplicón que es diagnóstico de la presencia del ADN de la planta MON87460. El amplicón de diagnóstico es de una longitud específica dependiendo de la localización de los cebadores, y comprende una secuencia polinucleotídica de unión específica que es diagnóstico del ADN genómico del acontecimiento vegetal específico. La presencia de la secuencia polinucleotídica de unión en un amplicón puede determinarse, por ejemplo, secuenciando el ADN del amplicón o mediante hibridación con una sonda específica. En la presente invención, la secuencia de ADN del amplicón diagnóstico de la presencia del MON87460 comprende SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 2. Más específicamente, en una realización de la presente invención, un amplicón diagnóstico de la presencia del MON87460 es de 68 nt de longitud y comprende SEC ID N°: 2, y puede detectarse mediante hibridación con una sonda marcada que comprende una cualquiera de SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 10 o SEC ID N°: 16.

La amplificación de polinucleótidos puede conseguirse por cualquiera de los diversos procedimientos de amplificación conocidos en la técnica, incluyendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se conocen en la técnica procedimientos de amplificación y se describen, entre otros, en las Patentes de Estados Unidos N° 4.683.195 y 4.683.202 y en PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, ed. Innis y col., Academic Press, San Diego, 1990. Se han desarrollado procedimientos de amplificación por PCR para amplificar hasta 22 kb (kilobases) de ADN genómico y hasta 42 kb de ADN bacteriófago (Cheng y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 5695-5699, 1994). Estos procedimientos así como otros procedimientos conocidos en la técnica de la amplificación de ADN pueden usarse en la práctica de la presente invención. La secuencia del inserto de ADN heterólogo o secuencia de ADN genómico flanqueante de MON87460 puede verificarse (y corregirse si es necesario) amplificando dichas moléculas de ADN de la semilla MON87460 o las plantas cultivadas a partir de la semilla depositada en la ATCC con el n° de referencia PTA-8910, usando cebadores derivados de las secuencias proporcionadas en el presente documento, seguido de secuenciación de ADN convencional 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 moléculas de cebadores de ADN que hibridan específicamente con un ADN diana y amplifican un amplicón de diagnóstico en las condiciones de reacción apropiadas. Un amplicón de cualquier longitud producido a partir de ADN MON87460 en el que el amplicón comprende SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 2 es un aspecto de la invención. El experto en la materia reconocerá que no se requiere que la primera y segunda moléculas de cebadores de ADN consistan solamente en ADN sino que también pueden estar comprendidas exclusivamente de ARN, una mezcla de ADN y ARN, o una combinación de ADN, ARN u otros nucleótidos o análogos de los mismos que no actúan como moldes para una o más polimerasas. Además, el experto en la materia reconocerá que una sonda o un cebador como se expone en el presente documento será de al menos aproximadamente 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20 nucleótidos consecutivos de longitud y se seleccionará del grupo de nucleótidos expuesto en SEC ID N°: 1 y SEC ID N°: 3 (designado de forma arbitraria unión 5'), SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 4 (designado de forma arbitraria unión 3'), SEC ID N°: 5 (designado de forma arbitraria secuencia flanqueante 5'), SEC ID N°: 6 (designado de forma arbitraria secuencia flanqueante 3') y SEC ID N°: 7 (secuencia transgénica insertada). Las sondas y cebadores al menos de aproximadamente 21 a aproximadamente 50 o más nucleótidos consecutivos de longitud son posibles cuando se seleccionan del grupo de nucleótidos como se expone en SEC ID N°: 5 a SEC ID N°: 7.

El kit puede proporcionar un procedimiento de detección basado en gel de agarosa o cualquier variedad de procedimientos para detectar el amplicón de diagnóstico que se conocen en la técnica. Un kit que contiene cebadores de ADN que son homólogos o complementarios de cualquier parte de la región genómica de maíz de SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 6 y de cualquier parte de la región del inserto transgénico de SEC ID N°: 7 es un objeto de la invención. Se identifica específicamente como un par de cebadores útil en un procedimiento de amplificación de ADN SEC ID N°: 8 y SEC ID N°: 9 que amplifican un amplicón de diagnóstico homólogo de una parte de la región transgénica/genómica 5' de MON87460, en el que el amplicón comprende SEC ID N°: 2. Otras moléculas de ADN útiles como cebadores de ADN pueden seleccionarse de la secuencia de ADN genómica/transgén desvelada de MON87460 por los expertos en la materia de la amplificación de ADN.

El amplicón de diagnóstico producido por estos procedimientos puede detectarse por una pluralidad de técnicas. Un procedimiento tal es el Análisis de Partes Genéticas (Nikiforov, y col. Nucleic Acid Res. 22: 4167-4175, 1994) en el que se diseña un oligonucleótido de ADN que solapa tanto con la secuencia de ADN genómico flanqueante adyacente como con la secuencia de ADN insertada. El oligonucleótido se inmoviliza en pocillos de una placa de microtitulación. Después de PCR de la región de interés (usando un cebador en la secuencia insertada y uno en la secuencia genómica flanqueante adyacente), puede hibridarse un producto de PCR monocatenario con el oligonucleótido inmovilizado y actuar como un molde para una reacción de extensión de una única base usando una ADN polimerasa y didesoxinucleótido trifosfatos marcados (ddNTP) específicos para la siguiente base esperada. La lectura puede ser fluorescente o basada en ELISA. Una señal indica presencia de la secuencia genómica/transgén debido a amplificación, hibridación y extensión de una única base exitosas.

Otro procedimiento es la técnica de Pirosecuenciación como describe Winge (Innov. Pharma. Tech. 00: 18-24,

2000). En este procedimiento se diseña un oligonucleótido que solapa con la unión del ADN genómico adyacente y ADN del inserto. El oligonucleótido se hibrida con producto de PCR monocatenario de la región de interés (un cebador en una secuencia insertada y uno en la secuencia genómica flanqueante) y se incuba en presencia de una ADN polimerasa, ATP, sulfurilasa, luciferasa, apirasa, adenosina 5' fosfosulfato y luciferina. Los dNTP se añaden individualmente y la incorporación da como resultado una señal luminosa que se mide. Una señal luminosa indica la presencia de la secuencia genómica/transgén debido a amplificación, hibridación y extensión de una única o múltiples bases exitosa.

La Polarización de Fluorescencia como se describe por Chen, y col., (Genome Res. 9: 492-498, 1999) es un procedimiento que puede usarse para detectar el amplicón de la presente invención. Usando este procedimiento se diseña un oligonucleótido que solapa con la unión de ADN insertado y flanqueante genómico. El oligonucleótido se hibrida con producto de PCR monocatenario de la región de interés (un cebador en el ADN insertado y uno en la secuencia de ADN genómico flanqueante) y se incuba en presencia de una ADN polimerasa y un ddNTP marcado con fluorescente. La extensión de una única base da como resultado la incorporación del ddNTP. La incorporación puede medirse como un cambio en la polarización usando un fluorímetro. Un cambio de la polarización indica la presencia de la secuencia genómica/transgén debido a amplificación, hibridación y extensión de una única base exitosa.

Taqman[®] (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) se describe como un procedimiento para detectar y cuantificar la presencia de una secuencia de ADN y se describe completamente en las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Brevemente, se diseña una sonda oligonucleotídica de FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia) que solapa con la unión de ADN del inserto y flanqueante genómico. La sonda de FRET y los cebadores de PCR (un cebador en la secuencia de ADN del inserto y uno en la secuencia genómica flanqueante) se ciclan en presencia de una polimerasa termoestable y dNTP. La hibridación de la sonda de FRET da como resultado escisión y liberación del resto fluorescente, tal como 6FAM[™] y VIC[™], separado del colorante interruptor, tal como, TAMRA (tetrametil-6-carboxirodamina) para sondas convencionales, o compuestos de unión a surco menor no fluorescentes para sondas MG. Con sondas TAMRA o MGB, la polimerasa escinde sonda unida durante PCR, separando el fluoróforo y el interruptor hasta el punto en que no puede producirse FRET, y una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia genómica/transgén.

Se han descrito Balizas Moleculares para su uso en la detección de secuencias como se describe en Tyangi, y col. (Nature Biotech. 14: 303-308, 1996). Brevemente, se diseña una sonda oligonucleotídica de FRET que solapa con la unión de ADN del inserto y genómico flanqueante. La estructura única de la sonda de FRET da como resultado que contenga estructura secundaria que mantiene los restos fluorescentes e interruptores en proximidad estrecha. La sonda de FRET y cebadores de PCR (un cebador en la secuencia de ADN del inserto y uno en la secuencia genómica flanqueante) se ciclan en presencia de una polimerasa termoestable y dNTP. Después de amplificación por PCR exitosa, la hibridación de la sonda de FRET con la secuencia diana da como resultado la retirada de la estructura secundaria de la sonda y separación espacial de los restos fluorescentes e interruptores. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia de inserto transgénico/flanqueante debido a amplificación e hibridación exitosas.

Otros procedimientos descritos, tales como microfluídica (Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2006068398, Patente de Estados Unidos N° 6.544.734) pueden usarse para separar y amplificar muestras de ADN. Se usan colorantes ópticos para detectar y cuantificar moléculas de ADN específicas (documento WO/05017181). Se han descrito dispositivos de nanotubos (documento WO/06024023) que comprenden un sensor electrónico para la detección de moléculas de ADN o nanopérlas que se unen a moléculas de ADN específicas.

Pueden desarrollarse kits de detección de ADN usando las composiciones desveladas en el presente documento y los procedimientos bien conocidos en la técnica de detección de ADN. Los kits son útiles para la identificación de ADN MON87460 de planta de maíz en una muestra y pueden aplicarse a procedimientos para cultivar plantas de maíz que contienen ADN MON87460. Un kit contiene moléculas de ADN que son útiles como cebadores o sondas y que son homólogas o complementarias de al menos una parte de SEC ID N°: 1 - 7. Las moléculas de ADN pueden usarse en procedimientos de amplificación de ADN (PCR) o como sondas en procedimientos de hibridación de ácido nucleico tales como análisis de Southern y análisis de Northern.

En otro aspecto de la presente invención, un polinucleótido preferido de la presente invención que es diagnóstico de la presencia de ADN MON87460 tiene la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 4 o SEC ID N°: 25. Las SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 4 y polinucleótidos de unión genómica/transgén mayores, tales como los de SEC ID N°: 5-7 también pueden usarse como marcadores en procedimientos de cultivo de plantas para identificar la descendencia de cruces genéticos similares a los procedimientos descritos para análisis de marcadores de ADN de repetición de secuencia sencilla, en "DNA markers: Protocols, applications, and overviews": (1997) 173-185, Cregan, y col., eds., Wiley-Liss NY. La hibridación de la sonda con la molécula de ADN diana puede detectarse por cualquier variedad de procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Estos pueden incluir, pero sin limitación, marcadores fluorescentes, marcadores radiactivos, marcadores basados en anticuerpos y marcadores quimioluminiscentes. En otro aspecto de la presente invención, una molécula de ácido nucleico marcadora preferida de la presente invención comparte entre el 80% y el 100% o entre el 90% y el 100% de identidad de secuencia con una secuencia de ácido nucleico expuesta en SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 7 o complementos de la misma o

fragmentos de uno de ellos. En un aspecto adicional de la presente invención, una molécula de ácido nucleico marcadora preferida de la presente invención comparte entre el 95 y el 100% de identidad de secuencia con una secuencia expuesta en SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 7 o complementos de la misma o fragmentos de uno de ellos.

También se proporcionan en el presente documento plantas de maíz tolerantes a déficit de agua que carecen de un gen marcador seleccionable o carecen de un gen marcador seleccionable intacto. Dichas plantas pueden obtenerse por procedimientos que comprenden exponer un cromosoma de maíz que comprende un inserto de transgén heterólogo que confiere tolerancia a déficit de agua y un gen marcador seleccionable a uno o más agentes inductores de recombinación y seleccionar una planta de maíz que comprenda un inserto de transgén heterólogo que confiera tolerancia a déficit de agua cuando el gen de marcador seleccionable se ha eliminado completa o parcialmente o cuando el gen marcador seleccionable se ha alterado. Los insertos de transgenes heterólogos que confieren tolerancia a déficit de agua y contienen un marcador seleccionable incluyen, pero sin limitación, insertos que comprenden SEC ID N°: 7 o insertos que comprenden SEC ID N°: 1, un promotor de actina de arroz truncado que está unido operativamente a un gen cspB, un gen marcador seleccionable y SEC ID N°: 2. Los cromosomas de maíz que comprenden un inserto de transgén heterólogo que confiere tolerancia a déficit de agua y un gen marcador seleccionable también incluyen, pero sin limitación, un cromosoma de maíz que comprende SEC ID N°: 24, un cromosoma de maíz de una planta de maíz que se ha depositado con el N° de Referencia de ATCC PTA-8910 (ATCC, 10801 University Blvd., Manassas, VA, Estados Unidos) y descendencia de la misma. Los insertos de transgenes heterólogos que confieren tolerancia a déficit de agua incluyen, pero sin limitación, insertos que comprenden SEC ID N°: 1 y un promotor de actina de arroz truncado que está unido operativamente a un gen cspB así como insertos que comprenden SEC ID N°: 1 y un promotor de actina de arroz truncado que está unido operativamente a un gen cspB en el que un extremo 5' del inserto solapa con un extremo 3' de SEC ID N°: 1.

La expresión "unido operativamente", como se usa en el presente documento, se refiere a la unión de secuencias de ácido nucleico tales que una secuencia pueda proporcionar una función requerida a una secuencia unida. En el contexto de un promotor, "unido operativamente" significa que el promotor está conectado a una secuencia de interés de modo que la transcripción de esa secuencia de interés está controlada y regulada por ese promotor. Cuando la secuencia de interés codifica una proteína y cuando se desea la expresión de esa proteína, "unido operativamente" significa que el promotor está unido a la secuencia de tal modo que el transcrito resultante se traducirá eficazmente. Si el enlace del promotor con la secuencia codificante es una fusión transcripcional y se desea expresión de la proteína codificada, el enlace se hace de modo que el primer codón de inicio de la traducción en el transcrito resultante sea el codón de inicio de la secuencia codificante. Como alternativa, si el enlace del promotor con la secuencia codificante es una fusión de traducción y se desea expresión de la proteína codificada, el enlace se hace de modo que el primer codón de inicio de la traducción contenido en la secuencia no traducida 5' se asocie con el promotor y se une de modo que el producto de traducción resultante esté en fase con la fase abierta de lectura traduccional que codifica la proteína deseada. Las secuencias de ácido nucleico que pueden unirse operativamente incluyen, pero sin limitación, secuencias que proporcionan funciones de expresión génica (es decir, elementos de expresión génica tales como promotores, regiones no traducidas 5', intrones, regiones codificantes de proteína, regiones no traducidas 3', sitios de poliadenilación y/o terminadores de la transcripción), secuencias que proporcionan funciones de transferencia y/o integración de ADN (es decir, secuencias de extremo de ADN-T, sitios de reconocimiento de recombinasa específica de sitio, sitios de reconocimiento de integrasa), secuencias que proporcionan funciones selectivas (es decir, marcadores de resistencia a antibióticos, genes biosintéticos), secuencias que proporcionan funciones marcadoras puntuables (es decir, genes indicadores), secuencias que facilitan las manipulaciones *in vitro* o *in vivo* de las secuencias (es decir, secuencias poliligadoras, secuencias diana para recombinasas específicas de sitio) y secuencias que proporcionan funciones de replicación (es decir, orígenes bacterianos de replicación, secuencias de replicación autónoma, secuencias centroméricas).

Los agentes inductores de recombinación pueden comprender radiación ionizante y/o cualquier compuesto, proteína y/o un ácido nucleico que posibilite la eliminación o modificación de una secuencia polinucleotídica. Los agentes inductores de recombinación incluyen por lo tanto, pero sin limitación, agentes que posibiliten la recombinación homóloga, recombinación no homóloga, recombinación específica de sitio y/o modificaciones genómicas. Las modificaciones genómicas proporcionadas por agentes inductores de recombinación incluyen por lo tanto, pero sin limitación, inserciones, deleciones, inversiones y/o sustituciones de nucleótidos. Se ha desvelado uso de agentes inductores de recombinación para inducir modificaciones genéticas en plantas (Lloyd y col., Proc Natl Acad Sci U S A., 102(6): 2232, 2005). Los agentes de recombinación pueden ser nativos o modificados por ingeniería genética. Las recombinasas específicas de sitio incluyen, pero sin limitación, una Cre-recombinasa, una FLP recombinasa una Flipasa y similares. Los agentes inductores de recombinación también incluyen, pero sin limitación, nucleasas. Las nucleasas que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, meganucleasas y nucleasas de dedos de cinc. Otros agentes inductores de recombinación incluyen, pero sin limitación, secuencias de reemplazo homólogas y secuencias de reemplazo no homólogas. En ciertas realizaciones, los reactivos inductores de recombinación pueden comprender una nucleasa y una secuencia de reemplazo homóloga o no homóloga. En ciertas realizaciones, puede usarse una cre-recombinasa capaz de escindir el marcador seleccionable localizado entre los sitios lox de SEC ID N°: 24. Se ha desvelado la eliminación mediada por cre de secuencias flanqueadas por sitios lox en plantas (Patente de Estados Unidos N° 5.658.772).

