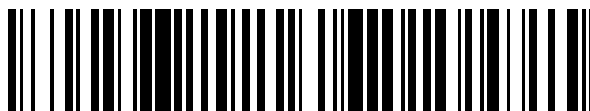


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 432 749**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2005 E 05799777 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2013 EP 1794308**

54 Título: **Evento DAS-59122-7 de maíz y métodos para su detección**

30 Prioridad:

29.09.2004 US 614225 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.12.2013

73 Titular/es:

PIONEER-HI-BRED INTERNATIONAL, INC.

(33.3%)

7100 N.W. 62nd Avenue P.O. Box 1014

Johnston, IA 50131-1014, US;

DOW AGROSCIENCES, LLC (33.3%) y

E.I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY

(33.3%)

72 Inventor/es:

BING, JAMES WAYNE;

CRESSMAN, ROBERT F., JR.;

GUPTA, MANJU;

HAKIMI, SALIM M.;

HONDRED, DAVID;

KRONE, TODD L.;

HARTNETT LOCKE, MARY E.;

LUCKRING, ABIGAIL K.;

MEYER, SANDRA E.;

MOELLENBECK, DANIEL;

NARVA, KENNETH EDWIN;

OLSON, PAUL D.;

SANDERS, CRAIG D.;

WANG, JIMEI;

ZHANG, JIAN y

ZHONG, GAN-YUAN

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 432 749 T3

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

DESCRIPCIÓN

Evento DAS-59122-7 de maíz y métodos para su detección

Campo de la invención

5 Las realizaciones de la presente invención se refieren al campo de la biología molecular de plantas, específicamente una realización de la invención se refiere a una construcción de DNA para conferir a una planta resistencia a los insectos. Las realizaciones de la invención se refieren más específicamente a una planta DAS-59122-7 de maíz resistente a los insectos y a ensayos para detectar la presencia del DNA de la planta DAS-59122-7 de maíz en una muestra y en sus composiciones.

Antecedentes de la invención

10 Una realización de esta invención se refiere al maíz resistente a los insectos, planta DAS-59122-7 (*Zea mays*), también denominada línea DAS-59122-7 de maíz o evento DAS-59122-7 de maíz, y a la construcción de expresión en la planta del DNA de la planta DAS-59122-7 de maíz y a la detección de la región de inserción del transgén/flanqueante en la planta DAS-59122-7 de maíz y su progenie.

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

25 Se sabe que la expresión de genes extraños en plantas está influenciada por su localización en el genoma de la planta, debido tal vez a la estructura de la cromatina (por ejemplo, heterocromatina) o la proximidad de los elementos reguladores de la transcripción (por ejemplo, potenciadores) cerca del sitio de integración (Weising et al., *Ann. Rev. Genet.* 22:421-477, 1988). Al mismo tiempo, la presencia del transgén en diferentes localizaciones en el genoma influirá de diferentes modos en el fenotipo global de la planta. Por esta razón, frecuentemente es necesario cribar un gran número de eventos con el fin de identificar un evento caracterizado por la 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 entre eventos en los niveles de expresión de un gen introducido. También puede haber diferencias en los patrones de expresión espaciales o temporales, por ejemplo, diferencias en la expresión relativa de un transgén en diversos tejidos de la planta, que pueden no corresponder a los patrones esperados de los elementos reguladores de la transcripción presentes en la construcción del gen introducido. Por esta razón, es usual producir cientos a miles de diferentes eventos y cribar dichos eventos para obtener un solo evento que tenga los niveles y patrones deseados de expresión de transgenes para fines comerciales. Un evento que tiene los niveles o patrones deseados de la expresión de transgenes es útil para introgresar el transgén en otros antecedentes genéticos por cruzamiento sexual externo utilizando métodos de cultivo convencionales. La progenie de estos cruces mantiene las características de expresión del transgén del transformante original. Esta estrategia se utiliza para asegurar la expresión génica fiable en un número de variedades que están bien adaptadas a las condiciones locales de cultivo.

35 Sería ventajoso poder detectar la presencia de un evento particular con el fin de determinar si la progenie de un cruce sexual contiene un transgén de interés. Además, un método para detectar un evento particular sería de gran ayuda para el cumplimiento de las regulaciones que requieren la aprobación previa a la comercialización y el etiquetado de alimentos derivados de plantas de cultivos recombinantes, por ejemplo, o para su uso en la vigilancia ambiental, la vigilancia de rasgos en cultivos en el campo o la vigilancia de productos procedentes de una cosecha del cultivo, así como para su uso en asegurar el cumplimiento de las partes sometidas a los términos reglamentarios o contractuales.

40 Es posible detectar la presencia de un transgén por cualquier método de detección de ácidos nucleicos conocido en la técnica, incluyendo, aunque sin limitación, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o hibridación de DNA usando sondas de ácidos nucleicos. Estos métodos de detección generalmente se centran en elementos genéticos utilizados con frecuencia, tales como promotores, terminadores, genes marcadores, etc., debido a que en muchas construcciones de DNA, la región codificadora es intercambiable. Como resultado, dichos métodos pueden no ser
55 útiles para discriminar entre diferentes eventos, en particular los producidos usando la misma construcción de DNA o construcciones muy similares a menos que se conozca la secuencia de DNA del DNA flanqueante adyacente al DNA heterólogo insertado. Por ejemplo, un ensayo de PCR específico para el evento se describe en la Patente de

EE.UU. Nº 6.395.485 para la detección del evento élit GAT-ZM1. En consecuencia, sería deseable disponer de un método sencillo y discriminatorio para la identificación del evento DAS-59122-7.

Sumario de la invención

5 Las realizaciones de esta invención se refieren a métodos para producir y seleccionar una planta de cultivo monocotiledónea resistente a los insectos. Más específicamente, se proporciona una construcción de DNA que cuando se expresa en células vegetales y en plantas confiere resistencia a los insectos. De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona una construcción de DNA, capaz de introducción y replicación en una célula hospedante, que cuando se expresa en células vegetales y en plantas confiere a las células vegetales y plantas resistencia a los insectos. La construcción de DNA está constituida por una molécula de DNA denominada PHI17662A e incluye tres (3) casetes de expresión del transgén. El primer casete de expresión comprende una molécula de DNA que incluye el promotor, el exón no traducido en 5' y el primer intrón del gen de la ubiquitina (Ubi-1) de maíz (Christensen et al., (1992) *Plant Mol. Biol.*, 18:675-689 y Christensen and Quail (1996) *Transgenic Res.* 5:213-218) conectada operativamente a una molécula de DNA que codifica una δ -endotoxina de *B.t.* identificada como Cry34Ab1 (Patentes de EE.UU. Nº 6.127.180, 6.624.145 y 6.340.593) conectada operativamente a una molécula de DNA que comprende un terminador de la transcripción Pin II aislado de patata (Gyheung An et al., (1989) *Plant Cell.* 1:115-122). El segundo casete de expresión del transgén de la construcción de DNA comprende una molécula de DNA que codifica el promotor de peroxidasa de trigo (Hertig et al., (1991) *Plant Mol. Biol.* 16:171-174) conectada operativamente a una molécula de DNA que codifica una δ -endotoxina de *β .t.* identificada como Cry35Ab1 (Patente de EE.UU. Nº 6.083.499, 6.548.291 y 6.340.593) conectada operativamente a una molécula de DNA que comprende un terminador de la transcripción Pin II aislado de patata (Gyheung An et al., (1989) *Plant Cell.* 1:115-122). El tercer casete de expresión del transgén de la construcción de DNA comprende una molécula de DNA del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Odell J.T. et al., (1985) *Nature* 313:810-812; Mitsuhashi et al., (1996) *Plant Cell Physiol.* 37:49-59) conectada operativamente a una molécula de DNA que codifica un gen de fosfinotricina-acetiltransferasa (PAT) (Wohlleben W. et al., (1988) *Gene* 70:25-37) conectada operativamente a una molécula de DNA que comprende un terminador de la transcripción en 3' del promotor 35S de CaMV (véase Mitsuhashi et al., (1996) *Plant Cell Physiol.* 37:49-59). También se proporcionan plantas que contienen la construcción del DNA.

30 De acuerdo con otra realización de la invención, se proporcionan composiciones y métodos para identificar una nueva planta de maíz denominada DAS-59122-7, basándose dichos métodos en cebadores o sondas que reconocen específicamente las secuencias flanqueantes en 5' y/o en 3' de DAS-59122-7. Se proporcionan moléculas de DNA que comprenden secuencias de cebadores que cuando se utilizan en una PCR producirán amplicones únicos para el evento transgénico DAS-59122-7. Estas moléculas se pueden seleccionar del grupo que consiste en:

- 5'-GTGGCTCCTTCAACGTTGCGTTCTGTC-3' (SEQ ID NO:1);
- 35 5'-CGTGCAAGCGCTCAATTCGCCCTATAGTG-3' (SEQ ID NO:2);
- 5'-AATTGAGCGCTTGCACGTTT-3' (SEQ ID NO:3);
- 5'-AACACAAGACCGCCACACCCTC-3' (SEQ ID NO:4);
- 5'-GAGGTGGTCTGGATGGTGTAGGTCA-3' (SEQ ID NO:5);
- 5'-TACAACCTCAAGTGGTTCTCTCCCGA-3' (SEQ ID NO:6);
- 40 5'-GAGGTCTGGATCTGCATGATGCGGA-3' (SEQ ID NO:7);
- 5'-AACCCCTTAGTATGTATTTGTATT-3' (SEQ ID NO:8);
- 5'-CTCCTTCAACGTTGCGTTCTGTCTAG-3' (SEQ ID NO:9);
- 5'-TTTTGCAAAGCGAACGATTCAGATG-3' (SEQ ID NO:10);
- 5'-GCGGGACAAGCCGTTTTACGTTT-3' (SEQ ID NO:11);
- 45 5'-GACGGGTGATTTATTTGATCTGCAC-3' (SEQ ID NO:12);
- 5'-CATCTGAATCGTTTCGCTTTGCAAAA-3' (SEQ ID NO:13);
- 5'-CTACGTTCCAATGGAGCTCGACTGTC-3' (SEQ ID NO:14);
- 5'-GGTCAAGTGGACTTGGTCACTCA-3' (SEQ ID NO:15);
- 5'-GAGTGAAGAGATAAGCAAGTCAAAG-3' (SEQ ID NO:16);

5'-CATGTATACGTAAGTTTGGTGCTGG-3' (SEQ ID NO:17);

5'-AATCCACAAGATTGGAGCAAACGAC-3' (SEQ ID NO:18)

5'-CGTATTACAATCGTACGCAATTCAG-3' (SEQ ID NO:36);

5'-GGATAAACAAACGGGACCATAGAAG-3' (SEQ ID NO:37) y sus complementos. La planta y semillas de maíz que comprenden estas moléculas son una realización de esta invención. Además, se proporcionan kits que utilizan estas secuencias de cebadores para la identificación del evento DAS-59122-7.

Una realización adicional de la invención se refiere a las secuencias flanqueantes específicas de DAS-59122-7 descritas en la presente memoria, que se pueden utilizar para desarrollar métodos específicos de identificación de DAS-59122-7 en muestras biológicas. Más particularmente, la invención se refiere a las regiones flanqueantes en 5' y/o 3' de DAS-59122-7, la SEQ ID NO:19 flanqueante en 5' y la SEQ ID NO:20 flanqueante en 3', respectivamente, que se pueden utilizar para el desarrollo de cebadores y sondas específicos. Una realización adicional de la invención se refiere a métodos de identificación de la presencia de DAS-59122-7 en muestras biológicas basados en el uso de tales cebadores o sondas específicos.

De acuerdo con otra realización de la invención, se proporcionan métodos de detección de la presencia de DNA correspondiente al evento DAS-59122-7 de maíz en una muestra. Dichos métodos comprenden: (a) poner en contacto la muestra que comprende el DNA con un conjunto de cebadores de DNA, que cuando se usan en una reacción de amplificación de ácidos nucleicos con DNA genómico extraído del evento DAS-59122-7 de maíz produce un amplicón indicativo de la presencia del evento DAS-59122-7 del maíz; (b) realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico, produciendo de este modo el amplicón; y (c) detectar el amplicón.

Son una realización de esta invención las moléculas de DNA que comprenden la nueva región de inserción del transgén/flanqueante, la SEQ ID NO:21 flanqueante en 5' más interna en 1000 y la SEQ ID NO:22 flanqueante en 3' más interna en 1000 y son homólogas o complementarias a la SEQ ID NO:21 y la SEQ ID NO:22.

Las secuencias de DNA que comprenden la nueva región de inserción del transgén/flanqueante, la SEQ ID NO:2, son una realización de esta invención. Están incluidas las secuencias de DNA que comprenden una longitud suficiente de polinucleótidos de la secuencia del transgén insertado y una longitud suficiente de polinucleótidos de la secuencia genómica y/o flanqueante del maíz procedente de la planta DAS-59122-7 de maíz de la SEQ ID NO:21 que son útiles como secuencias de cebadores para la producción de un producto amplicón indicativo de la presencia de la planta DAS-59122-7 de maíz.

Además, se proporcionan secuencias de DNA que comprenden la nueva región de inserción del transgén/flanqueante, la SEQ ID NO:22. Están incluidas las secuencias de DNA que comprenden una longitud suficiente de polinucleótidos de la secuencia del transgén insertado y una longitud suficiente de polinucleótidos de la secuencia genómica y/o flanqueante de maíz procedente de la planta DAS-59122-7 de maíz de la SEQ ID NO:22 que son útiles como secuencias de cebadores para la producción de un producto amplicón indicativo de la presencia de la planta DAS-59122-7 de maíz.

Las secuencias de DNA que comprenden al menos 11 o más nucleótidos de la porción del transgén de la secuencia de DNA de la SEQ ID NO:21 o sus complementos y una longitud similar de la secuencia de DNA de maíz flanqueante en 5' de la SEQ ID NO:21 o sus complementos, son útiles como cebadores de DNA en métodos de amplificación de DNA. Los amplicones producidos usando estos cebadores son indicativos de la presencia del evento DAS-59122-7 de maíz. Por lo tanto, las realizaciones de la invención también incluyen los amplicones producidos por cebadores de DNA homólogos o complementarios a la SEQ ID NO:21.

Las secuencias de DNA que comprenden al menos 11 o más nucleótidos de la porción del transgén de la secuencia de DNA de la SEQ ID NO:22 o sus complementos y una longitud similar de la secuencia de DNA de maíz flanqueante en 3' de la SEQ ID NO:22 o sus complementos son útiles como cebadores de DNA en métodos de amplificación de DNA. Los amplicones producidos usando estos cebadores son indicativos de la presencia del evento DAS-59122-7 de maíz, es decir, los amplicones producidos por cebadores de DNA homólogos o complementarios a la SEQ ID NO:22.

Más específicamente, son realizaciones de la invención un par de moléculas de DNA que comprenden un conjunto de cebadores de DNA, en donde las moléculas de DNA son identificadas como la SEQ ID NO:18 o sus complementos y la SEQ ID NO:1 o sus complementos; la SEQ ID NO:2 o sus complementos y la SEQ ID NO:17 o sus complementos; la SEQ ID NO:10 o sus complementos y la SEQ ID NO:9 o sus complementos; la SEQ ID NO:8 o sus complementos y la SEQ ID NO:17 o sus complementos; y la SEQ ID NO:36 o sus complementos y la SEQ ID NO:37 o sus complementos.

Otros amplicones comprenden las moléculas de DNA de la SEQ ID NO:18 y la SEQ ID NO:1; comprendiendo el amplicón las moléculas de DNA de la SEQ ID NO:2 y la SEQ ID NO:17; comprendiendo el amplicón las moléculas de DNA de la SEQ ID NO:10 y la SEQ ID NO:9; comprendiendo el amplicón las moléculas de DNA de la SEQ ID

NO:8 y la SEQ ID NO:17, y comprendiendo el amplicón las moléculas de DNA de la SEQ ID NO:36 y la SEQ ID NO:37.

5 Otras realizaciones de la invención incluyen pares de cebadores, que son útiles en la detección o caracterización del evento DAS-59122-7, seleccionados de: la SEQ ID NO:11 o sus complementos; la SEQ ID NO:5 o sus complementos; la SEQ ID NO:4 o sus complementos; la SEQ ID NO:7 o sus complementos; la SEQ ID NO:6 o sus complementos; la SEQ ID NO:3 o sus complementos; la SEQ ID NO:18 o sus complementos; la SEQ ID NO:14 o sus complementos; la SEQ ID NO:13 o sus complementos; la SEQ ID NO:15 o sus complementos; la SEQ ID NO:17 o sus complementos; la SEQ ID NO:16 o sus complementos; y la SEQ ID NO:12 o sus complementos. Los amplicones se pueden producir por el apareamiento de cualquiera de los cebadores mencionados anteriormente.

10 Además, se proporcionan un kit y métodos para identificar el evento DAS-59122-7 en una muestra biológica que detecta una región específica de DAS-59122-7 dentro de la SEQ ID NO:23.

15 Se proporcionan moléculas de DNA que comprenden al menos una secuencia de unión de DAS-59122-7 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO:32, 33, 34 y 35 y sus complementos; en donde una secuencia de unión abarca la unión entre el DNA heterólogo insertado en el genoma y el DNA procedente de la célula de maíz que flanquea el sitio de inserción, es decir, el DNA flanqueante, y es indicativo de la presencia del evento DAS-59122-7.

20 Los métodos para producir un maíz resistente a los insectos pueden comprender las etapas de: (a) cruzar sexualmente una primera línea de maíz parental que comprenda las casetes de expresión de la invención, que confieren resistencia a los insectos, y una segunda línea de maíz parental que carezca de resistencia a los insectos, produciendo de ese modo una pluralidad de plantas de la progenie; y (b) seleccionar una planta de la progenie que sea resistente a los insectos. Dichos métodos pueden comprender opcionalmente la etapa adicional de retrocruzamiento de la planta de la progenie con la segunda línea de maíz parental para producir una planta de maíz de reproducción pura que sea resistente a los insectos.

25 La producción de una planta de maíz que sea resistente a los insectos puede comprender la transformación de una célula de maíz con la construcción de DNA PHI17662A (SEQ ID NO:24), el crecimiento de la célula de maíz transformada hasta una planta de maíz, la selección de la planta de maíz que muestra la resistencia a los insectos y el crecimiento vegetativo de la planta de maíz hasta una planta de maíz fértil. La planta de maíz fértil puede autopolinizarse o ser cruzada con variedades de maíz compatibles para producir una progenie resistente a los insectos.

30 Otra realización de la invención se refiere además a un kit de detección de DNA para identificar el evento DAS-59122-7 de maíz en muestras biológicas. El kit comprende un primer cebador que reconoce específicamente la región flanqueante en 5' o en 3' de DAS-59122-7 y un segundo cebador que reconoce específicamente una secuencia dentro del DNA extraño de DAS-59122-7, o dentro del DNA flanqueante, para su uso en un protocolo de identificación por PCR. Un kit puede comprender una sonda específica que tenga una secuencia que corresponda, o sea complementaria, a una secuencia que tenga una identidad de secuencia entre 80% y 100% con una región específica del evento DAS-59122-7. La secuencia de la sonda corresponde a una región específica que comprende parte de la región flanqueante en 5' o en 3' del evento DAS-59122-7.

40 Los métodos y kits abarcados por las realizaciones de la presente invención se puede utilizar para diferentes fines, tales como, aunque sin limitación, los siguientes: para identificar el evento DAS-59122-7 en plantas, en material vegetal o en productos tales como, aunque sin limitación, productos alimenticios o piensos (frescos o procesados) que comprenden o proceden, de material vegetal; adicional o alternativamente, los métodos y kits se pueden utilizar para identificar material vegetal transgénico para los fines de segregación entre material transgénico y no transgénico; adicional o alternativamente, los métodos y kits se pueden utilizar para determinar la calidad del material vegetal que comprende el evento DAS-59122-7 de maíz. Los kits también pueden contener los reactivos y materiales necesarios para la ejecución del método de detección.

Una realización adicional de esta invención se refiere a la planta DAS-59122-7 de maíz o sus partes, incluyendo, aunque sin limitación, polen, óvulos, células vegetativas, los núcleos de las células del polen y los núcleos de las células de los óvulos de la planta DAS-59122-7 de maíz y su progenie derivada.

50 Por consiguiente, la invención proporciona una molécula de DNA aislada que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de:

- (a) la secuencia de nucleótidos descrita en la SEQ ID NO:23;
- (b) la secuencia de nucleótidos descrita en la SEQ ID NO:21; y
- (c) la secuencia de nucleótidos descrita en la SEQ ID NO:22.

La invención también proporciona un kit para identificar el evento DAS-59122-7 en una muestra biológica que

detecta una región específica de DAS-59122-7, comprendiendo dicho kit al menos un primer cebador, que reconoce una secuencia dentro de la SEQ ID NO:19 o dentro de la SEQ ID NO:20, y que comprende además al menos un segundo cebador que reconoce una secuencia de nucleótidos dentro de la secuencia SEQ ID NO:24.

5 Dichos cebadores al menos primero y segundo, respectivamente, pueden comprender un par de secuencias seleccionadas de:

(a) las secuencias SEQ ID NO:18 y SEQ ID NO:1;

(b) las secuencias SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:9;

(c) las secuencias SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:17;

(d) las secuencias SEQ ID NO:8 y SEQ ID NO:17; y

10 (e) las secuencias SEQ ID NO:36 y SEQ ID NO:37.

La invención también proporciona un kit de detección de DNA específico para el DNA de unión del evento DAS-59122-7 de maíz y su progenie que comprende al menos una molécula de DNA de una longitud suficiente de polinucleótidos de DNA contiguos para funcionar en un método de detección de DNA, en donde dicha molécula de DNA se hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con una secuencia de DNA de unión del evento DAS-59122-7 de maíz, abarcando dicha secuencia de unión la unión entre el DNA heterólogo insertado en el genoma y el DNA flanqueante, y no se hibrida en dichas condiciones de hibridación rigurosas con un DNA de planta de maíz que no sea DAS-59122-7 y dicha molécula de DNA es homóloga o complementaria de una secuencia seleccionada de:

15

(a) la secuencia de nucleótidos descrita en la SEQ ID NO:21; y

(b) la secuencia de nucleótidos descrita en la SEQ ID NO:22.

20 La invención también proporciona un método para identificar el evento DAS-59122-7 en una muestra biológica, que comprende detectar una región específica de DAS-59122-7 amplificando un fragmento de DNA de un ácido nucleico presente en dicha muestra biológica, usando una reacción en cadena de la polimerasa con al menos dos cebadores, en donde dicho primer cebador reconoce una secuencia dentro de la SEQ ID NO:19 o la SEQ ID NO:20, y un segundo cebador reconoce una secuencia dentro de la SEQ ID NO:24.

25 Dichos cebadores primero y segundo pueden comprender la secuencia de:

SEQ ID NO:18 y SEQ ID NO:1, respectivamente;

SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:9, respectivamente;

SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:17, respectivamente;

SEQ ID NO:8 y SEQ ID NO:17, respectivamente; o

30 SEQ ID NO:36 y SEQ ID NO:37, respectivamente.

La invención también proporciona un método para detectar la presencia del evento DAS-59122-7 de maíz o su progenie en una muestra biológica, que comprende:

(a) extraer una muestra de DNA de dicha muestra biológica;

(b) proporcionar un par de moléculas de cebador de DNA seleccionado de:

35 (i) las secuencias SEQ ID NO:18 y SEQ ID NO:1;

(ii) las secuencias SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:9;

(iii) las secuencias SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:17; y

(iv) las secuencias SEQ ID NO:8 y SEQ ID NO:17;

(c) proporcionar condiciones de la reacción de amplificación de DNA;

40 (d) llevar a cabo dicha reacción de amplificación de DNA, produciendo de ese modo una molécula de amplicón de DNA; y

(e) detectar dicha molécula de amplicón de DNA, en donde la detección de dicha molécula de amplicón de DNA en dicha reacción de amplificación de DNA indica la presencia del evento DAS-59122-7 de maíz.