La eliminación o alteración de un gen marcador seleccionable, una parte del mismo, u otra secuencia puede efectuarse induciendo una rotura bicatenaria en la secuencia diana, proporcionando una secuencia de reemplazo

homóloga que carece del gen marcador seleccionable o una parte del mismo, y recuperando plantas en las que la secuencia de reemplazo se ha integrado en lugar de las secuencias residentes originalmente. Una secuencia de reemplazo homóloga puede comprender secuencias homólogas en ambos extremos de la rotura bicatenaria que se proporcionan para recombinación homóloga y sustitución de la secuencia residente en el cromosoma con la secuencia de reemplazo. Se ha desvelado recombinación homóloga inducida por rotura bicatenaria dirigida en plantas de cultivos tales como tabaco y maíz (Wright y col., Plant J. 44, 693, 2005; D'Halluin, y col., Plant Biotech. J. 6: 93, 2008). También es posible insertar una secuencia de reemplazo homóloga en un sitio de escisión de nucleasa dirigido mediante unión de extremos no homólogos o una combinación de unión de extremos no homólogos y recombinación homóloga (revisado en Puchta, J. Exp. Bot. 56, 1, 2005). También se ha desvelado inserción dirigida de secuencias de reemplazo homólogas en sitios genómicos de plantas específicos por unión de extremos no homólogos o una combinación de unión de extremos de no homólogos y recombinación homóloga (Wright y col., Plant J. 44, 693, 2005). En ciertas realizaciones, puede usarse una meganucleasa que cataliza al menos una rotura bicatenaria específica de sitio en el gen marcador seleccionable. Se ha mostrado que las meganucleasas son susceptibles de modificación genética de modo que pueden hacerse evolucionar o modificarse por ingeniería genética (documentos WO/06097853A1, WO/06097784A1, WO/04067736A2) o diseñarse racionalmente (documento U.S. 20070117128A1) para cortar dentro de una secuencia de reconocimiento que coincide exactamente o está estrechamente relacionada con una secuencia diana específica. En estos casos, dada una diana de tamaño razonable tal como una secuencia de gen marcador seleccionable, se puede seleccionar o diseñar una nucleasa que cortará dentro de la secuencia génica marcadora seleccionable diana. Como alternativa, puede usarse una nucleasa de dedos de cinc que catalice al menos una rotura bicatenaria específica de sitio en el gen marcador seleccionable. También se han desvelado dichas nucleasas de dedos de cinc, la capacidad para modificar por ingeniería genética nucleasas de dedos de cinc específicas, y su uso al posibilitar la recombinación homóloga en plantas (documentos WO 03/080809, WO 05/014791, WO 07014275, WO 08/021207).

La eliminación o alteración de un gen marcador seleccionable, una parte del mismo u otra secuencia también puede efectuarse induciendo una rotura bicatenaria en la secuencia diana, proporcionando una secuencia de reemplazo no homóloga que carezca del gen marcador seleccionable o una parte del mismo, y recuperando plantas en las que la secuencia de reemplazo no homóloga se ha integrado en la secuencia diana. En ciertas realizaciones, una secuencia de reemplazo no homóloga puede comprender secuencias monocatenarias en ambos extremos que son complementarias de secuencias monocatenarias en ambos extremos de la rotura bicatenaria para proporcionar unión de extremos no homólogos de la secuencia de reemplazo y rotura bicatenaria.

También se proporcionan en el presente documento procedimientos para generación *de novo* de una planta de maíz que es sustancialmente equivalente a una planta de maíz del acontecimiento MON87460 y plantas resultantes. Dichos procedimientos pueden comprender uso de agentes inductores de recombinación. Las plantas de maíz que son sustancialmente equivalentes a una planta de maíz del acontecimiento MON87460 incluyen, pero sin limitación, plantas de maíz que comprenden un cromosoma que tiene un inserto transgénico heterólogo que comprende un promotor que está unido operativamente a un gen cspB, en el que el inserto transgénico está presente en la misma o sustancialmente en la misma localización cromosómica o sitio de integración cromosómico que en MON87460. Los promotores que pueden unirse operativamente a un gen cspB incluyen, pero sin limitación, promotores de actina de arroz, incluyendo promotores de actina de arroz truncados, un promotor de RS81 de maíz, un promotor de RS324 de maíz, un promotor de A3 de maíz, promotores virales y similares. En ciertas realizaciones no limitantes, se puede seleccionar, hacer evolucionar o diseñar una nucleasa para cortar dentro de una secuencia de reconocimiento diana que coincide exactamente o está estrechamente relacionada con una secuencia diana en SEC ID N°: 5, en SEC ID N°: 6, en una secuencia cromosómica de maíz que abarca SEC ID N°: 5 y SEC ID N°: 6 en una planta de maíz no transgénica, o en SEC ID N°: 23. En estas u otras realizaciones no limitantes, puede producirse una planta de maíz modificada genéticamente que contiene un promotor unido operativamente a un gen cspB: i) introduciendo en una célula de planta de maíz una secuencia de reemplazo homóloga que comprende un promotor que está unido operativamente a un gen cspB y secuencias flanqueantes que son sustancialmente idénticas a una secuencia diana y una nucleasa que escinde la secuencia diana; y ii) seleccionando una célula de maíz o planta de maíz en la que la secuencia de reemplazo homóloga se ha integrado en la secuencia diana. Dado que se ha descubierto que las secuencias diana cromosómicas de maíz desveladas en el presente documento son sitios favorables para inserción de transgenes, también se proporcionan procedimientos para obtener plantas con inserciones de uno o más transgenes que confieren rasgos distintos de tolerancia a déficit de agua o transgenes que comprenden genes distintos de cspB que confieren tolerancia a déficit de agua en sitios diana desvelados en el presente documento.

La disponibilidad de agentes inductores de recombinación y diversas secuencias de reemplazo homólogas también proporciona plantas de maíz tolerantes a déficit de agua que comprenden uno o más genes adicionales integrados en la misma localización cromosómica que el inserto del transgén heterólogo que confiere tolerancia a déficit de agua. La integración de los genes adicionales en la misma localización que el gen que confiere tolerancia a déficit de agua es ventajosa porque cualquier rasgo portado por los genes adicionales se unirá genéticamente al rasgo de tolerancia a déficit de agua, facilitando de este modo el cultivo. En ciertas realizaciones, un gen o genes adicionales pueden ser un gen o genes que actúen en concierto con el inserto del transgén heterólogo residente que confiere tolerancia a déficit de agua para proporcionar tolerancia a déficit de agua adicional. En ciertas realizaciones, un gen o genes adicionales pueden ser un gen o genes que proporcionen un rasgo particular y útil distinto de tolerancia a déficit de agua. Por lo tanto, uno o más genes que confieren uno o más rasgos incluyen, pero sin limitación, genes

- que confieren resistencia a herbicidas, resistencia a plagas, rendimiento mejorado en condiciones suficientes de agua, aceite de semillas mejorado, almidón de semillas mejorado, proteína de semillas mejorada, y/o utilización de nitrógeno mejorada. Dichas plantas pueden obtenerse por procedimientos que comprenden exponer un cromosoma de maíz que comprende un inserto de transgén heterólogo que confiere tolerancia a déficit de agua a una secuencia de reemplazo homóloga que comprende uno o más genes adicionales y seleccionar una planta de maíz que comprende un inserto de transgén heterólogo que confiere tolerancia a déficit de agua y uno o más genes adicionales. En ciertas realizaciones, la inserción de la secuencia de reemplazo homóloga puede facilitarse mediante el uso de un agente inductor de recombinación adicional. Los agentes inductores de recombinación adicionales usados incluyen por lo tanto, pero sin limitación, una meganucleasa, una nucleasa de dedos de cinc u otro agente que induzca una rotura bicatenaria en un sitio deseado de recombinación homóloga inducida por rotura bicatenaria. Los insertos de transgén heterólogo que confieren tolerancia de déficit de agua incluyen, pero sin limitación, insertos que comprenden SEC ID N°: 1 y un promotor de actina de arroz truncado que está unido operativamente a un gen *cspB* así como insertos que comprenden SEC ID N°: 1 y un promotor de actina de arroz truncado que está unido operativamente a un gen *cspB* en el que un extremo 5' del inserto solapa con un extremo 3' de SEC ID N°: 1. En ciertas realizaciones, la secuencia de reemplazo homóloga comprende una secuencia que posibilita el reemplazo de un gen marcador seleccionable que está en un inserto de transgén heterólogo residente con uno o más genes adicionales. Los insertos de transgenes heterólogos que confieren tolerancia a déficit de agua y contienen un marcador seleccionable incluyen, pero sin limitación, insertos que comprenden SEC ID N°: 7 o insertos que comprenden SEC ID N°: 1 y un promotor de actina de arroz truncado que está unido operativamente a un gen *cspB*. Los cromosomas de maíz que comprenden un inserto de transgén heterólogo que confiere tolerancia a déficit de agua y un gen marcador seleccionable también incluyen, pero sin limitación, un cromosoma de maíz que comprende SEC ID N°: 24, un cromosoma de maíz de una planta de maíz que se ha depositado con el N° de Referencia de ATCC PTA-8910, y descendencia de la misma. En ciertas realizaciones, un gen o gen adicional puede insertarse también en SEC ID N°: 5 y/o SEC ID N°: 6.
- También se anticipa que cualquiera del gen o los genes adicionales anteriormente mencionados puede integrarse en un cromosoma que comprende SEC ID N°: 1 y un promotor de actina de arroz truncado que está unido operativamente con un gen *cspB* y uno o más sitios *lox* por recombinación específica de sitio. Los sistemas de recombinación específica de sitio usados para este fin incluyen pero sin limitación, FLP recombinasa/FRT, cre recombinasa/*lox* y combinaciones de los mismos. Se ha desvelado el uso de sistemas de recombinación específicos de sitio en plantas y otros organismos eucariotas (Patente de Estados Unidos N° 5.801.030, Patente de Estados Unidos N° 5.658.772 y Patente de Estados Unidos N° 6.262.341). La presencia de sitios de recombinación específicos del sitio *lox* en cromosomas de maíz que comprenden SEC ID N°: 7 o SEC ID N°: 24 y un cromosoma de maíz de una planta de maíz que se ha depositado con el N° de Referencia de ATCC PTA-8910, y descendencia de la misma, proporciona por lo tanto la integración específica de sitio de genes adicionales en estos cromosomas de maíz. En ciertas realizaciones, la secuencia marcadora seleccionable que está flanqueada por los sitios *lox* en los cromosomas de maíz se escinde en primer lugar por cre recombinasa, dejando un sitio *lox* único en el cromosoma. Después pueden introducirse genes adicionales en una molécula de ADN circular que comprende los genes adicionales y un sitio *lox* unido operativamente e integrado en el cromosoma de maíz en el único sitio *lox* que se dejó en el cromosoma. Se han desvelado esquemas ejemplares para crear moléculas de ADN circulares e integración específica de sitios de genes en cromosomas (Vergunst y col., Nucleic Acid Res. 26(11), 279, 1998). La introducción de sitios de recombinación específicos de sitio distintos de *lox* en la localización cromosómica del inserto de SEC ID N°: 24 y la inserción de genes adicionales en sus sitios de recombinación también se proporciona en el presente documento.

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar ejemplos de ciertas realizaciones preferidas de la invención.

- Los ejemplos no abarcados por el alcance de las reivindicaciones son para fines ilustrativos.

Ejemplos

Ejemplo 1 Producción de plantas de maíz transgénicas

- Se produjeron plantas de maíz transgénicas mediante transformación, mediada por *Agrobacterium*, de maíz LH59 con el vector pMON73608 (Figura 1). Este vector contiene la región codificante de *cspB* regulada por el promotor de actina de arroz, el intrón de actina de arroz y la secuencia de poliadenilación tr7 3', y la región codificante de *nptII* regulada por el promotor 35S de CaMV y la secuencia de poliadenilación 3' NOS.

Tabla 1: Resumen de Elementos Genéticos en pMON73608

Elemento genético	Posición en la Figura 1	Función (Referencia)
CR-Ec.rop-1:1:3	53-244	Secuencia codificante para represor de proteína del cebador
OR-Ec.ori-ColE1-1:1:1	672 - 1260	Origen de replicación de pBR322 para mantenimiento de plásmido en <i>E. coli</i>
P-Ec.aadA-SPC/STR-1:1:1	1793-2681	Promotor bacteriano y secuencia codificante para una enzima modificadora de aminoglicósido, 3' (9)- O nucleotidiltransferasa del transposón Tn7 (referencia de GenBank X03043)
CR-Ec.aadA-SPC/STR-1:1:3		
T-Ec.aadA-SPC/STR-1:1:1		
B-AGRtu.extremo derecho-1:1:12	2816 - 3172	Secuencia del extremo derecho esencial para la transferencia de ADN-T derivado de <i>Agrobacterium</i>
P-Os.Act1-1:1:8	3205 - 4048	Promotor, líder e intrón de actina de arroz
L-Os.Act1-1:1:5	4049 - 4128	
I-Os.Act1-1:1:3	4129 - 4605	
CR-Bs.cspB-1:4:1	4608 - 4811	Región codificante para la proteína CSPB de <i>Bacillus subtilis</i> con un cambio en la segunda posición de aminoácido de leucina a valina (documento WO05033318)
T-AGRtu.tr7-1:1:5	4842 - 5349	Región no traducida 3' de la secuencia codificante del transcrito 7 de <i>Agrobacterium</i> que dirige la poliadenilación
RS-P1.lox1-1:1:1	5424 - 5457	Sitio de recombinación reconocido por Cre recombinasa
P-CaMV.35S-1:1:6	5484 - 5776	Promotor de virus del mosaico de la coliflor (CaMV)
CR-Ec.nptII-Tn5-1:1:3	5841 - 6635	Región codificante aislada de Tn5 que codifica neomicina fosfotransferasa de tipo II. La expresión de este gen en células vegetales confiere resistencia a kanamicina y actúa como un marcador seleccionable para transformación
T-AGRtu.nos-11:13	6667 - 6919	Región no traducida 3' de la secuencia codificante de nopalina sintasa (NOS) de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> que dirige la poliadenilación
RS-P1.lox1-1:1:1	6945 - 6978	Sitio de recombinación reconocido por Cre recombinasa
B-AGRtu.extremo izquierdo-1:1:5	6999 - 7440	Secuencia del extremo izquierdo esencial para la transferencia de ADN-T derivado de <i>Agrobacterium</i>
OR-Ec.oriV-RK2-1:1:6	7527 - 7923	Origen de replicación para <i>Agrobacterium</i> derivado del plásmido de amplia serie de huéspedes RK2

El callo LH59 se inició a partir de embriones inmaduros. Se escindieron embriones inmaduros, de 1,5 mm a 2,0 mm, de plantas de maíz en desarrollo y se cultivaron con el eje embrionario hacia abajo en medio de inicio de callos durante 8-21 días.

- 5 Se preparó *Agrobacterium* mediante procedimientos convencionales y se transfirieron de 50 a 100 trozos de callo a una placa de Petri que contenía aproximadamente 15 ml de suspensión de *Agrobacterium* de $0,1$ a $1,0 \times 10^9$ ufc/ml. Se incubaron trozos de callo, de 2 mm a 8 mm de diámetro durante aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente con la suspensión de *Agrobacterium*, seguido de retirada del líquido por aspiración. Se añadieron aproximadamente 50 μ l de agua destilada estéril a papel de filtro en una placa de Petri de 60 x 20 mm.
- 10 Se transfirieron de quince a 20 trozos de callo inoculado a cada papel de filtro y la placa se selló. El callo y *Agrobacterium* se cultivaron conjuntamente durante aproximadamente 3 días a 23 °C en la oscuridad.

- 15 Los callos se transfirieron de papel de filtro a medio de inicio de callo que contenía carbenicilina y se cultivaron en la oscuridad de 27 °C a 28 °C durante 2-5 días. La selección se inició transfiriendo callos a medio de inicio de callos que contenía nitrato de plata, carbenicilina y paromomicina mg/l. Después de 2 semanas de cultivo en oscuridad de 27 °C a 28 °C, el callo se transfirió a medio que contenía mayores niveles de paromomicina. El callo se subcultivó

después de dos semanas en medio nuevo y se cultivó adicionalmente durante dos semanas en oscuridad de 27 °C a 28 °C. El callo se transfirió de nuevo a medio con mayores niveles de paromomicina. Después de 2-3 semanas de cultivo en oscuridad de 27 °C a 28 °C, se identificó callo resistente a paromomicina.

- 5 Se regeneraron plantas (plantas R0) a partir de callos transformados, se transfirieron al suelo y se cultivaron en invernadero. Las plantas R0 se exploraron mediante PCR con respecto a la presencia de las regiones codificantes de cspB y nptII, y se realizó análisis de Southern para determinar la copia de inserto. Se usó análisis de Taqman para determinar la presencia o ausencia de secuencias de cadena principal del vector. Se seleccionaron acontecimientos transgénicos que eran positivos con respecto a la presencia de genes tanto cspB como nptII, negativos con respecto a la presencia de secuencias de cadena principal del vector y que tenían uno o dos insertos (sitios de integración dentro del genoma de maíz) para análisis fisiológico con respecto a tolerancia a sequía. Los acontecimientos positivos se cultivaron en invernadero hasta su madurez y se autofecundaron. Se recogieron semillas homocigotas, heterocigotas y no transgénicas de múltiples acontecimientos transgénicos obtenidos mediante inserciones genómicas del ADN-T de pMON73608 de las plantas positivas autofecundadas.

Ejemplo 2 Exploración en invernadero con respecto a tolerancia a estrés por déficit de agua

- 15 Se cultivaron plantas de maíz heterocigotas transgénicas a partir de las semillas heterocigotas de acontecimientos transgénicos transformados con pMON73608 (Ejemplo 1) y se exploraron con respecto a tolerancia a estrés por déficit de agua en comparación con plantas de control mediante un procedimiento de alto rendimiento de exploración en invernadero en el que se les priva de agua para crear un "tratamiento de sequía". Se mide la eficacia del uso del agua mediante la velocidad de crecimiento de la planta, por ejemplo, al menos una mejora del 10%, en altura y biomasa durante un tratamiento de sequía, en comparación con plantas de control. También se mide el estado de hidratación de los tejidos de los brotes después de la sequía. La altura inicial de brote (SIH) es la altura de la planta después de 3 semanas de crecimiento en condiciones óptimas. La Altura de Marchitamiento del Brote (SWH) es la altura de la planta al final de una sequía de 6 días. Los experimentos a lo largo del tiempo han mostrado que aproximadamente a los 3 días de tratamiento de sequía, las plantas de maíz naturales básicamente paran de crecer y comienzan a marchitarse. Por lo tanto, una planta de maíz transgénica con eficacia de uso del agua mejorada continuará creciendo (aunque posiblemente en menor grado que con agua) y por lo tanto será significativamente más alta al final de un experimento de sequía. La Masa de Marchitamiento de Brote (SWM) es la cantidad de materia húmeda y seca en el brote (planta separada del cepellón en la línea de suelo) al final de la sequía; SDM se mide después de 2 a 3 semanas en una cámara de secado. La masa Turgente del Brote (STM) es la SWM más la masa del agua que se transporta a tejidos vegetales en 3 días de remojo en agua a 40 grados Celsius en oscuridad. Los experimentos han mostrado que la mayor parte del agua se extrae en 24 horas pero se tardan 2 días más antes de que el aumento adicional se vuelva insignificante. STM-SWM es indicativo de la eficacia de uso del agua en plantas cuando la recuperación del estrés es más importante que la tolerancia a estrés en sí misma. El contenido de agua relativa (RWC) es una medición de cuanto (%) de la planta es agua en la cosecha. $RWC = (SWM-SDM)/(STM-SDM) \times 100$. Las plantas de maíz completamente regadas son de aproximadamente 98% de RWC. Típicamente, en una exploración de marchitamiento las plantas son de aproximadamente 60% de RWC. Se considera que las plantas con mayor RWC al final de una sequía son plantas más sanas y más adecuadas para recuperación y crecimiento después de la sequía. La Velocidad de Crecimiento Relativa (RGR) se calcula para cada brote usando la fórmula $RGR = (SWH-SIH)/((SWH+SIH)/2) \times 100$.
- 40 Las plantas de maíz heterocigotas transgénicas de múltiples acontecimientos transgénicos que comprendían ADN-T de pMON73608, incluyendo MON87460, mostraron tolerancia a estrés por déficit de agua potenciada en comparación con plantas de control.

Ejemplo 3 Rendimiento de campo mejorado de plantas de maíz MON87460 con déficit de agua

- 45 Se realizaron ensayos de campo con agua limitada usando maíz híbrido de uso comercial en ambientes que no recibieron lluvias durante el periodo diana para el tratamiento de déficit de agua, un lapso de 10 a 14 días inmediatamente antes de la floración.

- 50 Se plantaron parcelas de dos filas de 34 plantas por fila a una densidad de 32.000 plantas por cada 0,40 hectáreas en una localización del oeste de Kansas. Cada terreno transgénico se emparejó con un terreno no transgénico del mismo fondo híbrido. Se sembraron doce repeticiones de terrenos emparejados de cada uno de los 21 acontecimientos de inserción independientes, y su par no transgénico, en un diseño en bloque aleatorio. Las plantas se mantuvieron en una condición bien regada usando irrigación elevada hasta el estadio V8 de desarrollo, momento en el cual se retuvo el agua durando un periodo de 14 días.

- 55 El 7º día del tratamiento de privación de agua se determinó la distancia desde la superficie del suelo a la punta de la hoja completamente extendida más joven para cada una de las 3 plantas positivas para el transgén y negativas para el transgén en cada terreno emparejado. Esta medición se repitió 5 días después usando la misma hoja que en el día 7. A partir de las mediciones del día 7 y día 12 se calculó una velocidad de crecimiento, en cm/día, para cada planta medida. Esta velocidad se denomina Velocidad de Extensión de Hoja (LER).

El 8º día del tratamiento se realizó una estimación del contenido de clorofila usando el Minolta SPAD-502 (Spectrum Technologies, Plainfield, IL). Esta medición se tomó en una posición en mitad de la hoja (de la base a la punta) de la hoja completamente expandida más joven para 6 de los 21 acontecimientos. Se recogieron lecturas de SPAD para cada una de las 6 plantas positivas transgénicas y las 6 negativas transgénicas en cada terreno emparejado, para cada repetición de terreno emparejado.

De forma similar, el 8º día del tratamiento, se midieron las tasas fotosintéticas a mediodía, usando la mitad de la hoja de la hoja completamente expandida, más joven, para los mismos 6 de los 21 acontecimientos. Se midieron las tasas fotosintéticas usando el Sistema de Fotosíntesis portátil Ciras-1 de PP System (Amesbury, MA). Se midió la fotosíntesis de la hoja a una $[CO_2]$ atmosférica de $367 \text{ mol} \cdot \text{mol}^{-1}$, una presión de vapor de agua ambiental de 2,3 kPa, y un déficit de presión de vapor de aire en la hoja entre 0,6 y 1,5 kPa, con densidad de flujo fotónico fotosintético entre 1.200 y $1.400 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Se evaluaron veintidós acontecimientos CspB en el ensayo de campo de Kansas. El tratamiento de déficit de agua dio como resultado una reducción media de las velocidades de crecimiento al 50% de la velocidad con buena irrigación. Como una construcción, los transgénicos para CspB demostraron un aumento del 3,6% de las velocidades de extensión de hoja en relación con controles no transgénicos (Tabla 2). MON87460 y un segundo acontecimiento de alto rendimiento demostraron aumentos de la velocidad de crecimiento del 12 y 24%. Las plantas positivas para CspB también demostraron mejoras significativas del contenido de clorofila y tasas fotosintéticas (Tabla 2). En un nivel de construcción, el contenido de clorofila aumentó en 2,5%, con MON87460 y un segundo acontecimiento de alto rendimiento que mostró aumentos del 4,4 y 3,3%. Las mejoras de las tasas fotosintéticas fueron del 3,6% a un nivel de construcción, con aumentos del 8,5 y 7,7% para MON87460 y un segundo acontecimiento de alto rendimiento.

Tabla 2 Crecimiento mejorado de acontecimientos cspB en condiciones de déficit de agua en el campo

<u>Gen-Acontecimiento</u>	<u>% de Aumento de LER (campo)</u>	<u>% de aumento del contenido de Clorofila</u>	<u>% de Aumento de Fotosíntesis</u>
Construcción-CspB	3,6%	2,5%	3,6%
Acontecimiento CspB-Zm MON87460	12%	4,4%	8,5%
Acontecimiento CspB-Zm 2	24%	3,3%	7,7%

Ejemplo 4 Rendimiento mejorado de plantas de maíz MON87460 con tratamiento de agua limitada

El rendimiento de producción de 10 acontecimientos CspB integrados de forma independiente, la mayoría de los cuales habían demostrado previamente mejora del rendimiento vegetativo en exploraciones de invernadero o ensayos de campo, se evaluó en un fondo genético híbrido de élite en 4 localizaciones en California central en las que se aplicó un tratamiento de agua limitada. El tratamiento de agua limitada se aplicó reduciendo la irrigación durante un periodo de 14 días durante el estadio de desarrollo vegetativo tardío, inmediatamente antes de la floración. El tratamiento dio como resultado una reducción neta de aproximadamente $49,2 \text{ cm}^3$ de agua en relación con un régimen de buena irrigación. Esto se consiguió omitiendo dos de tres aplicaciones de $24,6 \text{ cm}^3$ de agua durante el periodo de estrés. El tratamiento redujo la velocidad de crecimiento relativa durante el tratamiento en aproximadamente 50% de las velocidades con buena irrigación y redujo de forma similar la producción media de grano a final de temporada en 50%. Cada localización de ensayo se diseñó como un diseño en bloque desequilibrado de grupos de 4 factores y se plantaron 3 repeticiones por localización. Dentro de cada repetición, los genotipos se seleccionaron aleatoriamente como el primer factor, y las construcciones, acontecimientos y representaciones positivas para el gen frente a negativas para el gen se seleccionaran aleatoriamente como el 2º, 3º y 4º factores, respectivamente. El diseño situó las entradas positivas y negativas para cada selección en parcelas de 2 filas adyacentes. La densidad de población final reflejó las prácticas de plantación locales y varió de 65 a 76 plantas por parcela de 2 filas. Las parcelas eran de 6,40 metros de longitud y la separación de las filas variaba de 76,20 a 101, 60 centímetros de anchura, reflejando las prácticas de plantación locales.

Se recogieron datos de producción de grano de los ensayos de campo de agua limitada y se proporcionan en la Tabla 3 posterior. La producción media en los campos de California con agua limitada fue de 6,8 t/Ha, lo que representa una reducción del 50% en la producción en relación con el promedio de la producción media de cultivos en el medio oeste. Los promedios de producción de plantas positivas para CspB como una construcción, fueron significativamente mayores, en 7,5% ($p < 0,01$). Varios acontecimientos individuales mostraron también ventajas de producción significativas. CspB-Zm MON87460 fue el acontecimiento de mejor rendimiento y demostró una mejora de la producción del 20,4%.

Tabla 3 Producción mejorada de acontecimientos *cspB* en condiciones de agua limitada en el campo

<u>Acontecimiento</u>	<u>Producción (t/Ha)</u>	<u>% de mejora</u>
Media de <i>CspB</i> No transgénico	6,86	
Media de Construcción <i>CspB</i> -	7,38	7,5%
Acontecimiento <i>CspB</i> -Zm MON87460	8,26	20,4%
Acontecimiento <i>CspB</i> -Zm 2	7,61	10,9%

El acontecimiento MON87460 también demostró mejoras significativas del crecimiento de hojas, contenido de clorofila y tasas fotosintéticas, lo que proporciona pruebas de que estas mejoras en la productividad vegetativa se traducen en mejoras del rendimiento reproductivo y la producción de grano, identificando MON87460 como el de mejor rendimiento entre los múltiples acontecimientos transgénicos independientes ensayados en estudios de invernadero o de campo.

Ejemplo 5 Análisis molecular

MON87460 se caracterizó por análisis moleculares detallados, incluyendo exploraciones con respecto a número de insertos (número de sitios de integración dentro del genoma de maíz), número de copias (el número de copias del ADN-T dentro de un locus), la integridad de los casetes insertados y la ausencia de secuencia de cadena principal.

Análisis de transferencia de Southern

Se secaron aproximadamente 2-3 g de tejido de la hoja en un liofilizador durante ~48 horas y se molieron añadiendo perlas metálicas pequeñas y agitando en un agitador de pintura. Cada muestra se mezcló con 6 ml de tampón de extracción (Tris 0,1 M pH 8, EDTA 0,05 M, NaCl 0,5M, SDS 1% con BME 0,071% añadido nuevo), se situó en un baño de agua a 65 °C durante 45 minutos, y se mezcló ocasionalmente. Se añadió acetato potásico 5 M (2 ml), los tubos se invirtieron después dos veces y se transfirieron a un baño de hielo durante 20 minutos. Se añadió cloroformo frío (3 ml) y se mezcló suavemente mediante inversión durante 10 minutos. Las muestras se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se transfirió a nuevos tubos y se combinó con 4 ml de isopropanol frío. Las muestras se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 minutos y el sobrenadante se descartó. El sedimento se resuspendió en 2 ml de tampón T₅₀E₁₀ con RNasa 0,1 mg/ml y se incubó a 65 °C durante 20 minutos. Para precipitar el ADN, se añadieron 3 ml de isopropanol/acetato de amonio 4,4 M (7:1) a cada tubo y se invirtió para mezclar. Las muestras se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 minutos y se descartó el sobrenadante. Los sedimentos se aclararon con 0,5-1,0 ml de EtOH al 80%, después se transfirieron a tubos de microcentrífuga. Después de una breve centrifugación en una microcentrífuga el sobrenadante se descartó y se permitió que los sedimentos se secaran al aire. Los sedimentos se resuspendieron en ~200 µl de tampón TE.

Se digirieron aproximadamente 10 µg de ADN genómico usando 100 unidades de diversas enzimas de restricción en un volumen total de 500 µl. Las digestiones se incubaron a 37 °C durante una noche y se precipitaron con EtOH. El ADN digerido se sedimentó después y se volvió a disolver en 20 µl de tampón TE. Se prepararon moldes de sonda de ADN mediante amplificación por PCR del plásmido pMON73608. Se marcaron aproximadamente 25 ng de cada sonda con ~100 µCi de ³²P-dCTP (Amersham N° de catálogo AA0075) usando cebadores aleatorios (Sistema de marcaje de ADN Radprime®, Invitrogen). Las sondas radiomarcadas se purificaron usando una columna Sephadex G-50 (Roche). Las muestras se cargaron en geles TAE al 0,8% y se procesaron durante 14-18 horas a 30-35 V. Después de la electroforesis, los geles se tiñeron en bromuro de etidio 1,5 µg/ml durante 10-15 minutos y después se fotografiaron. Los geles se situaron después en solución de despurinización (HCl 0,125 N) durante 10-15 minutos seguido de una solución de desnaturalización (NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M), durante 30-40 minutos y después una solución neutralizadora (Tris-HCl 0,5 M pH 7,0, NaCl 1,5 M) durante 30-40 minutos. Los geles se transfirieron después a una solución de SSC 20X durante 5-15 minutos. La transferencia capilar de ADN (Southern, 1975) a membrana de nylon Hybond-N (Amersham) se facilitó durante una noche usando un Turboblottter™ (Schleicher y Schuell) con tampón de transferencia de SSC 20X. El ADN se entrelazó covalentemente con la membrana con un UV Stratalinker® 1800 (Stratagene) usando el ajuste de auto entrelazado y se almacenó a 4 °C hasta que se requiriera. Las membranas se incubaron durante 1-4 horas a 60-65 °C en tampón de prehibridación (Na₂HPO₄·7H₂O 250 mM pH 7,2, SDS 7% y ARNt 0,1 mg/ml). La sonda marcada con ³²P se añadió a tampón de prehibridación nuevo y se hibridó durante una noche a 60-65 °C. Las membranas se lavaron 3 veces en una solución acuosa de SDS 0,1% y SSC 0,1X durante 15-20 minutos.