La invención también proporciona una molécula de DNA aislada que comprende uno cualquiera de los amplicones producidos por el método anterior.

La invención también proporciona un método para detectar la presencia de DNA correspondiente al evento DAS-59122-7 en una muestra, comprendiendo el método:

- 5 (a) poner en contacto la muestra que comprende DNA de maíz con una sonda de polinucleótidos que se hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con DNA de unión del evento DAS-59122-7 de maíz, abarcando dicho DNA de unión, la unión entre el DNA heterólogo insertado en el genoma y el DNA flanqueante, y no se hibrida bajo dichas condiciones de hibridación rigurosas con un DNA de la planta de maíz que no sea DAS-59122-7, y dicha sonda es de una longitud suficiente de nucleótidos contiguos homólogos o complementarios a una secuencia seleccionada de:
- 10 (i) la secuencia de nucleótidos descrita en la SEQ ID NO:21; y
- (ii) la secuencia de nucleótidos descrita en la SEQ ID NO:22;
- (b) someter la muestra y la sonda a condiciones de hibridación rigurosas; y
- (c) detectar la hibridación de la sonda con el DNA de unión, en donde la detección de la hibridación indica la presencia del evento DAS-59122-7.
- 15

La invención también proporciona un par de moléculas de DNA que comprende: una primera molécula de DNA y una segunda molécula de DNA, en donde las moléculas de DNA son de una longitud suficiente de nucleótidos contiguos a una secuencia seleccionada de:

- (a) la secuencia descrita en la SEQ ID NO:21 o su complemento; y
- 20 (b) la secuencia descrita en la SEQ ID NO:22 o su complemento;

en donde el par de moléculas de DNA es capaz de amplificar, en una reacción en cadena de la polimerasa, un amplicón que comprende una región específica de DAS-59122-7 del evento DAS-59122-7 de maíz y su progenie, en donde dicha región específica de DAS-59122-7 comprende al menos una secuencia de unión dentro de la SEQ ID NO:23, y dicha secuencia de unión abarca la unión entre el DNA heterólogo insertado en el genoma y el DNA flanqueante.

25

Cada molécula de DNA puede ser un cebador que comprende una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO:2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 36 y 37 o sus complementos.

Cada cebador puede comprender una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO:2, 8, 9, 10, 17 y 18 o sus complementos.

- 30 La invención también proporciona una molécula de DNA aislada que comprende una secuencia de unión que comprende una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO:32, 33, 34 y 35 y sus complementos.

La invención también proporciona un método para confirmar la pureza de semillas, que comprende la detección de una región específica de DAS-59122-7 con un cebador o sonda específico que se hibrida específicamente en condiciones de hibridación rigurosas con una secuencia de unión dentro de la SEQ ID NO:21 o la SEQ ID NO:22, abarcando dicha secuencia de unión la unión entre el DNA heterólogo insertado en el genoma y el DNA flanqueante o su complemento, en una muestra de semillas, y no se hibrida bajo dichas condiciones de hibridación rigurosas con el DNA de una planta de maíz que no sea DAS-59122-7.

35

La invención también proporciona un método para cribar semillas para detectar la presencia del evento DAS-59122-7, que comprende la detección de una región específica de DAS-59122-7 con un cebador o sonda específico que se hibrida específicamente en condiciones de hibridación rigurosas con una secuencia de unión dentro de la SEQ ID NO:21 o la SEQ ID NO:22, abarcando dicha secuencia de unión la unión entre el DNA heterólogo insertado en el genoma y el DNA flanqueante o su complemento, en una muestra de un lote de semillas, y no se hibrida bajo dichas condiciones de hibridación rigurosas con el DNA de una planta de maíz que no sea DAS-59122-7.

40

La invención también proporciona una planta de maíz resistente a los insectos, en la que el DNA que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:23 forma parte del genoma de la planta.

45

La invención también proporciona una planta descendiente de la planta anterior, en la que el DNA que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:23, forma parte del genoma de la planta.

La invención proporciona también semillas de dichas plantas o plantas descendientes, en las que dichas semillas comprenden la SEQ ID NO:23.

La invención también proporciona un método para detectar la presencia de la inserción del evento DAS-59122-7 en tejido de maíz, que comprende:

5 (a) seleccionar un par de cebadores que comprenden cada uno al menos diez nucleótidos de la SEQ ID NO:21 o la SEQ ID NO:22, en donde cada miembro del par está en lados opuestos de una secuencia indicativa de dicha inserción del evento DAS-59122-7, comprendiendo dicha secuencia al menos una secuencia de unión de DAS-59122-7;

(b) poner en contacto una muestra de dicho tejido de maíz con dicho par de cebadores; y

(c) realizar la amplificación de DNA y analizar los amplicones.

10 En dicho método, cada cebador de dicho par puede seleccionarse de las SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 30, 36 y 37 o sus complementos.

La invención también proporciona un método para detectar la presencia de la inserción del evento DAS-59122-7 en tejido de maíz que comprende:

15 (a) poner en contacto una muestra de dicho tejido de maíz con una sonda de polinucleótidos que se hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con una o más secuencias de DNA seleccionada(s) de las SEQ ID NO:32, 33, 34 y 35 y sus complementos, en donde la sonda se hibrida específicamente con una región dentro de la región flanqueante en 5' o en 3' del evento DAS-59122-7 y comprende también una parte del DNA extraño contiguo a dicha región;

(b) someter dicha muestra y dicha sonda a condiciones de hibridación rigurosas; y

(c) analizar la hibridación de la sonda.

20 La invención también proporciona un kit de detección de DNA que comprende una sonda de polinucleótidos que se hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con una o más secuencias de DNA seleccionadas de las SEQ ID NO:32, 33, 34 y 35 y sus complementos, y en donde la sonda se hibrida específicamente con una región dentro de la región flanqueante en 5' o en 3' del evento DAS-59122-7 y comprende también una parte del DNA extraño contiguo a dicha región.

25 La invención también proporciona un kit de detección de DNA que comprende un par de cebadores, comprendiendo cada cebador al menos 10 nucleótidos dentro de la SEQ ID NO:21 y la SEQ ID NO:22, en donde cada cebador está en los lados opuestos de una secuencia indicativa de la presencia de la inserción del evento DAS-59122-7, comprendiendo dicha secuencia al menos una secuencia de unión de DAS-59122-7, abarcando dicha secuencia de unión la unión entre el DNA heterólogo insertado en el genoma y el DNA flanqueante.

30 En dicho kit de detección de DNA, cada cebador en dicho par se puede seleccionar de las SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 36 y 37 y sus complementos.

Breve descripción de los dibujos

35 La Figura 1. Secuencia de DNA (SEQ ID NO:23) que muestra el inserto transgénico PHI17662A, así como las secuencias que flanquean el inserto transgénico. Están subrayadas las regiones de borde en 5' y en 3', p desde pb 1 hasta pb 2593 y desde pb 9937 pb hasta pb 11922, respectivamente. Se indican en negrita y subrayadas dos diferencias de nucleótidos (pb 6526 y pb 6562) basadas en la comparación con el plásmido transformante PHP17662.

40 Figura 2. El diagrama esquemático de la región de inserción del evento DAS-59122-7 con Cry34/35Ab1 de *B.t.* está dividido en tres secciones separadas; la región de borde en 5' con el DNA genómico de maíz, el inserto T-DNA intacto y la región de borde en 3' con el DNA genómico de maíz. Las dos flechas debajo del diagrama del inserto indican los puntos de inicio y final de la secuencia derivada de los fragmentos del desplazamiento sobre el genoma en 5' y 3'. Otros recuadros debajo del diagrama del inserto representan fragmentos de PCR que fueron amplificados a partir de DNA genómico del evento DAS-59122-7 y secuenciados para cubrir el inserto de T-DNA intacto y las regiones de unión del inserto/borde en 5' y 3'.

45 Figura 3. El diagrama esquemático de la región de inserción del evento DAS-59122-7 en Cry34/35Ab1 de *B.t.* está dividido en tres secciones separadas; la región de borde en 5' con el DNA genómico de maíz, el inserto T-DNA intacto y la región de borde en 3' con el DNA genómico de maíz. Los recuadros debajo del diagrama del inserto representan fragmentos de PCR localizados en las regiones de borde genómicas o a través de las regiones de unión en 5' y 3' del inserto T-DNA con el DNA genómico de maíz que fueron amplificadas a partir de DNA genómico del evento DAS-59122-7

50

Descripción detallada

Los siguientes definiciones y métodos se proporcionan para definir mejor la presente invención y para guiar a los expertos en la técnica en la práctica de la presente invención. A menos que se indique lo contrario, los términos se deben entender según su uso convencional por los expertos en la técnica relacionada. Las definiciones de términos comunes en Biología Molecular también se pueden encontrar en Rieger et al., *Glossary of Genetics: Classical and Molecular*, 5th edition, Springer-Verlag, New York, 1991; y Lewin, *Genes V*, Oxford University Press: New York, 1994. Se utiliza la nomenclatura de las bases de DNA, establecida en 37 CFR § 1.822.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "que comprende" significa "incluyendo, aunque sin limitación".

Como se usa en la presente memoria, el término "maíz" significa *Zea mays*, e incluye todas las variedades de plantas que pueden ser cultivadas con maíz, incluidas las especies silvestres del maíz.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "específico de DAS-59122-7" se refiere a una secuencia de nucleótidos que es adecuada para identificar discriminadamente el evento DAS-59122-7 en plantas, material vegetal o en productos tales como, aunque sin limitación, productos alimenticios o piensos (frescos o procesados) que comprenden, o proceden de material de la planta.

Como se usa en la presente memoria, los términos "resistente a los insectos" y "que afectan a plagas de insectos" se refiere a la introducción de cambios en la alimentación, el crecimiento, y/o el comportamiento de los insectos en cualquier etapa de desarrollo, incluyendo, aunque sin limitación: matar el insecto; retardar el crecimiento; impedir la capacidad reproductora; inhibir la alimentación; y similares.

Como se usa en la presente memoria, los términos "actividad plaguicida" y "actividad insecticida" se utilizan como sinónimos para referirse a la actividad de un organismo o de una sustancia (tal como, por ejemplo, una proteína) que puede medirse por numerosos parámetro incluyendo, aunque sin limitación, mortalidad de las plagas, pérdida de peso de plagas, atracción de plagas, repelencia de plagas y otros cambios físicos y de comportamiento de una plaga después de la alimentación y/o exposición al organismo o sustancia durante un período de tiempo apropiado. Por ejemplo, "proteínas plaguicidas" son proteínas que muestran actividad plaguicida por sí mismas o en combinación con otras proteínas.

"Secuencia codificadora" se refiere a una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos específica. Como se usa en la presente memoria, los términos "que codifica", "codificado" cuando se utilizan en el contexto de un ácido nucleico especificado significan que el ácido nucleico comprende la información necesaria para guiar la traducción de la secuencia de nucleótidos a una proteína especificada. La información por la que se codifica una proteína se especifica por el uso de codones. Un ácido nucleico que codifica una proteína puede comprender secuencias no traducidas (por ejemplo, intrones) dentro de las regiones traducidas del ácido nucleico o puede carecer de tales secuencias intermedias no traducidas (por ejemplo, como en el cDNA).

"Gen" se refiere a un fragmento de ácido nucleico que expresa una proteína específica, incluyendo secuencias reguladoras que preceden (secuencias no codificadoras en 5') y siguen (secuencias no codificadoras en 3') a la secuencia codificadora. "Gen natural" se refiere a un gen tal como se encuentra en la naturaleza con sus propias secuencias reguladoras. "Gen quimérico" se refiere cualquier gen que no es un gen natural, que comprende secuencias reguladoras y codificadoras que no se encuentran juntas en la naturaleza. En consecuencia, un gen quimérico puede comprender secuencias reguladoras y secuencias codificadoras que proceden de diferentes fuentes o secuencias reguladoras y secuencias codificadoras que proceden de la misma fuente, pero dispuestas de una manera diferente a la encontrada en la naturaleza. "Gen endógeno" se refiere a un gen natural en su localización natural en el genoma de un organismo. "Extraño" se refiere a material que no se encuentra normalmente en la localización de interés. Por lo tanto, "DNA extraño" puede comprender tanto el DNA recombinante, así como el DNA reordenado recién introducido de la planta. Un gen "extraño" se refiere a un gen que no se encuentra normalmente en el organismo hospedante, pero que se introduce en el organismo hospedante por transferencia de genes. Los genes extraños pueden comprender genes naturales insertados en un organismo no natural o genes quiméricos. Un "transgén" es un gen que ha sido introducido en el genoma por un procedimiento de transformación. El sitio en el genoma de la planta donde se ha insertado un DNA recombinante se puede denominar el "sitio de inserción" o el "sitio diana".