Las sondas incluyeron las regiones codificantes de *cspB* y *nptII* intactas y sus promotores, intrones y secuencias de poliadenilación respectivos y la cadena principal del plásmido. No se identificaron elementos adicionales del vector de transformación original, unidos o no unidos con los casetogs intactos, en el genoma de estos acontecimientos de

maíz. No se detectó ninguna secuencia de cadena principal. Los datos muestran que el acontecimiento de maíz MON87460 contiene una única inserción de ADN-T con una copia de los casetes de *cspB* y *nptII*.

Los resultados de reacciones que usaban el promotor de actina de arroz y sondas de secuencias de intrones indicaron que la secuencia promotora de actina de arroz completa presente en pMON73608 no está presente en MON87460. Se confirmó que el elemento de intrón de actina de arroz estaba intacto en MON87460.

Análisis de transferencia de Northern

Se aisló ARN del acontecimiento de maíz MON87460 y tejido de hoja natural de plantas crecidas en invernadero de muestras tisulares de un gramo usando un Kit ToTALLY RNA™ (Ambion N° de catálogo 1910). Se prepararon muestras que contenían 5, 10, 25 y 50 µg de MON87460 y ARN natural y se procesaron en un gel de agarosa al 1,0% a 120V durante aproximadamente 2 horas. Después de la electroforesis, los geles se aclararon después en H₂O desionizada transferida a membranas de nylon. Se permitió que los geles se transfirieran durante una noche. Las transferencias se entrecruzaron covalentemente y se situaron a 4 °C para almacenamiento a corto plazo. Antes de la prehibridación, las transferencias se preaclararon en SSC 10X durante 2 minutos. Las transferencias se situaron después en frascos de hibridación individuales con 20 ml de Tampón Sigma Hyb (N° de catálogo H7033) y se prehibridaron a 65 °C durante 1 hora.

Se marcaron aproximadamente 25 ng de moldes de sonda *cspB* y *nptII* con ~50 µCi de ³²P-dCTP usando cebadores aleatorios (Sistema de marcaje de ADN Radprime®, Invitrogen). Se añadieron después sondas radiomarcadas *cspB* y *nptII* desnaturalizadas a tubos separados que contenían 5 ml de tampón de hibridación precalentado. El tampón que contenía cada sonda se mezcló después y se añadió al frasco de hibridación apropiado y se hibridó durante una noche. Después de una hibridación durante una noche se retiraron las transferencias del frasco y se situaron en tampón de lavado de baja rigurosidad (SSC 2X, SDS 0,1%) en una bandeja de vidrio y se situaron en un agitador durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las transferencias se situaron en papel de transferencia y después en frascos de hibridación nuevos con 25 ml de tampón de lavado precalentado de baja rigurosidad (65 °C). Las transferencias se lavaron a 65 °C, dos veces en tampón de lavado de baja rigurosidad durante 15 minutos y una vez a 65 °C, en tampón de lavado de alta rigurosidad (SSC 0,5 X, SDS 0,1%) durante 15 minutos.

El análisis de transferencia de Northern confirmó que se generan transcritos del tamaño esperado tanto para *cspB* (~600 nt) como para *nptII* (~1100 nt) en MON87460.

Secuenciación del inserto de ADN-T y ADN genómico de maíz flanqueante en clon lambda

Se aisló ADN genómico de alta calidad del acontecimiento de maíz MON87460 usando un procedimiento de extracción con cloroformo SDS. Se digirió ADN genómico de MON87460 con *MfeI* y se purificó usando el Kit de Extracción en Gel QIAEX® II (Qiagen), para asegurar la purificación de fragmentos mayores de 10 kb. Este ADN genómico digerido y purificado se usó para ligación en el Kit del Vector Lambda DASH® II/*EcoRI* (Stratagene). Se exploraron aproximadamente 2,5 x 10⁵ colonias usando intrón Ract marcado con ³²P y sondas *cspB*. Se usó ADN purificado de un clon lambda de bacteriófago puro como molde en reacciones de secuenciación para confirmar la secuencia de nucleótidos de ADN-T del inserto de MON87460 y ADN genómico de maíz que flanquea los extremos 5' y 3' del inserto de MON87460.

El análisis de secuencia de ADN confirma que el ADN-T en planta en MON87460 es idéntico a la secuencia correspondiente en pMON73608. Este análisis de secuencia también caracterizó el alcance del truncamiento del extremo 5' del promotor de actina de arroz que se había observado en análisis de Southern. El análisis de secuencia reveló que el RB de *Agrobacterium* y la mayor parte del promotor P-ract no están presentes en el acontecimiento MON87460. El promotor P-ract en MON87460 consiste solamente en 108 pb del extremo 3' de la región promotora de actina de arroz completa (~850 nt) en pMON73608. Este resultado también confirma que la secuencia en la planta para *cspB* y *nptII* en el acontecimiento del maíz MON87460 coincide con las regiones codificantes exactas dentro del vector de transformación pMON73608. Este clon también confirmó 1060 pb de la secuencia flanqueante 5', 3309 pb del inserto de ADN-T y 1260 pb de la secuencia flanqueante 3' para el inserto de MON87460.

Análisis de alelos naturales

Se realizó PCR en ADN genómico de la línea de maíz no transgénico usada en la transformación usando cebadores que hibridan con las regiones flanqueantes 5' y 3' del inserto de MON87460. Se realizaron múltiples combinaciones de cebadores consistiendo cada combinación en un cebador que hibrida con la región flanqueante 5' y 3', respectivamente. El análisis de PCR se realizó usando ~50 ng de molde de ADN genómico en un volumen de reacción de 50 µl. Después se secuenciaron los amplicones resultantes. El análisis del alelo natural mostró que se produjo una delección de 22 pb de ADN genómico de maíz (SEC ID N°: 23) tras la integración del ADN-T de MON87460 en el cromosoma de maíz.

Ejemplo 6 Detección de polinucleótidos de acontecimiento MON87460

La detección del acontecimiento MON87460 en la descendencia resultante del cultivo con una línea MON87460 puede conseguirse mediante extracción de ADN genómico de tejidos vegetales de maíz y análisis con respecto a

polinucleótidos específicos de MON87460. Es de interés particular para la identificación de polinucleótidos MON87460 el uso de PCR para amplificar ADN genómico que comprende secuencias de unión genómica/transgén.

Un amplicón diagnóstico de MON87460 comprende al menos una secuencia de unión, SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 2 (Figura 2). SEC ID N°: 1 corresponde a la unión de la secuencia flanqueante 5' designada de forma arbitraria (posiciones 1051 a 1060 de SEC ID N°: 5) y la región 5' del promotor de actina de arroz truncado (posiciones 1-10 de SEC ID N°: 7) en la construcción de expresión de *cspB*. SEC ID N°: 2 corresponde a la unión del extremo izquierdo integrado de pMON73608 (posiciones 3300 a 3309 de SEC ID N°: 7) y la secuencia flanqueante 3' designada de forma arbitraria (posiciones 1 a 10 de SEC ID N°: 6).

Los pares de cebadores de acontecimientos que producirán un amplicón de diagnóstico para MON87460 incluyen pares de cebadores basados en las secuencias flanqueantes y el ADN insertado de pMON73608. Para generar un amplicón de diagnóstico que comprende al menos 11 nucleótidos de SEC ID N°: 1, se preparan un cebador directo basado en SEC ID N°: 5 y un cebador inverso basado en la secuencia transgénica insertada, SEC ID N°: 7. De forma similar, para generar un amplicón de diagnóstico que comprende al menos 11 nucleótidos de SEC ID N°: 2, se preparan un cebador directo basado en la secuencia transgénica insertada, SEC ID N°: 7, y un cebador inverso basado en la secuencia flanqueante 3', SEC ID N°: 6. Resulta fácilmente evidente para un experto en la materia que los pares de cebadores también pueden diseñarse para producir un amplicón que comprenda polinucleótidos complementarios de al menos 11 nucleótidos de SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 2, en cuyo caso las secuencias directa e inversa se basan en secuencias complementarias de las de SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6 y SEC ID N°: 7.

Se diseñan cebadores que producen amplicones que tienen entre 50 y 1000 bases. Las condiciones de amplificación son como se ilustra en la Tabla 4 y Tabla 5 posteriormente e incluyen un control de tejido positivo del acontecimiento MON87460, un control negativo de una planta de maíz que no es acontecimiento MON87460 y un control negativo que no contiene ADN genómico de maíz. Puede usarse un par de cebadores que amplificará una molécula de ADN de maíz endógena, tal como del gen de ADH, como un control interno para las condiciones de amplificación de ADN.

El ADN de planta de maíz para su uso en reacciones de amplificación de ADN puede aislarse de cualquier tejido de planta de maíz adecuado, y preferentemente se aísla de tejido de la hoja recién formado de plantas de < 1 mes de edad para reacciones como se describe en el presente documento. El tejido de la hoja se recoge usando un punzón de agujero de 7 mm convencional, para recoger tejido equivalente a un trozo de hoja de aproximadamente 1 centímetro de anchura y 2,54 centímetros de longitud. Las muestras tisulares se liofilizan y el tejido seco se muele añadiendo perlas de circonio-sílice de 4-6 mm³ a cada muestra tisular en un tubo de polipropileno y agitando en un agitador de pintura. Las muestras tisulares homogeneizadas se mezclan en una placa de 96 pocillos con 395 ul de tampón de extracción de SDS precalentado (Tris 0,1 M pH 8, EDTA 10 mM, NaCl 1,0 M, SDS 1%), se agitan en vórtex brevemente y se incuban a 65 °C durante 45 minutos. Se añaden 135 ul de acetato potásico frío (5 M). Las muestras se mezclan por agitación en vórtex y la placa se centrifuga a 3300 rpm durante 20 minutos. Se transfieren 100 ul de sobrenadante a una placa de 96 pocillos nueva que contiene 100 ul de isopropanol y las muestras se agitan en vórtex para mezclar. La placa se centrifuga a 3300 rpm durante 20 minutos y el sobrenadante se descarta. Las placas se escurren boca abajo durante 1 minuto. Se añaden 300 ul de etanol al 70% frío y la placa se agita en vórtex brevemente y se sitúa a 4 °C durante 30 minutos. La placa se centrifuga a 3300 rpm durante 20 minutos y se descarta el sobrenadante. La placa se escurre boca abajo y se repite la precipitación con etanol. Después de una centrifugación final (3300 rpm 20 minutos), la placa se escurre durante un minuto y se sitúa en su lateral en un horno a 65 °C durante aproximadamente 15-30 minutos para secar el sedimento. El ADN se resuspende en 100 ul de tampón TE pH 8,0 (Sigma) que contiene RNasa (10 ug/ml). El ADN se almacena a 4 °C durante una noche. El rendimiento de ADN es de aproximadamente 1 ug (10 ng/ul).

El ensayo para el amplicón de MON87460 puede realizarse usando un Sistema de PCR Applied Biosystems GeneAmp 9700, Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700 o termociclador de Gradiente Eppendorf Mastercycler o cualquier otro sistema de amplificación que puede usarse para producir un amplicón diagnóstico de MON87460.

Tabla 4. PCR Específica de Acontecimiento MON87460 de Maíz

Etapa	Reactivo	Volumen	Comentarios
1	Agua de 18 megaohmios	ajuste para volumen final de 10 ul	
2	Mezcla Maestra Universal 2X (Contiene dNTP, enzima y tampón)	5,0 ul	concentración final 1X de dNTP, enzima y tampón

(continuación)

Etapa	Reactivo	Volumen	Comentarios
3	Mezcla de Cebador 1 y Cebador 2 (resuspendida en agua de 18 megaohmios a una concentración de 20 uM para cada cebador) Ejemplo: En un tubo de microcentrífuga, debería añadirse lo siguiente para conseguir 500 ul a una concentración final de 20 uM: 100 ul de Cebador 1 a una concentración de 100 uM 100 ul de Cebador 2 a una concentración de 100 uM 300 ul de agua de 18 megaohmios	0,5 ul	concentración final de 1,0 uM
4	Molde de ADN extraído (5-10 ng cada uno): Muestras de hoja para analizar Control negativo (ADN no transgénico) Control de agua negativo (control sin molde) Control positivo (ADN MON87460)	3,0 ul	

Tabla 5. Condiciones del termociclador TaqMan de Punto Final

Nº de Ciclo	Ajustes
1	50 °C 2 minutos
1	95 °C 10 minutos
10	95 °C 15 segundos
	64 °C 1 minuto (-1 °C/ciclo)
30	95 °C 15 segundos
	54 °C 1 minuto
1	10 °C Siempre

- 5 Se muestra que los amplicones producidos usando los pares de cebadores diseñados contienen polinucleótidos MON87460 mediante hibridación con sondas específicas para las secuencias de unión de MON87460 SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 2, o mediante aislamiento y análisis de secuencia de ADN.

Ejemplo 7 Ensayo específico de acontecimiento TaqMan de punto final

- 10 Se describe en el presente documento una reacción de PCR de TaqMan de punto final específico de acontecimiento MON87460. Con TaqMan de punto final, la señal correspondiente a una amplificación particular se cuantifica usando un sistema de detección fluorescente después de que se complete el ciclo de reacción. El uso de las tres hibridaciones específicas de sitio (dos cebadores de PCR y una sonda marcada con fluorescencia) para generación de señal proporciona un ensayo altamente específico. La sonda hibrida con nucleótidos específicos entre los cebadores directo e inverso. Cuando la extensión de nucleótidos alcanza la sonda hibridada, la taq polimerasa degrada la sonda que libera el flúor del interruptor de modo que se emite una señal. La señal se lee después de que se completen las reacciones.

- 15 Los cebadores polinucleotídicos usados en el ensayo de puntos finales son los cebadores SQ10443 (SEC ID N°: 8), SQ10445 (SEC ID N°: 9) y la sonda usada para detectar el amplicón de MON87460 es la sonda MGBNFQ (unión a surco menor, interruptor no fluorescente) PB3814 marcada con 6FAM™ (SEC ID N°: 10). También puede usarse un cebador de ADN de maíz interno para confirmar la integridad del ADN molde. Por ejemplo, puede conseguirse amplificación de alcohol deshidrogenasa (ADH), un gen endógeno de una única copia dentro del genoma de maíz, usando los cebadores SQ5263 (SEC ID N°: 11) y SQ5264 (SEC ID N°: 12) y detectarse con sonda PB2033 VIC™

(fluorocromo indicador) y TAMRA™ (fluorocromo interruptor) (SEC ID N°: 13). 6FAM™, VIC™ y TAMRA™ son productos colorantes fluorescentes de Applied Biosystems (Foster City, CA) unidos a las sondas de ADN. En estos análisis, la Taq ADN polimerasa escinde sondas que hibridan específicamente con el ADN amplificado y libera el fluoróforo. La separación de fluoróforo e interruptor permite que se produzca fluorescencia lo que es un diagnóstico en estas condiciones de la presencia de polinucleótidos MON87460.

SQ10443 (SEC ID N°: 8) y SQ10445 (SEC ID N°: 9) cuando se usan como se describe en la Tabla 2 posterior producen un amplicón de ADN de 68 nt (SEC ID N°: 20) que es diagnóstico del acontecimiento de ADN MON87460 y se detecta mediante hibridación con una sonda polinucleotídica, tal como PB3814. Este ensayo se ha optimizado para su uso en el formato de 96 pocillos o 384 pocillos usando un Sistema de PCR Applied Biosystems GeneAmp 9700 o MJ Research DNA Engine PTC-225. Los expertos en la materia pueden conocer otros procedimientos y aparatos y usarlos para producir amplicones que identifiquen el acontecimiento de ADN MON87460. Pueden necesitarse ajustes de los parámetros de ciclación para asegurar que las velocidades de rampa sean equivalentes. Se usan muestras de tejido de hoja de maíz en los análisis posteriores, y deberían molerse exhaustivamente para producir una muestra homogénea. Se aísla ADN de hoja de maíz como se ha descrito en el Ejemplo 6. La concentración del ADN de hoja para ensayar está preferentemente dentro del intervalo de 5-10 ng por reacción de PCR. El ADN de control debería extraerse usando el mismo procedimiento que para la extracción de las muestras para analizar. Los controles para este análisis deberían incluir un control positivo de maíz que se sabe que contiene el acontecimiento de ADN MON87460, un control negativo de maíz no transgénico y un control negativo que no contiene ADN molde.