Como se usa en la presente memoria, "DNA insertado" se refiere a DNA heterólogo dentro de las casetes de expresión usadas para transformar el material vegetal, mientras que "DNA flanqueante" puede existir como DNA genómico presente de forma natural en un organismo, tal como una planta o DNA extraño (heterólogo) introducido por el proceso de transformación que es ajeno a la molécula de DNA insertada original, por ejemplo fragmentos asociados a la operación de transformación. Una "región flanqueante" o "secuencia flanqueante", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una secuencia de al menos veinte (20) pares de bases, preferiblemente al menos cincuenta (50) pares de bases, y hasta cinco mil (5000) pares de bases que está localizada ya sea inmediatamente aguas arriba (hacia el extremo 5') y contigua a, o inmediatamente aguas abajo (hacia el extremo 3') y contigua a la molécula de DNA insertada extraña original. Los procedimientos de transformación que conducen a la integración

- aleatoria del DNA extraño darán como resultado transformantes que contienen diferentes regiones flanqueantes características y únicas para cada transformante. Cuando se introduce DNA recombinante en una planta por cruce tradicional, generalmente no serán cambiadas sus regiones flanqueantes. Los transformantes también contendrán uniones únicas entre un DNA insertado heterólogo y DNA genómico, o dos (2) piezas de DNA genómico, o dos (2) piezas de DNA heterólogo. Una "unión" es un punto en el que están unidos dos (2) fragmentos de DNA específicos. Por ejemplo, existe una unión cuando el DNA insertado está unido al DNA flanqueante. También existe un punto de unión en un organismo transformado cuando dos (2) fragmentos de DNA están unidos de manera que está modificada respecto de la que se encuentra en el organismo natural. "DNA de unión" se refiere a DNA que comprende un punto de unión.
- Como se usa en la presente memoria, "heterólogo", con referencia a un ácido nucleico es un ácido nucleico que se origina a partir de una especie extraña o, si es de la misma especie, está modificado sustancialmente desde su forma natural en composición y/o *locus* genómico por intervención humana deliberada. Por ejemplo, un promotor unido operativamente a una secuencia de nucleótidos heteróloga puede ser de una especie diferente de la que procede la secuencia de nucleótidos o, si es de la misma especie, el promotor no se encuentra de forma natural unido operativamente a la secuencia de nucleótidos. Una proteína heteróloga puede proceder de una especie extraña o, si es de la misma especie, está modificada sustancialmente en su forma original por intervención humana deliberada.
- "Secuencias reguladoras" se refieren a secuencias de nucleótidos localizadas aguas arriba (secuencias no codificadoras en 5'), dentro o aguas abajo (secuencias no codificadoras en 3') de una secuencia codificadora, y que influyen en la transcripción, el procesamiento o la estabilidad del RNA, o la traducción de la secuencia codificadora asociada. Las secuencias reguladoras pueden incluir promotores, secuencias delanteras de la traducción, intrones, y secuencias de reconocimiento de poliadenilación.
- "Promotor" se refiere a una secuencia de nucleótidos capaz de controlar la expresión de una secuencia codificadora o RNA funcional. En general, una secuencia codificadora está localizada en 3' respecto a una secuencia promotora. La secuencia promotora consiste en elementos aguas arriba próximos y más distantes, denominándose frecuentemente potenciadores. En consecuencia, un "potenciador" es una secuencia de nucleótidos que puede estimular la actividad del promotor y puede ser un elemento innato del promotor o un elemento heterólogo insertado para potenciar el nivel o especificidad de tejidos de un promotor.
- Los promotores pueden proceder en su totalidad de un gen natural o estar compuestos por diferentes elementos procedentes de diferentes promotores encontrados en la naturaleza o incluso comprender segmentos de nucleótidos sintéticos. Los expertos en la técnica entenderán que diferentes promotores pueden dirigir la expresión de un gen en diferentes tejidos o tipos de células o en diferentes etapas del desarrollo o en respuesta a diferentes condiciones ambientales. Los promotores que hacen que un fragmento de ácido nucleico sea expresado en la mayoría de tipos de células en la mayoría de las veces son denominados generalmente "promotores constitutivos". Se están descubriendo constantemente nuevos promotores de diversos tipos útiles en células vegetales; numerosos ejemplos pueden encontrarse en la compilación de Okamoto and Goldberg (1989) *Biochemistry of Plants* 15:1-82. Se reconoce además que puesto que en la mayoría de los casos no han sido completamente definidos los límites exactos de las secuencias reguladoras, fragmentos de ácido nucleico de diferentes longitudes pueden tener idéntica actividad de promotor.
- La "secuencia delantera de la traducción" se refiere a una secuencia de nucleótidos localizada entre la secuencia del promotor de un gen y la secuencia codificadora. La secuencia delantera de la traducción está presente en el mRNA completamente procesado aguas arriba de la secuencia de comienzo de la traducción. La secuencia delantera de la traducción puede afectar a numerosos parámetros incluyendo, el procesamiento del transcrito primario a mRNA, la estabilidad y/o la eficacia de la traducción del mRNA. Se han descrito ejemplos de secuencias delanteras de la traducción (Turner and Foster (1995) *Mol. Biotechnol.* 3:225-236).
- Las "secuencias no codificadoras en 3'" se refieren a secuencias de nucleótidos localizadas aguas abajo de una secuencia codificadora e incluyen secuencias de reconocimiento de poliadenilación y otras secuencias que codifican señales reguladoras capaces de afectar al procesamiento del mRNA o la expresión génica. La señal de poliadenilación se caracteriza normalmente por afectar a la adición de tramos de ácido poliadenílico al extremo 3' del precursor del mRNA. El uso de diferentes secuencias no codificadoras en 3' está ilustrado con ejemplos por Ingelbrecht et al., (1989) *Plant Cell* 1:671-680.
- Una "proteína" o "polipéptido" es una cadena de aminoácidos dispuestos en un orden específico determinado por la secuencia codificadora en un polinucleótido que codifica el polipéptido.
- Una construcción de DNA es un ensamblaje de moléculas de DNA unidas entre sí que proporcionan una o más casetes de expresión. La construcción de DNA puede ser un plásmido que está habilitado para auto-replicación en una célula bacteriana y contiene varios sitios de restricción por enzimas endonucleasas que son útiles para la introducción de moléculas de DNA que proporcionan elementos funcionales genéticos, es decir, promotores, intrones, secuencias delanteras, secuencias codificadoras, regiones de terminación en 3', entre otros, o una

construcción de DNA puede ser un ensamblaje lineal de moléculas de DNA, tales como una casete de expresión. La casete de expresión contenida dentro de una construcción de DNA comprende los elementos genéticos necesarios para proporcionar la transcripción de un RNA mensajero. La casete de expresión puede ser diseñada para expresarse en células procariotas o células eucariotas. Las casetes de expresión de las realizaciones de la presente invención están diseñadas para expresarse en células vegetales.

Las moléculas de DNA de las realizaciones de la invención se proporcionan en casetes de expresión para la expresión en un organismo de interés. La casete incluirá secuencias reguladoras en 5' y 3' unidas operativamente a una secuencia codificadora. "Unida operativamente" significa que las secuencias de ácidos nucleicos que están unidas enlazadas son contiguas y, cuando es necesario se une dos regiones codificadoras de proteínas, contiguas y en el mismo marco de lectura. Se entiende que unidas operativamente indica una unión funcional entre un promotor y una segunda secuencia, en donde la secuencia del promotor inicia y media la transcripción de la secuencia de DNA correspondiente a la segunda secuencia. La casete puede contener adicionalmente al menos un gen adicional para ser co-transformado en el organismo. Alternativamente, el(los) gen(es) adicional(es) puede(n) proporcionarse en múltiples casetes de expresión o múltiples construcciones de DNA.

La casete de expresión incluirá en la dirección 5' a 3' de la transcripción: una región de iniciación de la transcripción y de la traducción, una región codificadora y una región de terminación de la transcripción y de la traducción funcional en el organismo que sirve como hospedante. La región de iniciación de la transcripción (es decir, el promotor) puede ser natural o análoga o extraña o heteróloga para el organismo hospedante. Además, el promotor puede ser una secuencia natural o alternativamente una secuencia sintética. Las casetes de expresión pueden contener adicionalmente secuencias delanteras en 5' en la construcción de la casete de expresión. Tales secuencias delanteras pueden actuar para potenciar la traducción.

Ha de entenderse que como se utiliza en la presente memoria, el término "transgénico" incluye cualquier célula, línea celular, callo, tejido, parte de planta o planta, cuyo genotipo ha sido alterado por la presencia de un ácido nucleico heterólogo incluyendo los transgénicos inicialmente así alterados, como los creados por cruces sexuales o propagación asexual del transgénico inicial. El término "transgénico", como se usa en la presente memoria no abarca la alteración del genoma (cromosómico o extracromosómico) mediante métodos convencionales de cultivo de plantas o por eventos que ocurren de modo natural, tales como fertilización cruzada aleatoria, infección viral no recombinante, transformación bacteriana no recombinante, transposición no recombinante o mutación espontánea.

Un "evento" transgénico es producido por transformación de células vegetales con una(s) construcción(es) de DNA heteróloga(s), que incluye(n) un casete de expresión de ácido nucleico que comprende un transgén de interés, la regeneración de una población de plantas resultantes de la inserción del transgén en el genoma de la planta, y la selección de una planta particular caracterizada por inserción en una localización particular del genoma. Un evento se caracteriza fenotípicamente por la expresión del transgén. A nivel genético, un evento es parte de la constitución genética de una planta. El término "evento" se refiere también a la progenie producida por un cruzamiento sexual externo entre el transformante y otra variedad que incluye el DNA heterólogo. Incluso después de un retrocruzamiento repetido con un precursor recurrente, el DNA insertado y el DNA flanqueante del precursor transformado está presente en la progenie del cruce en la misma localización cromosómica. El término "evento" también se refiere a DNA procedente del transformante original que comprende el DNA insertado y la secuencia flanqueante inmediatamente adyacente al DNA insertado que se esperaría fuera transferida a una progenie que recibe DNA insertado incluyendo el transgén de interés como resultado de un cruce sexual de una línea parental que incluye el DNA insertado (por ejemplo, el transformante original y la progenie resultante de la autofecundación o autopolinización) y una línea parental que no contiene el DNA inverso.

Una planta DAS-59122-7 de maíz resistente a los insectos puede ser cultivada cruzando primeramente sexualmente una primera planta de maíz parental que consiste en una planta de maíz cultivada procedente de la planta DAS-59122-7 de maíz transgénico y su progenie obtenida de la transformación con casetes de expresión de las realizaciones de la presente invención que confiere resistencia a los insectos, y una segunda planta de maíz parental que carece de resistencia a los insectos, produciendo de ese modo una pluralidad de plantas de la primera progenie; y seleccionando luego una planta de la primera progenie que es resistente a los insectos; y autopolinizando la planta de la primera progenie, produciendo de ese modo una pluralidad de plantas de la segunda progenie; y a continuación, seleccionando de las plantas de la segunda progenie una planta resistente a los insectos. Estas etapas pueden incluir además el retrocruzamiento de la planta de la primera progenie resistente a los insectos o de la planta de la segunda progenie resistente a los insectos con la segunda planta de maíz parental o con una tercera planta de maíz parental, produciendo de este modo una planta de maíz que es resistente a los insectos.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "planta" incluye la referencia a plantas completas, órganos de plantas (por ejemplo, hojas, tallos, raíces, etc), semillas, células vegetales, y su progenie. Se entiende que partes de plantas transgénicas que caen dentro del alcance de la invención y son también una realización de la presente invención comprenden, por ejemplo, células vegetales, protoplastos, tejidos, callos, embriones, así como flores, tallos, frutos, hojas y raíces y que se originan de plantas transgénicas o su progenie previamente transformada con una molécula de DNA de la invención y por lo tanto, que consiste al menos en parte en células transgénicas,

Como se usa en la presente memoria, el término "célula vegetal" incluye, sin limitación, semillas, cultivos en suspensión, embriones, regiones meristemáticas, tejido de callo, hojas, raíces, brotes, gametofitos, esporofitos, polen y microesporas. La clase de plantas que se pueden utilizar en los métodos de la invención es generalmente tan amplia como la clase de plantas superiores susceptibles de técnicas de transformación, incluyendo tanto plantas monocotiledóneas como dicotiledóneas.