Para reacciones de PCR que usan un Sistema de PCR Applied Biosystems GeneAmp 9700 o termociclador MJ Research DNA Engine PTC-225, se usan los parámetros de ciclación como se describen en la Tabla 3, posterior. Cuando se realiza la PCR en el Perkin-Elmer 9700, el termociclador se procesa con la velocidad de rampa ajustada al máximo.

Tabla 6. PCR TaqMan de Puntos Finales Específica de Acontecimiento MON87460 de Maíz

Etapas	Reactivo	Volumen	Comentarios
1	Agua de 18 megaohmios	ajustar para volumen final de 10 ul	
2	Mezcla Maestra Universal 2X (Contiene dNTP, enzima y tampón)	5,0 ul	concentración final 1X de dNTP, enzima y tampón
3	Mezcla de Cebador 1 y Cebador 2 (resuspendida en agua de 18 megaohmios a una concentración de 20 uM para cada cebador) Ejemplo: En un tubo de microcentrífuga, debería añadirse lo siguiente para conseguir 500 ul a una concentración final de 20 uM: 100 ul de Cebador SQ10443 a una concentración de 100 uM 100 ul de Cebador SQ10445 a una concentración de 100 uM 300 ul de agua de 18 megaohmios	0,5 ul	concentración final de 1,0 uM
4	Sonda MGBNFQ PB3814 de acontecimiento 6-FAM™ (resuspendida en agua de 18 megaohmios a una concentración de 10 uM)	0,2 ul	concentración final de 0,2 uM
5	Cebador de Control Interno 1 (SQ5263) y Cebador de Control Interno 2 (SQ5264). Mezcla (resuspendida en agua de 18 megaohmios a una concentración de 20 uM para cada cebador)	0,5 µl	concentración final de 1,0 µM
6	Sonda de Control Interno VIC™ (PB2033; SEC ID N°: 13) resuspendida en agua de 18 megaohmios a una concentración de 10 µM	0,2 µl	concentración final de 0,2 µM
7	Molde de ADN extraído (5-10 ng cada uno): Muestras de hoja para analizar Control negativo (ADN no transgénico) Control de agua negativo (control sin molde) Control positivo (ADN de MON87460)	3,0 ul	

Tabla 7 Condiciones de termociclador TaqMan de Puntos Finales

Nº de Ciclo	Ajustes	
1	50 °C	2 minutos
1	95 °C	10 minutos
10	95 °C	15 segundos
	64 °C	1 minuto (-1 °C/ciclo)
30	95 °C	15 segundos
	54 °C	1 minuto
1	10 °C	Siempre

Ejemplo 8 Ensayo de cigosidad de PCR de TaqMan de puntos finales

Se describe un ensayo específico para detectar la presencia y cigosidad (homocigoto o hemicigoto) de acontecimiento transgénico MON87460 en ADN genómico extraído de tejido de hoja de maíz como se ha descrito en el Ejemplo 6. La determinación de cigosidad para el acontecimiento MON87460 en una muestra se realizó usando una PCR TaqMan de puntos finales de cigosidad específica de acontecimiento para la que se describen ejemplos de las condiciones en la Tabla 8 y Tabla 9. Las sondas y cebadores de ADN usados en el ensayo de cigosidad son los cebadores SQ21105 (SEC ID N°: 14) y SQ21106 (SEC ID N°: 15), y la sonda MGB (unión con el surco menor) PB3771 marcada con 6FAM™ (SEC ID N°: 16) para detección de polinucleótidos de unión de MON87460 y cebadores SQ21195 (SEC ID N°: 17) y SQ21196 (SEC ID N°: 18), y sonda MGB PB10223 marcada con VIC™ (SEC ID N°: 19) para detección de ADN de maíz natural en el sitio de inserción.

SQ21105 (SEC ID N°: 14) y SQ21106 (SEC ID N°: 15) cuando se usan en estos procedimientos de reacción con PB3771 (SEC ID N°: 16) producen un amplicón de ADN marcado de 134 nt (SEC ID N°: 21) que es diagnóstico del acontecimiento de ADN MON87460. SQ21195 (SEC ID N°: 17) y SQ21196 (SEC ID N°: 18), cuando se usan en estos procedimientos de reacción con PB2512 (SEC ID N°: 12) producen un amplicón de ADN de 145 nt (SEC ID N°: 22) que es diagnóstico del alelo natural. La sonda para esta reacción es específica de la delección de 22 pb del ADN genómico (SEC ID N°: 23) que se produjo en el sitio de inserción de MON87460. La heterocigosidad se determina mediante la presencia de ambos amplicones como se demuestra por la liberación de señal fluorescente de ambas sondas PB3771 y PB10223. Se identifica material genético de planta de maíz homocigota mediante liberación solamente de la señal 6FAM™ de PB3771. Los controles para este análisis deberían incluir un control positivo de muestras de plantas de maíz homocigotas y hemicigotas para el acontecimiento de ADN MON87460, un control negativo de maíz no transgénico y un control negativo que no contiene ADN molde.

Este ensayo se ha optimizado para su uso en el formato de 96 pocillos o 384 pocillos usando un Sistema de PCR Applied Biosystems GeneAmp 9700 o MJ Research DNA Engine PTC-225. Cuando se realiza la PCR en el MJ Engine, el termociclador debería funcionar en el modo calculado. Cuando se realiza la PCR en el Perkin-Elmer 9700, el termociclador funciona con la velocidad de rampa ajustada al máximo.

Tabla 8. PCR TaqMan de Puntos Finales de Cigosidad Específica del Acontecimiento MON87460

Etapas	Reactivo	Volumen	Comentarios
1	Agua de 18 megaohmios	ajustar para volumen final de 10 µl	
2	Mezcla Maestra Universal 2X (Contiene dNTP, enzima y tampón)	5,0 ul	concentración final 1X de dNTP, enzima y tampón
3	Mezcla de Cebador 1 y Cebador 2 (resuspendida en agua de 18 megaohmios a una concentración de 20 uM para cada cebador) Ejemplo: En un tubo de microcentrifuga, debería añadirse lo siguiente para conseguir 500 ul a una concentración final de 20 uM: 100 ul de Cebador SQ21105 a una concentración de 100 uM 100 ul de Cebador SQ21106 a una concentración de 100 uM 300 ul de agua de 18 megaohmios	0,5 ul	concentración final de 1,0 uM

(continuación)

Etapa	Reactivo	Volumen	Comentarios
4	Sonda MGB PB3771 de acontecimiento 6-FAM™ (resuspendida en agua de 18 megaohmios a una concentración de 10 µM)	0,2 µl	concentración final de 0,2 µM
5	Mezcla de Cebador 1 natural (SQ21195) y Cebador 2 natural (SQ21196) (resuspendida en agua de 18 megaohmios a una concentración de 20 µM para cada cebador)	0,5 µl	concentración final de 1,0 µM
6	Sonda MGB VIC™ natural (PB10223) resuspendida en agua de 18 megaohmios a una concentración de 10 µM	0,2 µl	concentración final de 0,2 µM
7	Molde de ADN extraído (5-10 ng cada uno): Muestras de hoja para analizar Control negativo (ADN no transgénico) Control de agua negativo (control sin molde) Control positivo (ADN de MON87460 homocigoto) Control positivo (ADN de MON87460 hemocigoto)	3,0 µl	

Tabla 9 Condiciones de termociclador TaqMan de Puntos Finales de Cigoidad

Nº de Ciclo	Ajustes
1	50 °C 2 minutos
1	95 °C 10 minutos
10	95 °C 15 segundos 64 °C 1 minuto (-1 °C/ciclo)
30	95 °C 15 segundos 54 °C 1 minuto
1	10 °C Siempre

Ejemplo 9 Rendimiento de producción de MON87460

- 5 Se realizaron ensayos de campo adicionales con acontecimiento de expresión de CspB, MON87460, para investigar adicionalmente la capacidad de este acontecimiento para proporcionar tolerancia a déficit de agua durante los estadios del desarrollo vegetativo tardío y reproductivo. Estos son estadios muy importantes desde una perspectiva agrícola debido a la sensibilidad del cultivo en estos estadios de crecimiento y la frecuencia con la se produce una sequía durante estos estadios del desarrollo en las regiones de crecimiento diana.
- 10 El rendimiento de producción de MON87460 se evaluó en tres fondos genéticos híbridos de élite en 5 localizaciones repetidas a lo largo de California central y el oeste de Kansas donde se aplicaron dos tratamientos con limitación de agua distintos. El tratamiento vegetativo tardío se aplicó a los ensayos reduciendo la irrigación durante un periodo de 14 días durante el estadio de desarrollo vegetativo tardío, inmediatamente antes de la floración. El tratamiento redujo la velocidad de crecimiento relativa durante el tratamiento en aproximadamente 50% de las velocidades con buena irrigación y redujo de forma similar la producción de grano de final temporada media en 50%. Se consiguió un
- 15 tratamiento de llenado de grano iniciando las condiciones limitantes de agua en un estadio posterior, en relación con el tratamiento vegetativo, agotando el perfil de humedad del suelo en o cerca de la floración y consiguiendo tensión máxima durante el periodo de llenado del grano. Este tratamiento dio como resultado una reducción de aproximadamente el 25% en las alturas de las plantas y una reducción del 30-40% en la producción de grano como
- 20 resultado de la imposición de tensión. Se evaluaron tres híbridos que expresaban el acontecimiento CspB usando 20 repeticiones de datos a lo largo de 5 localizaciones para cada ventana de tratamiento de tensión.
- Cada localización de ensayo se diseñó como un diseño en bloque desequilibrado de grupo de 3 factores, y se plantaron 4 repeticiones por localización. Dentro de cada repetición, los genotipos se seleccionaron de forma aleatoria como el 1er factor, y los acontecimientos, y los terrenos positivos para el gen frente a negativos para el gen
- 25 se seleccionaron aleatoriamente como el 2º y 3er factores, respectivamente. El diseño situó las entradas positiva y negativa para cada selección en terrenos de 2 filas adyacentes. La densidad de población final reflejó las prácticas de plantación locales y varió de 65 a 76 plantas por terreno de 2 filas. Los terrenos fueron de 6,40 m de longitud y la separación de filas varió de 76,20 a 101,60 cm de anchura, lo que refleja las prácticas de plantación locales.

Se realizó análisis de los datos de producción usando la Versión 9.1.3 del software SAS/STAT (SAS Institute Inc., 2003). El análisis de los cálculos de la varianza se realizó usando los procedimientos MIXED y GLIMMIX. Se identificaron los datos anómalos individualmente en cada localización calculando los residuales analizados por Student suprimidos con respecto al modelo lineal correspondiente para una única localización, comparando esos residuales con cero usando ensayos de t a una tasa de error de Tipo I por experimento del 5% usando p valores ajustados por Bonferroni y eliminando los datos anómalos identificados. Después de dos pases a través de los datos, todas las observaciones restantes se incluyeron en los análisis. Se determinó la producción para cada terreno y se analizó usando un modelo mixto con efectos fijos para construcciones y acontecimientos anidados dentro de construcciones y efectos aleatorios para localizaciones, rep dentro de las localizaciones y la interacción de localizaciones con construcciones. Estos análisis se realizaron por separado para cada híbrido. Se realizaron comparaciones de medias de acontecimiento y construcción con entradas emparejadas negativas con ensayos de t aplicados a medias de mínimos cuadrados. La estabilidad de la producción se examinó comparando estimaciones de regresión lineal sencilla derivadas de acontecimientos positivos y negativos. En ambos casos, el modelo de regresión incluía la producción media del acontecimiento en una localización como la respuesta y la producción media de un linaje de comprobación comercial en la misma localización que el predictor. Después se compararon las entradas positivas y negativas usando sus producciones predichas a partir del modelo de regresión a diversas producciones de referencia de la comprobación comercial.

Las plantas de maíz MON87460 mostraron mejoras en la producción de grano de final de temporada a lo largo de las diferentes entradas híbridas y en ambos regímenes de estrés por agua en comparación con un control natural convencional del mismo fondo genético (Tabla 10). Los beneficios de producción de estos experimentos variaron del 11% hasta el 21% a lo largo de valores de producción que promediaron de 6,4 a 8,5 t/Ha. El acontecimiento CspB transgénico produjo de forma uniforme más que los controles no transgénicos en al menos 0,5 t/Ha en 12 de 15 tratamientos de tensión reductiva y 13 de 15 tratamientos de tensión vegetativa.

Tabla 10 Resultados de Producción de MON87460 De Condiciones con déficit de Agua con Irrigación Controlada

Clase de tensión	Entradas	Producción Media Pos (t/Ha)	Comprobación de Producción Media (t/Ha)	diferencia de t/Ha	% de diferencia
Vegetativo	Híbrido 1 (positivo)	10,1	8,5	1,6	19
Reproductivo	Híbrido 1 (positivo)	9,0	7,7	1,3	16
Todas las tensiones	Híbrido 1 (positivo)	9,1	7,9	1,1	14
Vegetativo	Híbrido 2 (positivo)	7,7	6,5	1,2	18
Reproductivo	Híbrido 2 (positivo)	8,1	6,8	1,3	19
Todas las tensiones	Híbrido 2 (positivo)	7,7	6,4	1,3	21
Vegetativo	Híbrido 3 (positivo)	8,3	7,2	1,1	16
Reproductivo	Híbrido 3 (positivo)	8,9	8,0	0,9	11
Todas las tensiones	Híbrido 3 (positivo)	8,8	7,9	0,9	12

También se realizó un análisis de múltiples años con MON87460 para evaluar la estabilidad de las ventajas de producción en varias localizaciones en condiciones con limitación de agua. Se recopilaron y analizaron localizaciones que habían experimentado algún nivel de estrés por agua, en las que las reducciones de producción variaban del 20 al 80%. Fueron evidentes ventajas de producción a lo largo de múltiples años de ensayos y en una amplia serie de ambientes con grados variantes de estrés por déficit de agua.

A lo largo de cuatro años de ensayos, MON87460 ha demostrado un beneficio de producción medio del 10,5% en tres cruces de ensayo híbrido en ensayos ambientales de tensión controlada. La ventaja de producción media cada año fue de 0,89, 0,48, 0,49 y 0,79 t/Ha, lo que representa aumentos porcentuales de 13,4, 6,7, 10,5 y 11,3%, respectivamente.

Se realizaron evaluaciones de mercado de tierra seca de entradas híbridas de MON87460 en los estados de Dakota del Sur, Nebraska y Kansas. Las localizaciones se seleccionaron basándose en patrones climáticos históricos y producciones de condado medias de 4,5 a 7,7 t/Ha. Cada localización de ensayo se diseñó como un diseño en

bloque desequilibrado de terreno dividido y se plantó con una repetición única por localización. Los terrenos fueron de 30,48 m de longitud y cuatro filas de anchura y las densidades de población finales reflejaban las prácticas de plantación locales en condiciones sin irrigación de aproximadamente 200 plantas por terreno de 30,48 m. La separación entre filas varió de 76,20 cm a 101,60 cm de anchura, lo que refleja las prácticas de plantación locales.

Se instalaron estaciones climáticas en cada localización y los ensayos se supervisaron con respecto a señales de estrés por déficit de agua a lo largo de la temporada. No se proporcionó agua complementaria. Se recogieron datos ambientales y se utilizaron los patrones climáticos de temporada, incluyendo acumulación de agua de lluvia, para clasificar el estrés por déficit de agua durante la temporada para cada localización de tierra seca. Se categorizó que 12 de las localizaciones plantadas a lo largo de estos tres estados habían experimentado estrés por agua durante los estadios del desarrollo de vegetativo tardío a reproductivo y se utilizaron para análisis.

Se observaron beneficios de producción en los mismos tres fondos híbridos que se evaluaron en condiciones de déficit de agua controladas descritas en la Tabla 10. En comparación con el control no transgénico, el acontecimiento MON87460 proporciona beneficios de producción de hasta 0,75 t/Ha, o el 15%. Estas condiciones de crecimiento en tierra seca crearon un ambiente de producción menor (la producción media de los controles fue de 4,9 t/Ha) que las localizaciones de déficit de agua controladas en las que los rendimientos globales de los controles variaron de 6,4 a 8,5 t/Ha.

Por lo tanto, se obtuvieron mejoras de rendimiento significativas con MON87460 en ambientes de sequía controlados así como en condiciones de tierra seca occidental con estrés por agua. MON87460 proporciona tolerancia a estrés por agua usando el agua más eficazmente que los controles negativos suministrando velocidades de crecimiento y producciones de grano mejoradas en condiciones de estrés por agua usando a la vez el equivalente o menos agua.

Ejemplo 10 Cultivo de plantas para producir plantas MON87460 tolerantes a herbicidas

Las plantas con acontecimiento MON87460 se cruzan con una planta de maíz tolerante a herbicida que expresa un gen resistente a glifosato 5-enol-piruvilsiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) para generar plantas mejoradas que tengan tanto tolerancia a déficit de agua como tolerancia a herbicida. Es de particular interés un cruce de una planta de maíz con acontecimiento MON87460 con una planta de maíz con acontecimiento tolerante a herbicida designada como acontecimiento PV-ZMGT32(nk603) y descrita en el documento US6825400.

Se realiza cruzamiento con dos líneas endogámicas homocigotas, una de MON87460 y una de PV-ZMGT32(nk603) para producir semilla híbrida para plantación comercial de un cultivo de maíz que tenga déficit de agua y tolerancia a herbicida.

Como alternativa, se genera una única línea endogámica que comprende tanto MON87460 como PV-ZMGT32(nk603) usando un procedimiento de cultivo de retrocruzamiento parental recurrente para producir una línea fija homocigota para ambos rasgos. La línea endogámica desarrollada de este modo muestra rasgos de tolerancia a déficit de agua y tolerancia a herbicida. La línea endogámica se cruza con una segunda línea endogámica, que puede ser una línea natural de élite o una línea de acontecimiento transgénico que demuestra uno o más rasgos mejorados, para producir semilla para plantar para producir un cultivo de maíz mejorado.

Todos los materiales y procedimientos desvelados y reivindicados en el presente documento pueden realizarse y usarse sin experimentación indebida como se ha enseñado en la divulgación anterior.

<110> Beazley, Kim A Castiglioni, Paolo Dizigan, Mark A Hinchey, Brendan S Kelly, Rebecca A Korte, John A Rock, Amanda Voyles, Christine

<120> ACONTECIMIENTO DE PLANTA DE MAÍZ MON87460 Y COMPOSICIONES Y PROCEDIMIENTOS PARA LA DETECCIÓN DEL MISMO

<130> 38-15(54813)A PCT

<140> nulo

<141> 26-02-2009

<150> US 61/032.568

<151> 29-02-2008

<160> 25

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia del punto de unión 5'

 <400> 1
 5 ggctgtcttt gaggaggatc 20

 <210> 2
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> secuencia del punto de unión 3'

 15 <400> 2
 tgttagatttc acgttgaaga 20

 <210> 3
 <211> 30
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> secuencia del punto de unión 5'
 25
 <400> 3
 tagacggctg tctttgagga ggatcgcgag 30

 <210> 4
 30 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 35 <223> secuencia del punto de unión 3'

 <400> 4
 atccatgtag atttcacgtt gaagaaaaat 30

 40 <210> 5
 <211> 1060
 <212> ADN
 <213> Zea mays

 45 <400> 5

```

gaggtcctgt atggaatcgt gttcgtttat ttcccggggg ccggggcaaa aaagacggca 60
atggattggt ggacttgaca tgtgcggtgc gtgggtccaa cccggcctgg cttttgggcc 120
agcgcgggcc gacatagtga ggcccaaaat ttaaaaagca cagctgcagg cccacggaac 180
cagtggttat gaaaaacgga aacaaagata gtaaatttta cctccttaaa ttgccaccgt 240
atccaatata caaattcagg taatctatct ctataaagca ccaatttcgg ctcttttcat 300
ctatcgtctg tcatgcgctc tgttcctctc catcgtgtat cgcagataaa aggttacatg 360
catttccatg catgtgatgg gataaaaaca agaaaaaagg ttgacatgca tttccatgca 420
gataaaaggt tacatggatt tccttgagga aagtataata agactaaatg ctgaggcgga 480
ggagagagag agaggagatg tgggtagtaa acttttagtc atctttgaca caagatcaaa 540
gaagatttgt gaaattatgc attaaaatat cgaagagcta actactacac gaataagcta 600
aatggtaggc tgcaaaggtg attacagcta gcagttgact ctattattaa acttcctctt 660
agggcaacag tagttggaaa ggtttttttg gtgctgccca gatgcaaact aaaatccatg 720
catcctctct caacctggaa ggtgggccta aaaaagatga tctaccatcc acggatccac 780
ctgtcagctc aagttattgg gtttaggaaa caggaccta cgtggagatg tgtgctggac 840
gggcgggcct cccacctgct acgcccaggg cggaacgggt cgaaacgacg cagcgttttg 900
ctgtgcgcct gtgcgtctgg cggtcagcgc gagcgtgact gcgttttcgt ttgcgttaga 960
cgacgatcat cgctggaaat ttggtattct ctcacgttga aggaaaatgg attggagggg 1020
gtatgtagat aaattttcaa agcgttagac ggctgtcttt 1060

```

<210> 6
 <211> 1260
 <212> ADN
 <213> Zea mays

 <400> 6

acgttgaaga aaaatggatg gagggaggaa gtagataaag ttttttggtg tatattgtga 60
 ttttaatttg aaatcaagct tggcacaacc gtggccgaaa tttggcctgg ccactaatgg 120
 ccatgaacca agcgtagttt gccgattacc ccgtcccgac ggtacgactt tctctaactg 180
 ctcggttact gtccctgcaa cctgcatctc atgactccag gccggcccaa caccagcagc 240
 gaccgcgacc aggtccctcc tcctccctcca gccacgggca agaggccgcg cgcattgctct 300
 cgctcctggt cccggtaatc cggcccagta ccttgggtacc gcaccgtacc tgtaattctct 360
 atctctagtt ctctagtaca tattaagtca atagtgtaga ctgtaacact accatgactt 420
 catcctccct tacctcgctc tctgcgcacg cacaaccac ccttcgcgcc catataggag 480
 ccgatatcgt gccccccgct ctggccgcac gcttcctaa cccctcgtgg actaggcttc 540
 ccctccacga cgaggccacg acaatgggtg ccccgccacg acgaggccgc ggtgtgggag 600
 aaggaggcga cgtgacctac agtccaaggc ctcacatcca catacatgag tcatctaatt 660
 gattaatcta tagcctgggc gcgctgtgct gctactgctt gatcgacgag tgctgttgag 720
 acccgtctgt catcttcgct agctagacga agcatccgag tacaactcta aacatacgaa 780
 cattttaata acgagagcat ataacgataa atagtgtctt tacattaatg tatgttatca 840
 atacttattg actcagtac aaagcacgga catacatcta gtagttaata ataaaaataa 900
 ataattacct tattaaacga tcatttatta tataaatgta tttatttttt atgtacatat 960
 aataagttat tacaatctga caatatatat aagtgataga acataaagta gaggaacaaa 1020
 cggaacgtaa aggaaaacga agctagtcag gtagatgctc ccgaggacaa aaaaaagg 1080
 gcatagttgt caagtttaat cttcccaagt tttatcttac gtagtagtag agcgagagcg 1140
 gtccaattaa gggcacgcac agttgcagca ggtgcagggc tccagtagcc gcggcgggta 1200
 cgctcgcagt cgcagggcgc cgcgcctagt tctgctgccc ggcccgggct atgaaccaac 1260

<210> 7
 <211> 3309
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Casete de transgén insertado

<400> 7

gaggaggatc gcgagccagc gacgaggccg gccctccctc cgcttccaaa gaaacgcccc 60
 ccatcgccac tatatacata cccccccctc tcctcccatc cccccaacc taccaccacc 120

accaccaCCA cctccacctc ctccccctc gctgcgggac gacgagctcc tccccctcc 180
 ccctccgcgc ccgcgcgcgc ggtaaccacc ccgcctctct cctctttctt tctccgtttt 240
 ttttttccgt ctccgtctcg atctttggcc ttggtagttt ggggtgggca gaggcggctt 300
 cgtgcgcgcc cagatcgggtg ccgcgggaggg gcgggatctc gcggctgggg ctctcgccgg 360
 cgtggatccg gcccgatctt ccgcggggaat ggggctctcg gatgtagatc tgcgatccgc 420
 cgttggtggg ggagatgatg gggggtttaa aatttccgcc atgctaaaca agatcaggaa 480
 gaggggaaaa gggcactatg gtttatattt ttatatattt ctgctgcttc gtcaggctta 540
 gatgtgctag atctttcttt cttctttttg tgggtagaat ttgaatccct cagcattggt 600
 catcggtagt tttcttttc atgatttggtg acaaatgcag cctcgtgcgg agcttttttg 660
 taggtagacc atggtagaag gtaaagtaaa atgggtcaac tctgaaaaag gtttcggatt 720
 catcgaagta gaaggtaag acgatgtatt cgttcatttc tctgctattc aaggcgaagg 780
 cttcaaaact ttagaagaag gccaaagtgt ttcttttgaa atcgttgaag gaaaccgcgg 840
 accacaagct gctaacgtta ctaaagaagc gtgaatttaa atgggcccgg gggatccact 900
 agttctagct atatcatcaa tttatgtatt acacataata tcgcactcag tctttcatct 960
 acggcaatgt accagctgat ataatcagtt attgaaatat ttctgaattt aaacttgcat 1020
 caataaattt atgtttttgc ttggactata atacctgact tgttatttta tcaataaata 1080
 tttaaactat atttctttca agatatcatt ctttacaagt atacgtgttt aaattgaata 1140
 ccataaattt ttatttttca aatacatgta aaattatgaa atgggagtggt tggcgaccga 1200
 gctcaagcac acttcaattc ctataacgga ccaaatcgca aaaattataa taacatatta 1260
 tttcatcctg gattaaaaga aagtcaccgg ggattatttt gtgacgccga ttacatacgg 1320
 cgacaataaa gacattggaa atcgtagtac atattggaat aactgatta tattaatgat 1380
 gaatacatat tttaatatcc ttacgtagga tcgatccgaa ttccgcacac gcggccgctc 1440
 tagaactagt ggatccccc cttaattaag ggggctgcag gaattcataa cttcgtataa 1500
 tgtatgctat acgaagttat agcttggtcg agtggaagct agctttccga tcctacctgt 1560
 cacttcatca aaaggacagt agaaaaggaa ggtggcacct acaaatgcca tcattgcgat 1620
 aaaggaaagg ctatcattca agatgcctct gccgacagtg gtcccaaaga tggaccccca 1680
 cccacgagga gcacgtgga aaaagaagac gttccaacca cgtcttcaaa gcaagtggat 1740
 tgatgtgata cttccactga cgtaagggat gacgcacaat cccactatcc ttcgcaagac 1800
 ccttctctta tataaggaag ttcatttcat ttggagagga cacgctgaaa tcaccagtct 1860
 ctctctacaa gatcggggat ctctagctag acgatcgttt cgcattgattg aacaagatgg 1920
 attgcacgca ggttctccgg ccgcttgggt ggagaggcta ttcggctatg actgggcaca 1980

acagacaatc ggctgctctg atgccgccgt gttccggctg tcagcgcagg ggcgcccggt 2040
tctttttgtc aagaccgacc tgtccggctg cctgaatgaa ctgcaggacg aggcagcgcg 2100
gctatcgtgg ctggccacga cgggcggtcc ttgcgcagct gtgctcgacg ttgtcactga 2160
agcgggaagg gactggctgc tattgggcga agtgccgggg caggatctcc tgtcatctca 2220
ccttgctcct gccgagaaag tatccatcat ggctgatgca atgcggcggc tgcatacgtc 2280
tgatccggct acctgcccac tcgaccacca agcgaacat cgcacgcagc gacacgtac 2340
tcggatggaa gccggctctg tcgatcagga tgatctggac gaagagcatc aggggctcgc 2400
gccagccgaa ctgttcgcca ggctcaaggc gcgcatgccc gacggcgagg atctcgtcgt 2460
gacgcatggc gatgcctgct tgccgaatat catggtggaa aatggccgct tttctggatt 2520
catcgactgt ggccggctgg gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt tggctaccgc 2580
tgatattgct gaagagcttg gcggcgaaatg ggctgaccgc ttcctcgtgc tttacggtat 2640
cgccgctccc gattcgcagc gcacgcctt ctatcgctt cttgacgagt tcttctgagc 2700
gggactctgg ggttcgatcc ccaattccc atcggtcaaa catttggcaa taaagtttct 2760
taagattgaa tcctgttgcc ggtcttgca tgattatcat ataatttctg ttgaattacg 2820
ttaagcatgt aataattaac atgtaatgca tgacgttatt tatgagatgg gtttttatga 2880
ttagagtccc gcaattatac atttaatacg cgatagaaaa caaatatag cgcgcaaact 2940
aggataaatt atcgcgcgcg gtgtcatcta tgttactaga tcggggatcg ggccactcga 3000
ccaagctata acttcgtata atgtatgcta tacgaagtta tcgcgcaaaa tcgtgaagtt 3060
tctcatctaa gccccattt ggacgtgaat gtagacacgt cgaaataaag atttccgaat 3120
tagaataaatt tgtttattgc tttcgcctat aaatacgacg gatcgtaatt tgcggtttta 3180
tcaaaatgta ctttcatttt ataataacgc tgcggacatc tacatttttg aattgaaaaa 3240
aaattggtaa ttactctttc tttttctcca tattgaccat catactcatt gctgatccat 3300
gtagatttc 3309

<210> 8
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 8
ttgaccatca tactcattgc tg 22

<210> 9
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

 5 <400> 9
 cttcctccct ccatccattt t 21

 10 <210> 10
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Sonda

 20 <400> 10
 tcttcaacgt gaaatctaca t 21

 <210> 11
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> Cebador

 <400> 11
 ccagcctcat ggccaaag 18

 30 <210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 35 <220>
 <223> Cebador

 <400> 12
 ccttcttggc ggcttatctg 20

 40 <210> 13
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 45 <220>
 <223> Sonda

 <400> 13
 cttaggggca gactcccgtg ttcct 26

 50 <210> 14
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 55 <220>
 <223> Cebador

 <400> 14
 ggttgacca agcttgattt caa 23

 60 <210> 15
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 65 <210> 15
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

 5 <400> 15
 ctccatattg accatcatatc tcattgc 27

 10 <210> 16
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Sonda

 20 <400> 16
 tgatccatgt agatttcacg ttga 24

 <210> 17
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> Cebador

 30 <400> 17
 tcaaagcgtt agacggctgt ctt 23

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

 35 <220>
 <223> Cebador

 <400> 18
 ttcgccacg gtttgacc 18

 40 <210> 19
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 45 <220>
 <223> Sonda

 <400> 19
 tgctggaaat ttgtattct 20

 50 <210> 20
 <211> 68
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 55 <220>
 <223> Amplicón

 60 <400> 20
 ttgaccatca tactcattgc tgatccatgt agatttcacg ttgaagaaaa atggatggag **60**
 ggaggaag **68**

 <210> 21

<211> 134
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Amplicón
 <400> 21

ctccatattg accatcatatc tcattgctga tccatgtaga tttcacgttg aagaaaaatg 60
 gatggaggga ggaagtagat aaagtttttt gttgtatatatt gtgatttttaa tttgaaatca 120
 agcttgggtca aacc 134

10

<210> 22
 <211> 145
 <212> ADN
 <213> Zea mays

15

<220>
 <223> Amplicón

20

<400> 22

tcaaagcggt agacggctgt ctttgctgga aatttggtat tctctcacgt tgaagaaaaa 60
 tggatggagg gaggaagtag ataaagtttt ttgttgatata ttgtgatattt aatttgaaat 120
 caagcttgggt caaaccgtgg ccgaa 145

25

<210> 23
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Zea mays

30

<400> 23
 gctggaaatt tggattctc tc 22

35

<210> 24
 <211> 5629
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia del transgén y genoma de maíz en el punto de unión