"Transformación" se refiere a la transferencia de un fragmento de ácido nucleico al genoma de un organismo hospedante, dando como resultado una herencia genéticamente estable. Los organismos hospedantes que contienen los fragmentos de ácido nucleico transformados se denominan organismos "transgénicos". Ejemplos de métodos de transformación de plantas incluyen la transformación mediada por *Agrobacterium* (De Blaere et al., (1987) *Meth. Enzymol.* 143:277) y la tecnología de transformación acelerada por partículas o "pistola de genes" (Klein et al., (1987) *Nature* (London) 327:70-73; patente de EE.UU. N° 4.945.050). A continuación se describen métodos de transformación adicionales.

Por lo tanto, los polinucleótidos aislados de la invención pueden ser incorporados en construcciones recombinantes, típicamente construcciones de DNA, que son capaces de introducción y replicación en una célula hospedante. Dicha construcción puede ser un vector que incluye un sistema de replicación y secuencias que son capaces de transcripción y traducción de una secuencia que codifica el polipéptido en una célula hospedante dada. Un número de vectores adecuados para la transfección estable de células vegetales o para el establecimiento de plantas transgénicas ha sido descrito en, por ejemplo, el trabajo de Pouwels et al., (1985; Supp. 1987) *Cloning Vector: A Laboratory Manual*, Weissbach and Weissbach (1989) *Methods for Plants Molecular Biology*, (Academic Press, New York), y Flevin et al., (1990) *Plant Molecular Biology Manual*, (Kluwer Academic Publishers). Típicamente, los vectores de expresión en plantas incluyen, por ejemplo, uno o más genes de plantas clonados bajo el control transcripcional de secuencias reguladoras en 5' y 3' y un marcador seleccionable dominante. Dichos vectores de expresión en plantas también pueden contener una región reguladora del promotor (por ejemplo, una región reguladora controladora inducible o constitutiva, regulada por el medio ambiente o por el desarrollo de la expresión específica en células o tejidos), un sitio de iniciación de la transcripción, un sitio de unión al ribosoma, una señal de procesamiento del RNA, un sitio de terminación de la transcripción y/o una señal de poliadenilación.

También ha de entenderse que dos plantas transgénicas diferentes también pueden ser apareadas para producir descendencia que contiene dos genes exógenos segregantes añadidos independientemente. La autofecundación de la progenie apropiada puede producir plantas que son homocigóticas para ambos genes exógenos añadidos. También se consideran el retrocruzamiento con una planta parental y el cruzamiento externo con una planta no transgénica como es la propagación vegetativa. Descripciones de otros métodos de reproducción que se utilizan generalmente para diferentes rasgos y cultivos se pueden encontrar en una de las diversas referencias, por ejemplo, Fehr, en *Breeding Methods for Cultivar Development*, Wilcos J. ed., *American Society of Agronomy*, Madison Wisconsin (1987).

Una "sonda" es un ácido nucleico aislado al cual se une un marcador detectable convencional o molécula informadora, por ejemplo, un isótopo radiactivo, ligando, agente quimioluminiscente o enzima. Dicha sonda es complementaria de una cadena de un ácido nucleico diana, en el caso de la presente invención, de una cadena de DNA aislado del evento DAS-59122-7 de maíz, bien sea de una planta de maíz o de una muestra que incluye el DNA del evento. Las sondas de acuerdo con la presente invención incluyen no sólo los ácidos desoxirribonucleicos o ribonucleicos, sino también poliamidas y otros materiales de sonda que se unen específicamente a una secuencia de DNA diana y se pueden utilizar para detectar la presencia de esa secuencia de DNA diana.

Los "cebadores" son ácidos nucleicos aislados que se asocian a una cadena de DNA diana complementaria por hibridación de ácidos nucleicos para formar un híbrido entre el cebador y la cadena de DNA diana, a continuación se extienden a lo largo de la cadena de DNA diana por una polimerasa, por ejemplo, una DNA polimerasa. Los pares de cebadores de la invención se usan para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico diana, por ejemplo, por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otros métodos convencionales de amplificación de ácidos nucleicos. La "PCR" o "reacción en cadena de la polimerasa" es una técnica utilizada para la amplificación de segmentos de DNA específicos (véanse, las patentes de EE.UU. N° 4.683.195 y 4.800.159).

Las sondas y los cebadores son de suficiente longitud de nucleótidos para unirse a la secuencia de DNA diana específicamente en las condiciones de hibridación o las condiciones de reacción determinadas por el operador. Esta longitud puede ser cualquier longitud que sea suficiente para ser útil en un método de detección elegido. En general, se utilizan longitudes de once (11) nucleótidos o más, dieciocho (18) nucleótidos o más, y veintidós (22) nucleótidos o más. Dichas sondas y cebadores se hibridan específicamente con una secuencia diana en condiciones de hibridación de alta rigurosidad. Las sondas y cebadores de acuerdo con realizaciones de la presente invención pueden tener similitud de secuencias completas de DNA de nucleótidos contiguos con la secuencia diana, aunque se pueden diseñar por métodos convencionales sondas que difieran de la secuencia de DNA diana y que conserven la capacidad de hibridarse con secuencias de DNA diana. Las sondas se pueden utilizar como cebadores, pero por lo general están diseñadas para unirse al DNA o RNA diana y no se utilizan en un proceso de amplificación.

Se pueden usar cebadores específicos para amplificar un fragmento de integración para producir un amplicón que se puede utilizar como una "sonda específica" para identificar el evento DAS-59122-7 en muestras biológicas. Cuando la sonda se hibrida con los ácidos nucleicos de una muestra biológica en condiciones que permiten la unión de la sonda a la muestra, esta unión se puede detectar y por lo tanto permite una indicación de la presencia de evento DAS-59122-7 en la muestra biológica. Dicha identificación de una sonda unida se ha descrito en la técnica. En una realización de la invención, la sonda específica es una secuencia que, en condiciones optimizadas, se hibrida específicamente con una región dentro de la región flanqueante en 5' o 3' del evento y también comprende una parte del DNA extraño contiguo a la misma. La sonda específica puede comprender una secuencia de al menos 80%, entre 80 y 85%, entre 85 y 90%, entre 90 y 95%, y entre 95 y 100% idénticos (o complementarios) a una región específica del evento.

Los métodos para preparar y usar sondas y cebadores se describen, por ejemplo, en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed, vol. 1-3, ed. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 1989 (en lo sucesivo, "Sambrook et al., 1989"); *Current Protocols in Molecular Biology*, ed. Ausubel et al., Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, 1992 (con actualizaciones periódicas) (en lo sucesivo, "Ausubel et al., 1992"); e Innis et al., *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press: San Diego, 1990. Los pares de cebadores para PCR pueden proceder de una secuencia conocida, por ejemplo, mediante el uso de programas de ordenador destinados a este propósito, tales como la herramienta de análisis de cebadores de PCR en Vector NTI versión 6 (Informax Inc., Bethesda MD); *PrimerSelect* (DNASTAR Inc., Madison, WI), y *Primer* (Versión 0.5©, 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA). Adicionalmente, la secuencia se puede escanear visualmente y los cebadores identificarse manualmente utilizando directrices conocidas por los expertos en la técnica.

Un "kit", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un conjunto de reactivos con el fin de llevar a cabo las realizaciones de los métodos de la invención, más particularmente, la identificación del evento DAS-59122-7 en muestras biológicas. El kit de la invención se puede utilizar, y sus componentes pueden ajustarse específicamente, para fines de control de calidad (por ejemplo, pureza de lotes de semillas), detección del evento DAS-59122-7 en material vegetal o material que comprende o procede de material vegetal, tales como, aunque sin limitación, productos alimenticios o piensos. "Material vegetal", como se usa en la presente memoria se refiere a material que se obtiene o procede de una planta.

Los cebadores y las sondas basados en las secuencias del inserto y del DNA flanqueante descritas en la presente memoria se pueden utilizar para confirmar (y, si es necesario, para corregir) las secuencias descritas por métodos convencionales, por ejemplo, por re-clonación y secuenciación de dichas secuencias. Las sondas y cebadores de ácidos nucleicos de la presente invención se hibridan en condiciones rigurosas con una secuencia de DNA diana. Se puede usar cualquier método convencional de hibridación o de amplificación de ácidos nucleicos para identificar la presencia de DNA de un evento transgénico en una muestra. Las moléculas de ácido nucleico o sus fragmentos son capaces de hibridarse específicamente con otras moléculas de ácido nucleico en ciertas circunstancias. Como se usa en la presente memoria, se dice que dos moléculas de ácido nucleico son capaces de hibridarse específicamente entre sí, si las dos moléculas son capaces de formar una estructura de ácidos nucleicos bicatenaria y anti-paralela.

Se dice que una molécula de ácido nucleico es el "complemento" de otra molécula de ácido nucleico si presentan complementariedad completa. Como se usa en la presente memoria, se dice que las moléculas presentan "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 se pueden hibridar entre sí con suficiente estabilidad para permitir que permanezcan asociadas entre sí bajo al menos condiciones convencionales "de baja rigurosidad". Del mismo modo, se dice que las moléculas son "complementarias" si se pueden hibridar entre sí con suficiente estabilidad para permitir que permanezcan asociadas entre sí bajo condiciones convencionales de "alta rigurosidad". Las condiciones de rigurosidad convencionales están descritas por Sambrook et al., 1989, y por Haymes et al., en: *Nucleic Acid Hybridation, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, D.C. (1985). Las desviaciones de la complementariedad completa son, por tanto, admisibles siempre y cuando tales desviaciones no impidan completamente la capacidad de las moléculas de formar una estructura bicatenaria. Con el fin de que una molécula de ácido nucleico sirva como un cebador o sonda sólo necesita ser suficientemente complementaria en secuencia para poder formar una estructura bicatenaria estable en las concentraciones particulares empleadas de disolvente y sal.

En las reacciones de hibridación, la especificidad es típicamente función de lavados post-hibridación, siendo los factores críticos la fuerza iónica y la temperatura de la solución de lavado final. El punto de fusión térmico (T_m) es la temperatura (bajo una fuerza iónica y un pH definidos) a la que el 50% de una secuencia diana complementaria se hibrida con una sonda perfectamente apareada. Para los híbridos DNA-DNA, la T_m se puede calcular aproximadamente por la ecuación de Meinkoth and Wahl (1984) *Anal. Biochem.* 138:267-284: $T_m = 81,5^\circ\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\% \text{ GC}) - 0,61 (\% \text{ form}) - 500/L$; donde M es la molaridad de cationes monovalentes, % GC es el porcentaje de los nucleósidos guanosina y citosina del DNA, % form es el porcentaje de formamida en la solución de hibridación y L es la longitud del híbrido en pares de bases. La T_m se reduce en aproximadamente 1°C por cada

1% de desapareamiento; por tanto, la T_m, la hibridación, y/o las condiciones de lavado se pueden ajustar para hibridarse con secuencias de la identidad deseada. Por ejemplo, si se buscan secuencias con una identidad > 90%, la T_m puede disminuir 10°C. Generalmente, se seleccionan condiciones rigurosas que sean aproximadamente 5°C por debajo de la T_m para la secuencia específica y su complemento a una fuerza iónica y pH definidos. Sin embargo, las condiciones estrictamente rigurosas pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 1, 2, 3 o 4°C por debajo que la T_m; las condiciones moderadamente rigurosas pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 6, 7, 8, 9 o 10°C por debajo de la T_m; las condiciones de baja rigurosidad pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 11, 12, 13, 14, 15 o 20°C por debajo de la T_m.