40

<400> 24

gaggtcctgt atggaatcgt gttcgtttat ttcccggggg ccggggcaaa aaagacggca 60
 atggattggt ggacttgaca tgtgcggtgc gtgggtccaa ccgggcctgg cttttgggcc 120
 agcgcgggcc gacatagtga ggcccaaaat ttaaaaagca cagctgcagg cccacggaac 180
 cagtggttat gaaaaacgga aacaaagata gtaaatttta cctccttaaa ttgccaccgt 240
 atccaatata caaattcagg taatctattc ctataaagca ccaatttcog ctcttttcat 300
 ctatcgtctg tcatgcgctc tgttcctctc catcgtgtat cgcagataaa aggttacatg 360
 catttccatg catgtgatgg gataaaaaca agaaaaaagg ttgacatgca tttccatgca 420
 gataaaaggt tacatggatt tccttgagga aagtataata agactaaatg ctgaggcgga 480
 ggagagagag agaggagatg tgggtagtaa acttttagtc atctttgaca caagatcaaa 540
 gaagatttgt gaaattatgc attaaaatat cgaagagcta actactacac gaataagcta 600
 aatggtaggc tgcaaagggtg attacagcta gcagttgact ctattattaa acttcctctt 660
 agggcaacag tagttgaaa gggttttttg gtgctgccca gatgcaaact aaaatccatg 720
 catcctctct caacctgga ggtgggccta aaaaagatga tctaccatcc acggatccac 780
 ctgtcagctc aagttattgg gtttaggaaa caggaccta cgtggagatg tgtgctggac 840
 gggcgggcct cccacctgtc acgccgcagg cggaacggtg cgaaacgacg cagcgttttg 900
 ctgtgcgcct gtgcgtctgg cggtcagcgc gagcgtgact gcgttttcgt ttgcgttaga 960

cgacgatcat cgctggaaat ttggtattct ctcacgttga aggaaaatgg attggagggga 1020
 gtatgtagat aaattttcaa agcgttagac ggctgtcttt gaggaggatc gcgagccagc 1080
 gacgaggccg gccctccctc cgcttccaaa gaaacgcccc ccatcgccac tatatacata 1140
 cccccccctc tctcccatc cccccaaccc taccaccacc accaccacca cctccacctc 1200
 ctccccctc gctgcgggac gacgagctcc tccccctcc cctccgccc cgcgcgcgc 1260
 ggtaaccacc ccgccccctc cctctttctt tctccgtttt tttttccgt ctcgggtctcg 1320
 atctttggcc ttggtagttt ggggtggcga gaggcggctt cgtgcgcgc cagatcgggtg 1380
 cgcgggaggg gcgggatctc gcggctgggg ctctcgccgg cgtggatccg gcccgatct 1440
 cgcgggggaat ggggctctcg gatgtagatc tgcgatccgc cgttggttggg ggagatgatg 1500
 gggggtttta aatttccgcc atgctaaaca agatcaggaa gaggggaaaa gggcactatg 1560
 gtttatatatt ttatatattt ctgctgcttc gtcaggctta gatgtgctag atctttcttt 1620
 cttctttttg tgggtagaat ttgaatccct cagcattgtt catcggtagt tttcttttc 1680
 atgatttggtg acaaatgcag cctcgtgcgg agcttttttg taggtagacc atggtagaag 1740
 gtaaagtaaa atggttcaac tctgaaaaag gtttcggatt catcgaagta gaaggtaag 1800
 acgatgtatt cgttcatttc tctgctatcc aaggcgaagg cttcaaaact ttagaagaag 1860
 gccaaagctgt ttcttttgaa atcggtgaag gaaaccgccc accacaagct gctaacgtta 1920
 ctaaagaagc gtgaatttaa atgggcccgg gggatccact agttctagct atatcatcaa 1980
 tttatgtatt acacataata tcgcactcag tctttcatct acggcaatgt accagctgat 2040
 ataatcagtt attgaaatat ttctgaattt aaacttgcat caataaattt atgtttttgc 2100
 ttggactata atacctgact tggtatttta tcaataaata tttaaactat atttctttca 2160
 agatatcatt ctttacaagt atacgtgttt aaattgaata ccataaattt ttatttttca 2220
 aatacatgta aaattatgaa atgggagtggt tggcgaccga gctcaagcac acttcaattc 2280
 ctataacgga ccaaatcgca aaaattataa taacatatta tttcatcctg gattaaaaga 2340
 aagtcaccgg ggattatttt gtgacgccga ttacatacgg cgacaataaa gacattggaa 2400
 atcgtagtac atattggaat acactgatta tattaatgat gaatacatac tttaatatcc 2460
 ttacgtagga tcgatccgaa ttgcgcacac gcggcgcctc tagaactagt ggatcccccc 2520
 cttaattaag ggggctgcag gaattcataa cttcgtataa tgtatgctat acgaagtat 2580
 agcttggctc agtggaagct agctttccga tcctacctgt cacttcatca aaaggacagt 2640
 agaaaaggaa ggtggcacct acaaatgcc tcatcgcat aaaggaaagg ctatcattca 2700
 agatgcctct gccgacagt gtcccaaaga tggaccccc cccacgagga gcatcgtgga 2760
 aaaagaagac gttccaacca cgtcttcaaa gcaagtggat tgatgtgata cttccactga 2820

cgtaagggat gacgcacaat cccactatcc ttcgcaagac ccttcctcta tataaggaag 2880
 ttcatlcat ttggagagga cacgctgaaa tcaccagtct ctctctacaa gatcggggat 2940
 ctctagctag acgatcggtt cgcattgatt aacaagatgg attgcacgca ggttctccgg 3000
 ccgcttgggt ggagaggcta ttgggctatg actgggcaca acagacaatc ggctgctctg 3060
 atgccgcggt gttccggctg tcagcgcagg ggcgcgcggt tctttttgtc aagaccgacc 3120
 tgtccgggtg cctgaatgaa ctgcaggacg aggcagcgcg gctatcgtgg ctggccacga 3180
 cgggcttcc ttggcagct gtgctcgacg ttgtcactga agcgggaagg gactggctgc 3240
 tattgggcga agtgccgggg caggatctcc tgtcatctca ccttgctcct gccgagaaag 3300
 tatccatcat ggctgatgca atgcggcggc tgcatacgtt tgatccggct acctgccccat 3360
 tcgaccacca agcgaacat cgcattcgagc gagcacgtac tcggatggaa gccggtcttg 3420
 tcgatcagga tgatctggac gaagagcatc aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgcca 3480
 ggctcaaggc gcgcattgcc gacggcgagg atctcgtcgt gacgcattgg gatgcctgct 3540
 tgccgaatat catggtggaa aatggcgcgt tttctggatt catcgactgt ggccggctgg 3600
 gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt tggctaccgg tgatattgct gaagagcttg 3660
 gcggcgaatg ggctgaccgc ttctcgtgc ttacgggtat cgcgcctccc gattcgcagc 3720
 gcatcgctt ctatcgctt cttgacgagt tctctgagc gggactctgg ggttcgctcc 3780
 ccaattccc atcgctcaa catttggcaa taaagtttct taagattgaa tctgttgcc 3840
 ggtcttgca tgattatcat ataatttctg ttgaattacg ttaagcatgt aataattaac 3900
 atgtaatgca tgacgttatt tatgagatgg gtttttatga ttagagtccc gcaattatac 3960
 atttaatacg cgatagaaaa caaatatag cgcgcaaaact aggataaatt atcgcgcgcg 4020
 gtgtcatcta tgttactaga tcggggatcg ggccactcga ccaagctata acttcgtata 4080
 atgtatgcta tacgaagtta tcgcgcaaaa tcgtgaagtt tctcatctaa gccccattt 4140
 ggacgtgaat gtagacacgt cgaaataaag atttccgaat tagaataatt tgtttattgc 4200
 tttcgcttat aaatacgacg gatcgtaatt tgctggttta tcaaatgta ctttcatttt 4260
 ataataacgc tgcggacatc tacatttttg aattgaaaaa aaattggtaa ttactctttc 4320
 tttttctcca tattgacct catactcatt gctgatccat gtagatttca cgttgaagaa 4380
 aaatggatgg agggaggaag tagataaagt tttttgttgt atattgtgat ttaatttga 4440
 aatcaagctt ggtcaaaccg tggccgaaat ttggcctggc cactaatggc catgaaccaa 4500
 gcgtagtttg ccgattacc cgtcccgacg gtacgacttt ctctaatcgc tcggttactg 4560
 tccctgcaac ctgcattctca tgactccagg ccggcccaac accagcagcg accgcgacca 4620

ggctcctcct cctcctccag ccacgggcaa gagggccgcg gcacgtcttc gctcctgttc 4680
 ccggtaatcc ggcccagtag cttggtaccg caccgtacct gtaatctcta tctctagttc 4740
 tctagtagat attaatgcaa tagtgtagac tgtaacacta ccatgacttc atcctccctt 4800
 acctcgctct ctgcgcacgc acaaaccacc cttccgcccc atataggagc cgatatcgtg 4860
 cccccgtcc tgccgcacgc cttccctaac ccctcgtgga ctaggcttcc cctccacgac 4920
 gagggcacga caatggttgc ccccgacgca cgaggccgcg gtgtgggcca aggaggcgac 4980
 gtgacctaca gtccaaggcc tcacatccac atacatgcgt catctaattg attaatctat 5040
 agcctgggtc cgctgtgctg ctactgcttg atcgacgagt gctgttgcca cccgtctgtc 5100
 atcttcgtca gctagacgaa gcacccgagt acaactctaa acatacgaac attttaataa 5160
 cgagagcata taacgataaa tagtgcttct acattaatgt atgttatcaa tacttattga 5220
 ctgagtgaac aagcacggac atacatctag tagttaataa taaaaataaa taattacctt 5280
 attaaacgat catttattat ataaatgtat ttatttttta tgtacatata ataagttatt 5340
 acaatctgac aatatatata agtgatagaa cataaagtag aggaacaaac ggaacgtaaa 5400
 ggaaaacgaa gctagtcagg tagatgctcc cgaggacaaa aaaaaagggg catagttgtc 5460
 aagtttaatc ttccaagtt ttatcttacg tagtagtaga gcgagagcgg tccaattaag 5520
 ggcacgcaca gttgcagcag gtgcagggct ccagtagccg cggcgggtac gctcgagtc 5580
 gcagggcgcc gcgcctagtt ctgctgcccg gcccggttca tgaaccaac 5629

<210> 25
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> punto de unión 5'

<400> 25
 cggtgtctt tgaggaggat cg 22

REIVINDICACIONES

1. Un cromosoma de maíz que comprende un polinucleótido de unión genómica/transgén de SEC ID N°: 1 y un inserto transgénico heterólogo que comprende un promotor de actina de arroz truncado que está unido operativamente con un gen cspB, en el que un extremo 5' de dicho inserto solapa con un extremo 3' de SEC ID N°: 1.
2. El cromosoma de maíz de la reivindicación 1, en el que
 - (i) dicho inserto transgénico heterólogo confiere tolerancia a déficit de agua, preferentemente el cromosoma de maíz comprende SEC ID N°: 7 o SEC ID N°: 24; o
 - (ii) dicho cromosoma de maíz comprende además SEC ID N°: 2.
3. Una planta de maíz que tiene un cromosoma que comprende un polinucleótido de unión genómica/transgén de SEC ID N°: 1 y un inserto transgénico heterólogo que comprende un promotor de actina de arroz truncado que está unido operativamente con un gen cspB, en el que un extremo 5' de dicho inserto solapa con un extremo 3' de SEC ID N°: 1.
4. La planta de maíz de la reivindicación 3, en la que
 - (i) dicho cromosoma comprende además SEC ID N°: 2, preferentemente dicho cromosoma comprende SEC ID N°: 7 o SEC ID N°: 24; o
 - (ii) la planta de maíz comprende además ADN para expresar una EPSPS resistente a glifosato.
5. Una semilla de una planta de maíz que tiene un cromosoma que comprende un polinucleótido de unión genómica/transgén de SEC ID N°: 1 y un inserto transgénico heterólogo que comprende un promotor de actina de arroz truncado que está unido operativamente con un gen cspB, en el que un extremo 5' de dicho inserto solapa con un extremo 3' de SEC ID N°: 1.
6. La semilla de la reivindicación 5, en la que dicho cromosoma comprende además SEC ID N°: 2, preferentemente dicho cromosoma comprende SEC ID N°: 7 o SEC ID N°: 24.
7. Uso de la semilla de maíz de la reivindicación 5 para preparar un alimento o producto de pienso procesado, en el que dicho alimento o producto de pienso procesado comprende una cantidad detectable de un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2 o un complemento de las mismas.
8. El uso de la reivindicación 7, en el que
 - (i) dicho alimento o dicho producto de pienso comprende harina gruesa de maíz, harina de maíz o gluten de maíz;
 - (ii) dicho polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4 o un complemento de las mismas; o
 - (iii) dicho polinucleótido comprende además una secuencia de nucleótidos contenida en SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7 o SEC ID N°: 24.
9. Una semilla derivada de una planta de maíz transgénica designada MON87460, o descendencia de la misma, habiéndose depositado semilla representativa de dicha planta de maíz con el N° de Referencia de ATCC PTA-8910, comprendiendo dicha semilla SEC ID N°: 1.
10. La semilla de la reivindicación 9, en la que dicha planta o descendencia de la misma tiene un cromosoma que comprende SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 7 o SEC ID N°: 24.
11. Una planta de maíz descendiente cultivada a partir de la semilla de la reivindicación 9 o una semilla derivada de dicha planta de maíz descendiente, en la que dicha planta de maíz descendiente y dicha semilla derivada de dicha planta de maíz descendiente tienen un cromosoma que comprende SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 7 o SEC ID N°: 24.
12. Un procedimiento para detectar la presencia de SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 2 en una muestra tisular de maíz, comprendiendo el procedimiento.
 - (a) poner en contacto la muestra con un par de cebadores de ADN, comprendiendo dicho par de cebadores: i) un primer cebador derivado de la secuencia de ADN en el genoma de la planta MON87460 adyacente al sitio de inserción del ADN heterólogo insertado (ADN transgénico) y un segundo cebador derivado del ADN heterólogo insertado; o ii) dos cebadores derivados de secuencia genómica en ambos lados del ADN heterólogo insertado; y realizar una reacción de amplificación de ácido polinucleico, produciendo de este modo un amplicón; y detectar dicho amplicón, comprendiendo dicho amplicón SEC ID N°: 1 y/o SEC ID N°: 2; o
 - (b) poner en contacto la muestra que comprende ADN con una sonda que hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con ADN genómico del acontecimiento de maíz MON87460 y no hibrida en las condiciones de hibridación rigurosas con ADN genómico de una planta de maíz de control, siendo dicha sonda homóloga o

complementaria de SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 2; y

someter la muestra y la sonda a condiciones de hibridación rigurosas; y detectar la hibridación de la sonda con ADN de la muestra, detectando de este modo SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 2 en la muestra tisular de maíz.

5 13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que al menos una molécula cebadora de ADN en dicho par de cebadores comprende al menos 11 nucleótidos consecutivos de SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7 o un complemento de las mismas.

14. Un procedimiento para obtener una planta de maíz tolerante a déficit de agua que carezca de un gen marcador seleccionable intacto que comprende las etapas de:

10 exponer una célula vegetal de maíz que tiene un cromosoma de maíz que comprende un polinucleótido de unión genómica/transgén de SEC ID N°: 1 y un inserto de transgén heterólogo a uno o más agentes inductores de recombinación, en el que dicho inserto de transgén heterólogo comprende un promotor de actina de arroz truncado que está unido operativamente con un gen cspB, en el que un extremo 5' de dicho inserto solapa con un extremo 3' de SEC ID N°: 1 y un gen marcador seleccionable; seleccionar una planta de maíz que
15 comprende SEC ID N°: 1 y un promotor de actina de arroz truncado que está unido operativamente con un gen cspB en el que dicho gen marcador seleccionable o una parte del mismo se ha eliminado o alterado, obteniendo de este modo una planta de maíz tolerante a déficit de agua que carece de un gen marcador seleccionable intacto.

15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que

20 (i) dicho agente inductor de recombinación comprende una recombinasa, una nucleasa, una secuencia de reemplazo homóloga, una secuencia de reemplazo no homóloga, o una combinación de las mismas, preferentemente dicha secuencia de reemplazo homóloga o dicha secuencia de reemplazo no homóloga comprende uno o más genes; o
(ii) dicho inserto de transgén heterólogo comprende SEC ID N°: 7 o SEC ID N°: 24.

16. Un polinucleótido que comprende SEC ID N°: 25, o un complemento de la misma.

25 17. El polinucleótido de la reivindicación 16, en el que

(i) dicho polinucleótido comprende además una secuencia de nucleótidos contenida en SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 7; o
(ii) dicho polinucleótido comprende SEC ID N°: 24.