Usando la ecuación, la hibridación y las composiciones de lavado, y la T_m deseada, los expertos en la técnica entenderán que las variaciones en la rigurosidad de la hibridación y/o las soluciones de lavado están descritas inherentemente. Si el grado deseado de desapareamiento da como resultado una T_m inferior a 45°C (solución acuosa) o a 32°C (solución de formamida), se prefiere aumentar la concentración de SSC de modo se pueda aplicar una temperatura más alta. Una guía amplia para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes, Part I, Chapter 2* (Elsevier, New York), y Ausubel et al., eds. (1995), *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 2 (Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York). Véase Sambrook et al., (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York.).

Como se usa en la presente memoria, una secuencia sustancialmente homóloga es una molécula de ácido nucleico que se hibridará específicamente con el complemento de la molécula de ácido nucleico a la que se está comparando en condiciones de alta rigurosidad. Las condiciones de rigurosidad apropiadas que promueven la hibridación de DNA, por ejemplo, solución de cloruro de sodio/citrato de sodio 6X (SSC) a aproximadamente 45°C, seguido por un lavado con SSC 2X a 50°C, son conocidas por los expertos en la técnica o se pueden encontrar en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York (1989), 6.3.1-6.3.6. Típicamente, las condiciones rigurosas serán aquellas en las que la concentración de sal es menor que aproximadamente 1,5 M de ion Na, típicamente una concentración de alrededor 0,01 a 1,0 M de ion Na (u otras sales) a pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es al menos aproximadamente 30°C para sondas cortas (por ejemplo, 10 a 50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60°C para sondas largas (por ejemplo, mayores de 50 nucleótidos). Las condiciones rigurosas también se pueden lograr con la adición de un agente desestabilizante, tal como formamida. Ejemplos de condiciones de baja rigurosidad incluyen hibridación con una solución tampón de formamida del 30 a 35%, NaCl 1 M, SDS (dodecilsulfato sódico) al 1% a 37°C, y un lavado en SSC 0,5X de 1X a 2X (SSC 20X = NaCl 3,0 M/citrato trisódico 0,3 M) de 50 a 55°C. Las condiciones de restricción moderada ilustrativas incluyen hibridación en formamida de 40 a 45%, NaCl 1 M, SDS al 1% a 37°C, y un lavado en SSC de 0,5 X a 1X de 55 a 60°C. Las condiciones de alta rigurosidad ilustrativas incluyen hibridación en formamida al 50%, NaCl 1 M, SDS al 1% a 37°C, y un lavado en SSC 0,1 X de 60 a 65°C. Un ácido nucleico de la invención se puede hibridar específicamente con una o más de las moléculas de ácidos nucleicos únicas para el evento DAS-59122-7 o sus complementos o fragmentos de cualquiera bajo condiciones moderadamente rigurosas.

Los métodos de alineación de secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica. Por lo tanto, la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede conseguir utilizando un algoritmo matemático. Ejemplos no limitativos de dichos algoritmos matemáticos son el algoritmo de Myers and Miller (1988) CABIOS 4:11-17; el algoritmo de homología local de Smith et al., (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482; el algoritmo de alineación por homología de Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443-453; el método de búsqueda por similitud de Pearson and Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:2444-2448; el algoritmo de Karlin and Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:2264, modificado por Karlin and Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:5873-5877.

Se pueden utilizar implementaciones por ordenador de estos algoritmos matemáticos para comparación de secuencias para determinar la identidad de secuencias. Tales implementaciones, incluyen, aunque sin limitación: CLUSTAL en el programa PC/Gene (disponible de Intelligenetics, Mountain View, California); el programa ALIGN (versión 2.0); el programa ALIGN PLUS (versión 3.0, derechos de autor 1997); y GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA y TFASTA de *Wisconsin Genetics Software Package*, Versión 10 (disponible en Accelrys, 9685 Scranton Road, San Diego, CA 92121, USA). Se pueden realizar alineaciones con estos programas utilizando los parámetros por defecto.

El programa CLUSTAL está bien descrito por Higgins and Sharp, *Gene* 73:237-244 (1988); Higgins and Sharp, CABIOS 5:151-153 (1989); Corpet, et al., *Nucleic Acids Research* 16:10881-90 (1988); Huang, et al., *Computer Applications in the Biosciences* 8:155-65 (1992) y Pearson, et al., *Methods in Molecular Biology* 24:307-331 (1994). Los programas ALIGN y ALIGN PLUS se basan en el algoritmo de Myers and Miller (1988) *supra*. Los programas BLAST de Altschul et al., (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403 se basan en el algoritmo de Karlin and Altschul (1990) *supra*. La familia de programas BLAST que se pueden utilizar para la búsqueda de similitud en bases de datos incluye: BLASTN para secuencias de nucleótidos consultada frente a las secuencias de nucleótidos de la base de datos; BLASTX para secuencias de nucleótidos consultada frente a las secuencias de proteínas de la base de datos; BLASTP para secuencias de proteínas consultada frente a las secuencias de proteínas de la base de datos;

TBLASTN para secuencias de proteínas consultadas frente a las secuencias de nucleótidos de la base de datos; y TBLASTX para secuencias de nucleótidos consultadas frente a las secuencias de nucleótidos de la base de datos. Véase, *Current Protocols in Molecular Biology, Chapter 19*, Ausubel, et al., Eds., Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York (1995). La alineación también se puede realizar manualmente por inspección visual.

- 5 Para obtener alineaciones con huecos para fines de comparación, se puede utilizar Gapped BLAST (en BLAST 2.0) como se describe en Altschul et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389. Alternativamente, se puede usar PSI-BLAST (en BLAST 2.0) para realizar una búsqueda iterada que detecta relaciones distantes entre moléculas. Véase Altschul et al., (1997) *supra*. Cuando se utiliza BLAST, Gapped BLAST, PSI-BLAST, se pueden usar los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, BLASTN para secuencias de nucleótidos, BLASTX para proteínas). Véase www.ncbi.nlm.nih.gov.

10 Como se usa en la presente memoria, "identidad de secuencias" o "identidad", en el contexto de dos secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere a los residuos de las dos secuencias que son iguales cuando se alinean para una correspondencia máxima en una ventana de comparación especificada. Cuando se usa el porcentaje de identidad de secuencia con referencia a proteínas se reconoce que las posiciones de los residuos que no son idénticas frecuentemente difieren en sustituciones conservadoras de aminoácidos, donde los residuos de aminoácidos están sustituidos por otros residuos de aminoácidos con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad) y por lo tanto no cambian las propiedades funcionales de la molécula. Cuando las secuencias difieren en sustituciones conservadoras, el porcentaje de identidad de secuencia se puede ajustar al alza para corregir la naturaleza conservadora de la sustitución. Se dice que las secuencias que difieren en dichas sustituciones conservadoras tienen "similitud de secuencias" o "similitud". Los medios para realizar este ajuste son bien conocidos por los expertos en la técnica. Típicamente, esto implica puntuar una sustitución conservadora como parcial en lugar de una falta de coincidencia completa, aumentando de este modo el porcentaje de identidad de las secuencias. Así, por ejemplo, cuando a un aminoácido idéntico se le da una puntuación de 1 y a una sustitución no conservadora se le da una puntuación de cero, a una sustitución conservadora se le da una puntuación entre cero y 1. Se calcula la puntuación de las sustituciones conservadoras, por ejemplo, tal como se aplica en el programa PC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, California).

15 Como se usa en la presente memoria "porcentaje de identidad de secuencias" significa el valor determinado por comparación de dos secuencias óptimamente alineadas en una ventana de comparación, donde la porción de la secuencia de polinucleótidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que las bases de ácidos nucleicos o los residuos de aminoácidos idénticos se encuentran en ambas secuencias lo que proporciona el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación, y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencias.

20 En cuanto a la amplificación de una secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, por PCR) usando un par de cebadores de amplificación particular, "condiciones rigurosas" son las condiciones que permiten que el par de cebadores se hibride sólo a la secuencia de ácido nucleico diana a la que se uniría un cebador que tiene la secuencia de tipo natural correspondiente (o su complemento) y preferiblemente para producir un único producto de amplificación, el amplicón, en una reacción de amplificación térmica de DNA.

25 El término "específico para (una secuencia diana)" indica que una sonda o cebador se hibrida en condiciones de hibridación rigurosas sólo con la secuencia diana en una muestra que comprende la secuencia diana.

30 Como se usa en la presente memoria, "DNA amplificado" o "amplicón" se refiere al producto de amplificación de ácido nucleico de una secuencia de ácido nucleico diana que es parte de un molde de ácido nucleico. Por ejemplo, para determinar si una planta de maíz resultante de un cruzamiento sexual contiene DNA genómico del evento transgénico de la planta de maíz de la invención, el DNA extraído de la muestra de tejido de la planta de maíz puede ser sometido a un método de amplificación de ácido nucleico utilizando un par de cebadores de DNA que incluye un primer cebador procedente de una secuencia flanqueante adyacente al sitio de inserción de DNA heterólogo insertado, y un segundo cebador procedente del DNA heterólogo insertado para producir un amplicón indicativo de la presencia de DNA del evento. Alternativamente, el segundo cebador puede proceder de la secuencia flanqueante. El amplicón tiene una longitud y una secuencia que también es indicativa de la presencia del evento. El amplicón puede variar en longitud respecto a la longitud combinada de los pares de cebadores más un par de bases de nucleótidos hasta cualquier longitud de amplicón producible por un protocolo de amplificación de DNA. Alternativamente, los pares de cebadores pueden proceder de la secuencia flanqueante en ambos lados del DNA insertado de modo que produzcan un amplicón que incluye toda la secuencia de nucleótidos del inserto de la construcción de expresión PHI17662A, así como la secuencia que flanquea el inserto transgénico, véase la FIG. 1 (SEQ ID NO:23), de aproximadamente un tamaño de doce (12) Kb. Un miembro de un par de cebadores procedentes de la secuencia flanqueante puede ser situado a una distancia de la secuencia de DNA insertada, pudiendo variar esta distancia desde un par de bases de nucleótidos hasta los límites de la reacción de amplificación, o aproximadamente veinte mil pares de bases de nucleótidos. El uso del término "amplicón" excluye

específicamente los dímeros de cebadores que se pueden formar en la reacción de amplificación térmica de DNA.

La amplificación de ácidos nucleicos puede llevarse a cabo mediante cualquiera de los diversos métodos de amplificación de ácidos nucleicos conocidos en la técnica, incluyendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se conocen en la técnica una variedad de métodos de amplificación que están descritos, entre otras publicaciones, en las patentes de EE.UU. N° 4.683.195 y 4.683.202 y en los *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, ed. Innis et al., Academic Press, San Diego, 1990. Se han desarrollado métodos de amplificación por PCR para amplificar hasta 22 Kb de DNA genómico y hasta 42 Kb de DNA de bacteriófago (Cheng et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:5695-5699, 1994). Estos métodos, así como otros métodos conocidos en la técnica de amplificación de DNA se pueden usar en la práctica de las realizaciones de la presente invención. Ha de entenderse que se puede necesitar un número de parámetros de un protocolo de PCR específico para ajustarse a las condiciones específicas de laboratorio y puede ser ligeramente modificado e incluso permitir la recuperación de resultados similares. Estos ajustes serán evidentes para los expertos en la técnica.

El amplicón producido por estos métodos puede ser detectado por una pluralidad de técnicas, incluyendo, aunque sin limitación, *Genetic Bit Analysis* (Nikiforov, et al., *Nucleic Acid Res.* 22:4167-4175, 1994), en donde se diseña un oligonucleótido de DNA que se solapa tanto con la secuencia de DNA flanqueante adyacente como con la secuencia de DNA insertada. El oligonucleótido se inmoviliza en pocillos de una placa de micropocillos. Después de la PCR de la región de interés (usando un cebador en la secuencia insertada y otro en la secuencia flanqueante adyacente) un producto monocatenario de PCR se puede hibridar con el oligonucleótido inmovilizado y servir como molde para una reacción de extensión de una sola base utilizando una DNA polimerasa y ddNTP marcados específicos para la base siguiente esperada. La lectura puede ser fluorescente o basada en ELISA. Una señal indica la presencia de la secuencia insertada/ flanqueante debido al resultado esperado de la amplificación, la hibridación, y la extensión de una sola base.

Otro método de detección es la técnica de pirosecuenciación que está descrita en el trabajo de Winge (*Innov. Pharma Tech 00:18-24, 2000*). En este método se diseña un oligonucleótido que se solapa con la unión del DNA adyacente y el DNA insertado. El oligonucleótido se hibrida con un producto monocatenario de PCR a partir de la región de interés (un cebador en la secuencia insertada y otro en la secuencia flanqueante) y se incuba en presencia de una DNA polimerasa, ATP, sulfurilasa, luciferasa, apirasa, adenosina-5'-fosfosulfato y luciferina. Se añaden los dNTP de forma individual y la incorporación da como resultado una señal luminosa que se mide. Una señal luminosa indica la presencia de la secuencia de inserción del transgén/ flanqueante debido al resultado esperado de la amplificación o la hibridación, y la extensión de una o varias bases.

La polarización de la fluorescencia como se ha descrito por Chen et al., (*Genome Res.* 9:492-498, 1999) es también un método que se puede utilizar para detectar un amplicón de la invención. Usando este método se diseña un oligonucleótido que se solapa con la unión del DNA flanqueante y el insertado. El oligonucleótido se hibrida a un producto monocatenario de PCR a partir de la región de interés (un cebador en la secuencia del DNA insertado y otro en la secuencia del DNA flanqueante) y se incuba en presencia de una DNA polimerasa y un ddNTP marcado fluorescentemente. La extensión de una sola base da como resultado la incorporación del ddNTP. La incorporación se puede medir como un cambio en la polarización utilizando un fluorómetro. Un cambio en la polarización indica la presencia de la secuencia del inserto del transgén/ flanqueante debido al resultado esperado de la amplificación, la hibridación, y la extensión de una sola base.

Como un método para detectar y cuantificar la presencia de una secuencia de DNA se describe Taqman® (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) y se entiende completamente en las instrucciones proporcionadas por el fabricante. En pocas palabras, se diseña una sonda de oligonucleótidos FRET que se solapa con la unión del DNA flanqueante y el insertado. La sonda FRET y los cebadores de PCR (un cebador en la secuencia de DNA insertado y otro en la secuencia genómica flanqueante) se ciclan en presencia de una polimerasa termoestable y los dNTP. La hibridación de la sonda FRET da como resultado la escisión y liberación del resto fluorescente alejado del resto atenuador en la sonda FRET. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia flanqueante/del inserto del transgén debido a los resultados esperados de la amplificación y la hibridación.

Se han descrito balizas moleculares para su uso en la detección de secuencias como las encontradas en el trabajo de Tyangi et al., (*Nature Biotech.* 14:303-308, 1996). En pocas palabras, se diseña una sonda de oligonucleótidos FRET que se solapa con la unión del DNA flanqueante y el insertado. La estructura única de la sonda FRET da como resultado una estructura secundaria que mantiene los restos fluorescentes y los restos de atenuación en estrecha proximidad. La sonda FRET y los cebadores de PCR (un cebador en la secuencia de DNA insertado y otro en la secuencia flanqueante) se ciclan en presencia de una polimerasa termoestable y los dNTP. Después del resultado esperado de la amplificación por PCR c, la hibridación de la sonda FRET con la secuencia diana da como resultado la eliminación de la estructura secundaria de la sonda y la separación espacial de los restos fluorescentes y de atenuación. Se produce una señal fluorescente. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia flanqueante/de inserto del transgén debido al resultado esperado de la amplificación y la hibridación.

Una reacción de hibridación que utiliza una sonda específica para una secuencia que se encuentra dentro del amplicón es también otro método utilizado para detectar el amplicón producido por una PCR.

Las realizaciones de la presente invención se definen con más detalle en los siguientes Ejemplos. Debe entenderse que estos ejemplos se dan solamente a modo de ilustración. Por la exposición anterior y estos Ejemplos, un experto en la técnica puede determinar las características esenciales de esta invención, y sin apartarse de su espíritu y alcance, puede efectuar diversos cambios y modificaciones de las realizaciones de la invención para adaptarlas a diversos usos y condiciones. Por lo tanto, a partir de la descripción anterior serán evidentes para los expertos en la técnica diversas modificaciones de las realizaciones de la invención, además de las mostradas y descritas en la presente memoria. Tales modificaciones también están destinadas a caer dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

- 10 Ejemplo 1. Transformación de maíz por la transformación con *Agrobacterium* y regeneración de plantas transgénicas que contienen los genes Cry34Ab1 y Cry35Ab1 (Cry34/35Ab1)

Una molécula de DNA de aproximadamente 7,4 Kb, denominada PHI17662A (SEQ ID NO:24), que incluye una primera casete de expresión de transgén que comprende una molécula de DNA que incluye el promotor, el exón no traducido en 5' y el primer intrón del gen de ubiquitina de maíz (Ubi-1) (Christensen et al., (1992) *Plant Mol. Biol.* 18:675-689 y Christensen and Quail (1996) *Transgenic Res.* 5:213-218) conectada operativamente a una molécula de DNA que codifica una δ -endotoxina de *B.t.* identificada como Cry34Ab1 (Patentes de EE.UU. N° 6.127.180, 6.624.145 y 6.340.593) conectada operativamente a una molécula de DNA que comprende un terminador de la transcripción Pin II aislado de patata (Gyheung An et al., (1989) *Plant Cell.* 1:115-122). La segunda casete de expresión de transgén de la construcción de DNA comprende una molécula de DNA que codifica el promotor de peroxidasa de trigo (Hertig et al., (1991) *Plant Mol. Biol.* 16:171-174) conectada operativamente a una molécula de DNA que codifica una δ -endotoxina de *B.t.* identificada como Cry35Ab1 (Patentes de EE.UU. N° 6.083.499, 6.548.291 y 6.340.593) conectada operativamente a una molécula de DNA que comprende un terminador de la transcripción Pin II aislado de patata (Gyheung An et al., (1989) *Plant Cell.* 1:115-122). Para transformar el tejido embrionario de maíz se utilizó la tercera casete de expresión de transgén de la construcción de DNA que comprende una molécula de DNA del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Odell J.T. et al., (1985) *Nature* 313:810-812; Mitsuhara et al., (1996) *Plant Cell Physiol.* 37:49-59) conectada operativamente a una molécula de DNA que codifica un gen de fosfinotricina-acetiltransferasa (PAT) (Wohlleben W. et al., (1988.) *Gene* 70:25-37) conectada operativamente a una molécula de DNA que comprende un terminador de la transcripción en 3' del 35S de CaMV (véase Mitsuhara et al., (1996) *Plant Cell Physiol.* 37:49-59).

30 Las plantas de maíz con Cry34/35Ab1 de *B.t.* se obtuvieron mediante la transformación con *Agrobacterium*, empleándose el método de Zhao (Patente de EE.UU. N° 5.981.840 y la publicación de patente PCT WO98/32326). En pocas palabras, se aislaron embriones inmaduros de maíz y se pusieron en contacto con una suspensión de *Agrobacterium*, en donde las bacterias eran capaces de transferir DNA de PHI17662 (SEQ ID NO:24) a al menos una célula de al menos uno de los embriones inmaduros (etapa 1: la etapa de infección). Específicamente, en esta etapa los embriones inmaduros se sumergieron en una suspensión de *Agrobacterium* para la iniciación de la inoculación. Los embriones se cultivaron conjuntamente durante un tiempo con el *Agrobacterium* (etapa 2: la etapa de cultivo conjunto). Específicamente, los embriones inmaduros se cultivaron en medio sólido después de la etapa de infección. Después de este periodo de cultivo conjunto se proporcionó una etapa de "reposo". En esta etapa de reposo, los embriones se incubaron en presencia de al menos un antibiótico que se sabe que inhibe el crecimiento de *Agrobacterium* sin la adición de un agente selectivo para transformantes de plantas (etapa 3: la etapa de reposo). En particular, los embriones inmaduros se cultivaron en medio sólido con antibiótico, pero sin un agente de selección, para la eliminación de *Agrobacterium* y durante una fase de reposo para las células infectadas. A continuación, los embriones inoculados se cultivaron en medio que contenía un agente selectivo y se recuperó el callo transformado creciente (etapa 4: la etapa de selección). Específicamente, los embriones inmaduros se cultivaron en medio sólido con un agente selectivo dando como resultando el crecimiento selectivo de células transformadas. A continuación se regeneró el callo en las plantas (etapa 5: la etapa de regeneración) y, específicamente, los callos crecidos en el medio selectivo se cultivaron en medio sólido para regenerar las plantas. Durante el cultivo se mantuvieron físicamente separados los embriones individuales y la mayoría de los explantes murieron en el medio selectivo.

50 A los embriones que sobrevivieron y produjeron tejido de callo sano resistente al glufosinato se les asignaron códigos de identificación únicos que representaban supuestos eventos de transformación y se transfirieron continuamente a un medio de selección recién preparado. Las plantas se regeneraron a partir del tejido procedente de cada evento único y se transfirieron a un invernadero. Se tomaron muestras de las hojas para análisis molecular que verificara la presencia del transgén por PCR y confirmara la expresión de la proteína Cry34/35Ab1 por ELISA. A continuación se sometieron las plantas a un bioensayo de toda la planta usando insectos gusanos de la raíz del maíz occidental. Se cruzaron plantas positivas con líneas endogámicas para obtener semillas de las plantas transformadas iniciales. Se evaluó en el campo un número de líneas. Se seleccionó el evento DAS-59122-7 de una población de eventos transgénicos independientes basada en una combinación superior de características, incluyendo la resistencia a los insectos y el comportamiento agronómico.

- 60 Ejemplo 2. Identificación de la línea de maíz DAS-59122-7 con Cry34/35Ab1 de *Bacillus thuringiensis*

5 Se evaluó la semilla del evento DAS-59122-7. La semilla T1S2 representa la transformación en el antecedente Hi-II, seguido de un cruce con la línea endogámica PH09B y dos series de auto-cruzamiento. Todas las semillas se obtuvieron de Pioneer Hi-Bred (Johnston, IA). La caracterización primaria se realizó en el tejido de la hoja de la planta durante el estudio por confirmación de la actividad de la fosfinotricina-acetiltransferasa (PAT) por medio de pintura con herbicida de la hoja y la expresión de Cry34Ab1 usando dispositivos de flujo lateral.

Las sustancias de control de este estudio se definieron como semillas no modificadas representativas de los antecedentes de la sustancia de ensayo. Las semillas de control de los antecedentes Hi-II y PH09B se utilizaron como controles negativos. Estas semillas no modificadas no contienen las unidades de transcripción de la planta para los genes Cry34Ab1, Cry35Ab1 y PAT. Todas las semillas se obtuvieron de Pioneer Hi-Bred (Johnston, IA).

10 Muestras de DNA de dos eventos con Cry34/35Ab1 de *B.t.* adicionales; el evento DAS-45214-4 y el evento DAS-45216-6 se utilizaron como controles negativos para el análisis por PCR específico de eventos. Los dos eventos se produjeron por medio de la transformación con *Agrobacterium* utilizando el mismo vector utilizado para producir el evento DAS-59122-7 y por consiguiente contenían las unidades de transcripción de la planta para los genes Cry34Ab1, Cry35Ab1 y PAT. Sin embargo, los sitios de inserciones de T-DNA en los eventos DAS-45214-4 y DAS-15 45216-6, incluyendo las regiones de los bordes del DNA genómico, eran diferentes de los del evento DAS-59122-7. Muestras de DNA del evento DAS-45214-4 y del evento DAS-45216-6 se aislaron y caracterizaron por análisis de transferencia Southern. (Datos no mostrados).