18. Un polinucleótido que comprende SEC ID N°: 2, o un complemento de la misma.

30 19. El polinucleótido de la reivindicación 18, en el que dicho polinucleótido comprende además una secuencia de nucleótidos contenida en SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 6 o SEC ID N°: 7.

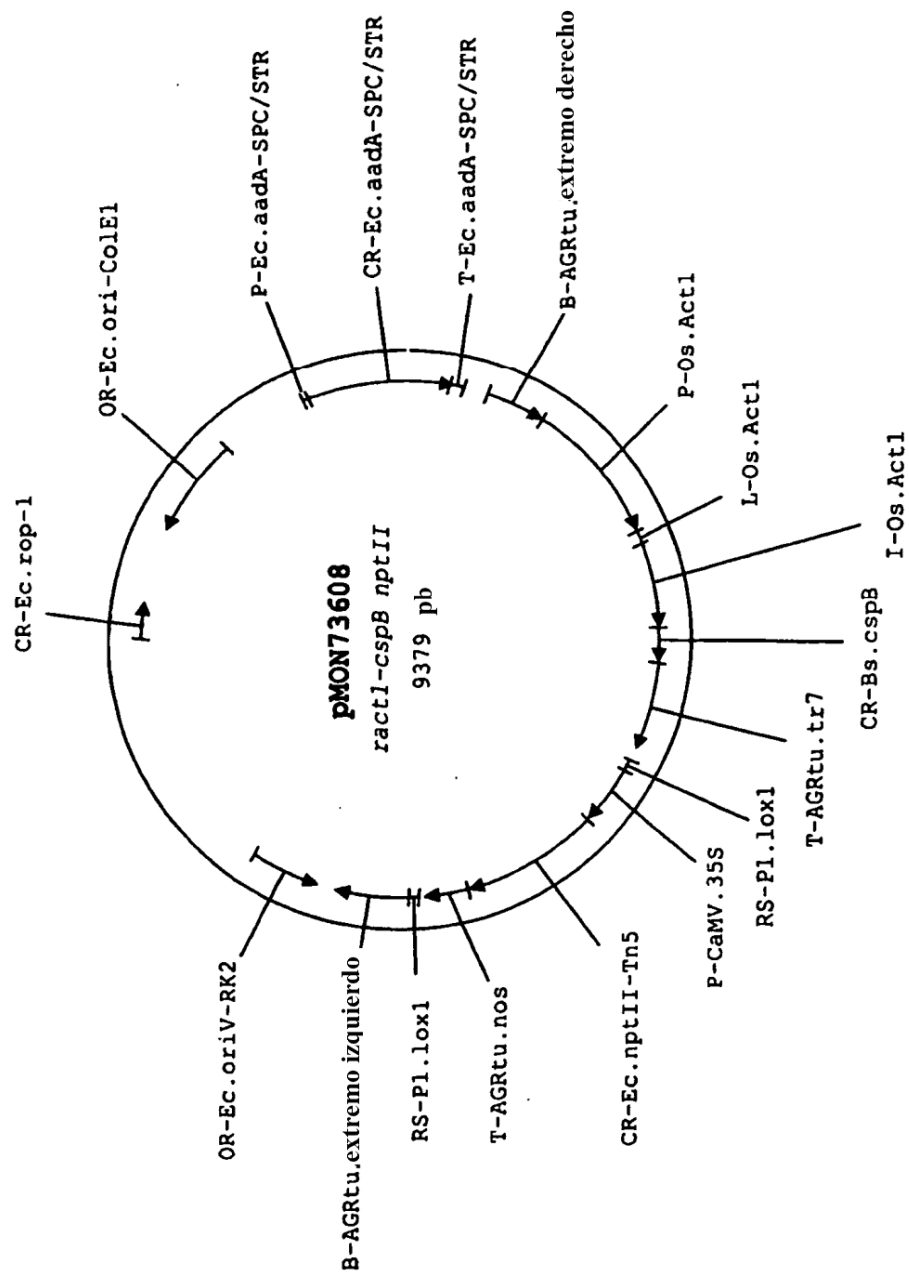


Figura 1

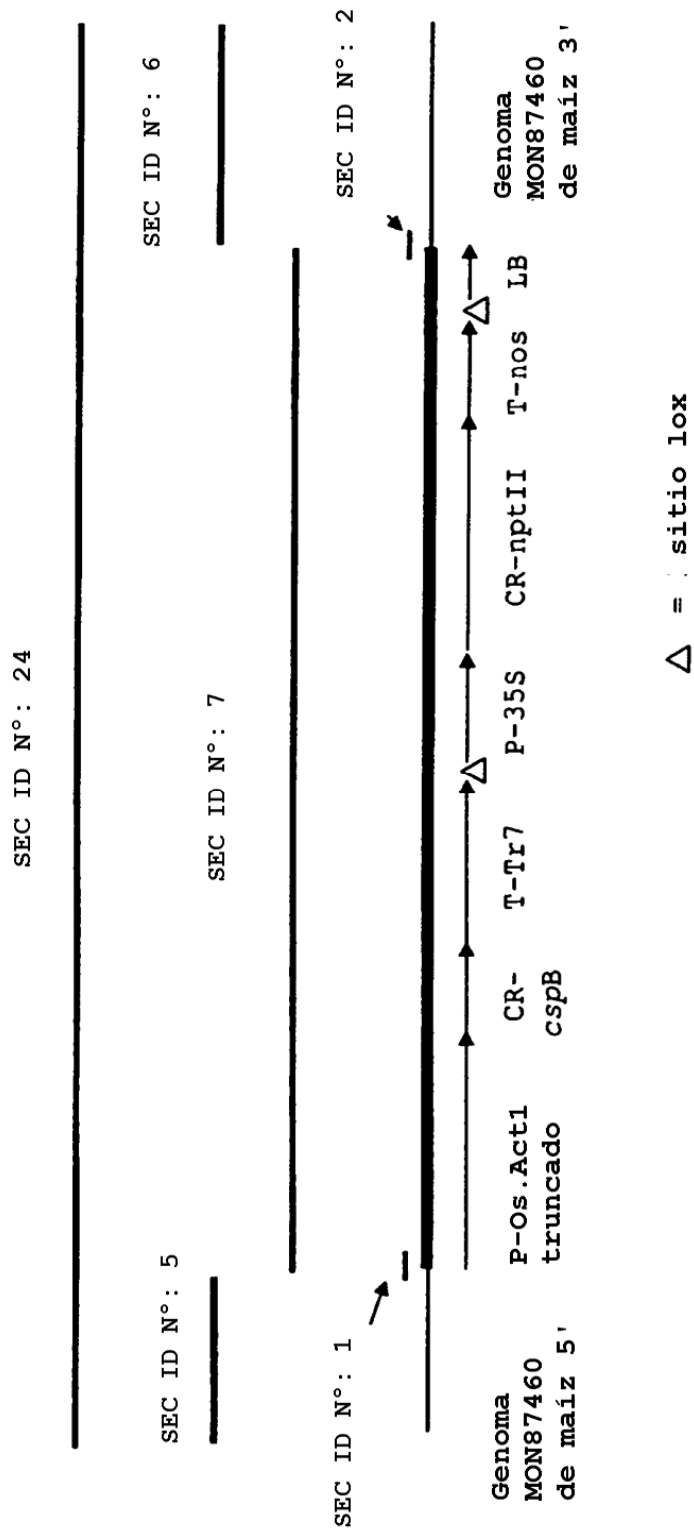


Figura 2

FIGURA 3

REGIÓN DE UNIÓN DE ADN GENÓMICO Y TRANSGÉN DE MN87460

gaggtcctgtatggaatcgtgttcgtttatttcccgggggcccggggcaaaaaagacgggcaatgg
 attgttggacttgacatgtgcggtgctggtgggtccaacccggcctggcttttgggccagcgcggg
 ccgacatagttagggcccaaaatttataaaagcacagctgcaggccacggaaccagtggttatga
 aaaacggaacaaagatagtaaattttacctccttaaattgccaccgtatccaatatccaaatt
 caggtaatctattcctataaagcaccaatttccgctcttttcatctatcgtctgtcatgcgctc
 tgttcctctccatcgtgtatcgcagataaaagggttacatgcatttccatgcagtgatgggata
 aaaacaagaaaaaagggttgacatgcatttccatgcagataaaagggttacatggatttcccttggg
 gaaagtataataagactaaaatgctgaggcggaggagagagagagaggagatgtgggtagtaaac
 ttttagtcatctttgacacaagatcaaagaagatttgtgaaattatgcattaaaatatcgaaga
 gctaactactacacgaataagctaaaatggtaggctgcaaagggtgattacagctagcagttgact
 ctattattaaacttctcttagggcaacagtagttggaaagggttttttgggtgctgccagatg
 caaactaaaatccatgcacctctctcaacctggaagggtgggcctaaaaaagatgatctaccat
 ccacggatccacctgtcagctcaagttattgggttaggaaacagggacctacgtggagatgtg
 tgctggacgggcccgtccacctgtcacgcgcaggcgggaacgggtgcgaaacgacgcacgct
 tttgctgtgcgctgtgctgtggtcgtcagcgcgagcgtgactgctgttttgcgttaga
 cgacgatcatcgttgaaatttggatttctctcacgttgaaggaaaatggattggaggaggat
 gtagataaaatttcaaagcgttagacggctgtcttt**GAGGAGGATCGCGAGCCAGCGACGAGGC**
CGGCCCTCCCTCCGCTTCCAAAGAAACGCCCCCATCGCCACTATATACATACCCCCCTCTC
CTCCCATCCCCCAACCCTACCACCACCACCACCACCCTCCACCTCCTCCCCCTCGCTGCC
GGACGACGAGCTCCTCCCCCTCCCCCTCCGCCGCCGCCGCCGGTAACCACCCCGCCCCCTCT
CCTCTTTCTTTCTCCGTTTTTTTTTTCCGCTCTCGGTCTCGATCTTTGGCCTTGGTAGTTTGGGT
GGGCGAGAGGCGGCTTCGTGCGCGCCAGATCGGTGCGCGGGAGGGGCGGGATCTCGCGGCTGG
GGCTCTCGCCGGCGTGGATCCGGCCCGGATCTCGCGGGGAATGGGGCTCTCGGATGTAGATCTG
CGATCCGCCGTTGTTGGGGGAGATGATGGGGGGTTTTAAATTTCCGCCATGCTAAACAAGATCA
GGAAGAGGGGAAAAGGGCACTATGGTTTATATTTTATATATTTCTGCTGCTTCGTGAGGCTTA
GATGTGCTAGATCTTTCTTTCTTTTGTGGGTAGAATTTGAATCCCTCAGCATTGTTTCATC
GGTAGTTTTCTTTTCATGATTTGTGACAAATGCAGCCTCGTGCGGAGCTTTTTGTAGGTAGA
CCATGGTAGAAGGTAAAGTAAATGGTTCAACTCTGAAAAAGGTTTCGGATTCATCGAAGTAGA
AGGTCAAGACGATGTATTCGTTTCAATTTCTCTGCTATTCAAGGCGAAGGCTTCAAACCTTAGAA
GAAGGCCAAGCTGTTTCTTTTGAATCGTTGAAGGAAACCGCGGACCACAAGCTGCTAACGTTA
CTAAAGAAGCGTGAATTTAAATGGGCCCCGGGGATCCACTAGTTCTAGCTATATCATCAATTTA
TGTATTACACATAATATCGCACTCAGTCTTTCATCTACGGCAATGTACCAGCTGATATAATCAG
TTATTGAAATATTTCTGAATTTAAACTTGCATCAATAAATTTATGTTTTTGCTTGGACTATAAT
ACCTGACTTGTTATTTTATCAATAAATATTTAACTATATTTCTTTCAAGATATCATTTCTTTAC
AAGTATACGTGTTTAAATTGAATACCATAAATTTTTATTTTTCAAATACATGTAAATTTATGAA
ATGGGAGTGGTGGCGACCGAGCTCAAGCACACTTCAATTCCCTATAACGGACCAATCGCAAAA
TTATAATAACATATTATTTTCATCCTGGATTAAAGAAAGTCACCGGGGATTATTTGTGACGCC
GATTACATACGGCGACAATAAAGACATTGGAATCGTAGTACATATTGGAATACACTGATTATA
TTAATGATGAATACATACTTTAATATCCTTACGTAGGATCGATCCGAATTCGCGACACGCGGCC
GCTCTAGAACTAGTGGATCCCCCCTTAATTAAGGGGGCTGCAGGAATTCATAACTTCGTATAA

TGTATGCTATACGAAGTTATAGCTTGGTCGAGTGGAAGCTAGCTTTCCGATCCTACCTGTCAC
 TCATCAAAAGGACAGTAGAAAAGGAAGGTGGCACCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAA
 GGCTATCATTCAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGC
 ATCGTGGA AAAAGAACGTTCCAACACGTCCTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATACTTCCA
 CTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCTCTATATAAGGAAG
 TTCATTTTCATTTGGAGAGGACACGCTGAAATCACCAGTCTCTCTCTACAAGATCGGGGATCTCT
 AGCTAGACGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGG
 GTGGAGAGGCTATTCCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGT
 TCCGGCTGTGACGCGAGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAA
 TGAATGCAAGGACGAGGCGAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCTTGCGCAGCT
 GTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGG
 ATCTCCTGTATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGGTGATGCAATGCCGGCG
 GCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGA
 GCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGCG
 TCGCGCCAGCCGAATGTTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCGACGGGAGGATCTCGTCGT
 GACGCTGGCGGATGCTGCTTGCCGAATCATGGGTGGAAATGGCCGCTTTTCTGGATTTCATC
 GACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTG
 CTGAAGAGCTTGGCGGGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGA
 TTCGACGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCTGGGGTTCTG
 ATCCCCAATTCCCGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCC
 GGTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGT
 AATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATA
 CGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACCTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATG
 TTAGTAGATCGGGGATCGGGCCACTCGACCAAGCTATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAA
 GTTATCGCGCCAAATCGTGAAGTTTCTCATCTAAGCCCCATTTGGACGTGAATGTAGACACGT
 CGAAATAAAGATTTCCGAATTAGAATAATTTGTTTATTGCTTTTCGCTTATAAATACGACGGATC
 GTAATTTGTGCTTTTATCAAATGTACTTTTCATTTTATAATAACGCTGCGGACATCTACATTTT
 TGAATTGAAAAAAATTTGGTAATTACTCTTTCTTTTTCTCCATATTGACCATCATACTCATTGC
 TGATCCATGTAGATTTTCacgttgaagaaaaatggatggaggagggaagtagataaagttttttg
 ttgtatattgtgatttttaatttgaaatcaagcttggtcaaaccgtggccgaaatttggcctggc
 cactaatggccatgaaccaagcgtagtttgccgattaccccggtcccgacggtacgactttctct
 aatcgctcggttactgtccctgcaacctgcatctcatgactccaggccggcccaacaccagcag
 cgaccgacgaccaggtcctcctcctcctccagccacgggcaagaggccgcgcgcgcatgctctcgc
 tctctgttcccggtaatccggcccagtagcttggtaccgcaccgtacctgtaattctctatctcta
 gttctctagtagacataattaagtcaatagtgttagactgtaacactaccatgacttcatcctcctt
 acctcgctctctgcgacgcacaaaccaccttccgccccatataggagccgatatcgtgcccc
 ccgtcctggccgcacgcttccctaaccctcgtggactaggcttccccctccacgacgaggccac
 gacaatggttgcccccgacgacgaggccgcggtgtgggcgaaggaggcgacgtgacctacagt
 ccaaggcctcacatccacatacatgctcatctaatgattaatctatagcctggtcgcgctgt
 gctgctactgcttgatcgacgagtgtgttgcgaccgctctgtcatcttcgtcagctagacgaa
 gcatccgagtacaactctaaacatacgaacattttaataacgagagcatataacgataaatagt
 gcttctacattaatgtatgttatcaatacttattgactcagtgacaaagcacggacatacatct
 agtagttaataataaaaaataaataattaccttattaaacgatcatttattatataaatagtattt
 attttttatgtacataataaagtattataaatctgacaatatataaagtgatagaacataaaa
 gtagaggaacaaacggaacgtaaaaggaaaacgaagctagtcaggtagatgctcccgaggacaaa

aaaaaaggggcatagttgtcaagtttaatcttcccaagttttatcttacgtagtagtagagcga
gagcgggtccaattaagggcacgcacagttgcagcaggtgcaggggtccagtagccgcggcgggt
acgctcgcagtcgcagggcgccgcgcctagttctgctgcccgggcccggtcatgaaccaac