20 Las semillas de maíz para el evento DAS-59122-7 y las semillas de control no modificadas (Hi-II y PH09B) se sembraron en cámaras de crecimiento en la Estación Experimental de DuPont (Wilmington, DE) para producir un número suficiente de plantas para análisis del DNA. Para la caracterización del evento DAS-59122-7, se sembraron diez (10) semillas de T1S2. También se sembraron diez (10) semillas para cada línea de control no modificada. Se sembró una (1) semilla por tiesto y el tiesto se identificó de forma única. Las condiciones de siembra y cultivo eran propicias para el crecimiento saludable de las plantas incluyendo la regulación de luz y agua.

25 Se recogieron muestras de hojas para cada una de las plantas de control y con el evento DAS-59122-7. Para cada muestra, se recogió material de hojas suficiente por encima del punto de crecimiento y se introdujo en una bolsa de muestras previamente etiquetada. Las muestras se colocaron en nieve carbónica y se transfirieron a un congelador de ultra baja temperatura después de la recogida. Todas las muestras se mantuvieron congeladas hasta su tratamiento. Todas las muestras de hojas se etiquetaron de modo individual con la identificación de la planta y la fecha de la cosecha.

30 Para confirmar la expresión de la proteína Cry34Ab1 en el evento DAS-59122-7 y la ausencia de expresión en los controles, se recogieron muestras de hojas de todas las plantas con el evento DAS-59122-7 y de control y se cribó la proteína transgénica usando dispositivos de flujo lateral específicos para Cry34Ab1 (Strategic Diagnostics, Inc., Newark, DE). Se tomaron de cada planta perforaciones de hojas y se trituraron en una solución salina tamponada con fosfato con Tween 20 para extraer en bruto la proteína. Se sumergió en el extracto una tira para determinar la presencia o ausencia de la proteína Cry34Ab1. Los resultados del inmunoensayo se utilizaron para confirmar la identidad de las plantas objeto del ensayo antes del análisis molecular, como se muestra en la Tabla 1.

35 Para confirmar la expresión de fosfinotricina-acetiltransferasa (PAT) en las plantas con el evento DAS-59122-7, se realizó una pintura con herbicida de las hojas. Todas las plantas utilizadas en este estudio eran hojas pintadas para confirmar la identidad de la planta. Las plantas se analizaron antes de la etapa de crecimiento R1. Los ensayos se realizaron siguiendo un procedimiento estándar conocido en la técnica de pintura con herbicida de hojas para la identificación de plantas transgénicas que expresan PAT. Específicamente, una porción de una hoja de cada planta se trató con una solución de aproximadamente 2% del herbicida glufosinato, Basta® (Bayer CropScience) en agua y se comprobó visualmente el tejido pardo o necrótico en la zona de hoja pintada 4-12 días después de su aplicación. Se registraron los resultados de cada planta y se usaron para determinar la expresión de PAT en cada planta de ensayo, como se muestra en la Tabla 1. Como se muestra en la Tabla 1, de las diez (10) plantas analizadas para determinar la generación de T1S2 con el evento DAS-59122-7, seis (6) plantas expresaban tanto Cry34Ab1 como PAT, mientras que cuatro (4) plantas no expresaban ninguna proteína. Todos los controles no modificados dieron negativo para los ensayos tanto de CryAb1 como de PAT (datos no mostrados).

50 Tabla 1: Datos de la expresión de las proteínas Cry34Ab1 y PAT y de la hibridación Southern para el evento DAS-59122-7 con Cry34/35Ab1 de *B.t.*

DI de la planta	DI de la muestra	Expresión de Cry34Ab1 y PAT ¹	Sonda Cry34Ab1 ² para transferencia Southern	Sonda Cry35Ab1 ² para transferencia Southern	Sonda PAT ² para transferencia Southern
02-122C 1	T1S2 1 con DAS59122-7	positiva	+	+	+

DI de la planta	DI de la muestra	Expresión de Cry34Ab1 y PAT ¹	Sonda Cry34Ab1 ² para transferencia Southern	Sonda Cry35Ab1 ² para transferencia Southern	Sonda PAT ² para transferencia Southern
02-122C 2	T1S2 2 con DAS59122-7	positiva	+	+	+
02-122C 3	T1S2 3 con DAS59122-7	positiva	+	+	+
02-122C 4	T1S2 4 con DAS59122-7	negativa	-	-	-
02-122C 5	T1S2 5 con DAS59122-7	positiva	+	+	+
02-122C 6	T1S2 6 con DAS59122-7	negativa	-	-	-
02-122C 7	T1S2 7 con DAS59122-7	positiva	+	+	+
02-122C 8	T1S2 8 con DAS59122-7	negativa	-	-	-
02-122C 9	T1S2 9 con DAS59122-7	negativa	-	-	-
02-122C 10	T1S2 10 con DAS59122-7	positiva	+	+	+

¹. La expresión positiva de Cry34Ab1 indica la detección de la expresión de la proteína determinada por el dispositivo de flujo lateral basado en inmunoensayo específico para la detección de la proteína Cry34Ab1. La expresión negativa indica que no se ha detectado la proteína Cry34Ab1. La expresión positiva de PAT indica plantas que eran tolerantes al tratamiento con herbicida y la expresión negativa indica plantas que eran sensibles al herbicida.

². + indica que hay señal de hibridación en la transferencia Southern, - indica que no hay señal de hibridación en la transferencia Southern. La sonda del gen Cry34Ab1 se hibridó con el fragmento T-DNA interno esperado de 1,915 kb, la sonda del gen Cry35Ab1 se hibridó con el fragmento T-DNA interno esperado de 2,607 kb y la sonda del gen PAT se hibridó con un fragmento del borde de 3,4 kb coherente con una única inserción de T-DNA intacta determinada por análisis de transferencia Southern.

Ejemplo 3. Análisis por transferencia Southern de la línea de maíz DAS-59122-7 con Cry34/35Ab1 de *Bacillus thuringiensis*

Cantidades de un gramo de muestras de hojas se trituraron bajo nitrógeno líquido y se aisló el DNA genómico utilizando DNeasy[®] Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) o utilizando un procedimiento estándar de tampón de extracción de urea. Después de la extracción, se visualizó el DNA en un gel de agarosa para determinar la calidad del DNA y se cuantificó usando el reactivo Pico Green[®] (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) y análisis espectrofluorométrico.

Para estimar los tamaños de los fragmentos de DNA en geles de agarosa se utilizó la escalera de DNA de 1 Kb (Invitrogen, Carlsbad, CA).

El DNA genómico aislado de las plantas con el eventos DAS-59122-7 se digirió con *Nco* I y se separó por electroforesis, se transfirió a membranas de nilón y se hibridó con las sondas de los genes Cry34Ab1, Cry35Ab1 y PAT utilizando procedimientos estándares conocidos en la técnica. Las transferencias se expusieron a rayos X durante uno o más períodos de tiempo para detectar fragmentos de hibridación y visualizar patrones de peso molecular. A continuación se capturaron digitalmente las imágenes fotografiando las películas de rayos X y/o detectándolas con un instrumento Lumi-Imager[™] (Roche, Indianapolis, IN). Para cada sonda se documentaron los tamaños de las bandas detectadas. Se utilizó análisis por transferencia Southern como medio para verificar la presencia de la inserción en las plantas de ensayo y confirmar que todas las plantas con el evento DAS-59122-7 contenían la misma inserción, como se muestra en la Tabla 1. (Las transferencias Southern no se muestran). Los análisis por transferencia Southern indicaron que el evento DAS-59122-7 contenía una única inserción que consistía en una copia intacta de la región del T-DNA del plásmido PHP 17662, mientras que los segregantes nulos, determinados por análisis de expresión de proteínas no se hibridaron con las sondas de genes. Además, las plantas con el evento DAS-59122-7 que expresaban las dos proteínas exhibieron patrones de hibridación idénticos en las transferencias Southern (datos no mostrados). Específicamente, la sonda del gen Cry34Ab1 se hibridó con el

fragmento de T-DNA interno esperado de 1,915 kb, la sonda del gen Cry35Ab1 se hibridó con el fragmento de T-DNA interno esperado de 2,607 kb y la sonda del gen PAT se hibridó con un fragmento del borde de 3,4 kb coherente con una única inserción intacta de T-DNA determinada por los resultados de transferencia Southern.

5 Ejemplo 4. Secuenciación de las regiones de los bordes flanqueantes y del inserto T-DNA de la línea DAS-59122-7 de maíz con Cry34/35Ab1 de *Bacillus thuringiensis*

10 Las regiones de los bordes flanqueantes y del inserto T-DNA se clonaron en el evento DAS-59122-7 con Cry34/35Ab1 de *B.t.* utilizando métodos basados en PCR como los representados en diagramas en las Figuras 2 y 3. Específicamente, las secuencias que bordean los extremos 5' y 3' del inserto en el evento DAS-59122-7 se obtuvieron utilizando dos técnicas de desplazamiento sobre el genoma. El primer método de desplazamiento era esencialmente el método descrito para el Universal Genome Walker Kit (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA) y el segundo método se realizó de acuerdo con el protocolo *splinkerette* descrito por Devon et al., (1995) *Nucleic Acids Research* 23 (9):1644-1645, con las modificaciones descritas por Stover (2001), U.C. Irvine (comunicación personal).

15 En pocas palabras, el DNA genómico fue digerido con diversas enzimas de restricción (*Dra* I, *EcoR* V, *Pvu* II, *Sma* I y *Stu* I para el método de Universal Genome Walker y *Bam*H I, *EcoR* I, *Hind* III y *Xba* I para el método *splinkerette*) y a continuación ligado a adaptadores de extremos romos para el método de Genome Walker y a adaptadores específicos para la enzima de restricción utilizada para el método *splinkerette*. Se diseñaron los adaptadores para ambos métodos de desplazamiento sobre el genoma para evitar la extensión del extremo 3' del adaptador durante la PCR y por lo tanto reducir o eliminar la amplificación no específica. Los fragmentos de DNA genómico ligados al adaptador se denominaron a continuación genotecas de desplazamiento sobre el genoma o genotecas de *splinkerette*, una genoteca para cada enzima de restricción. Las genotecas se prepararon a partir de DNA genómico aislado de tres plantas T1S2 individuales con el evento DAS-59122-7 con Cry34/35Ab1 de *B.t.*; plantas T1S2 1 con DAS-59122-7, T1S2 2 con DAS-59122-7 y T1S2 10 con DAS-59122-7 y de una planta de control Hi-II y una planta de control PH09B.

25 Después de la construcción de las genotecas, se completaron las amplificaciones por PCR anidadas para amplificar la secuencia diana utilizando Advantage™-GC Genomic PCR kit (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA). La amplificación por PCR primaria utilizó un cebador con identidad para el adaptador y un cebador específico del gen. El cebador adaptador no amplificará un producto en el primer ciclo de la PCR primaria y sólo se obtendrán productos a partir del cebador específico del gen. La asociación y la amplificación a partir del cebador adaptador sólo tienen lugar después que se ha producido la cadena complementaria a partir del cebador específico del gen. Después de la amplificación por PCR primaria, se realizó una PCR anidada secundaria para aumentar la especificidad de las reacciones genómicas de la PCR. Los cebadores anidados consistieron en secuencias específicas de los genes y específicas del adaptador internas para los respectivos cebadores utilizados en la PCR primaria.

35 Para las secuencias de los bordes flanqueantes en 5', se inició la PCR anidada utilizando cebadores específicos para el extremo 5' del T-DNA insertado junto con cebadores complementarios a la secuencia del adaptador ligada al DNA digerido. Similarmente, la clonación de la secuencia del borde flanqueante en 3' comenzó con un cebador específico para el extremo 3' del T-DNA insertado y un cebador complementario a la secuencia del adaptador. Se utilizaron secuencias de DNA internas a las secuencias del borde derecho y del borde izquierdo de T-DNA dentro de la región de T-DNA como puntos de partida para el "desplazamiento" sobre la secuencia genómica del maíz, debido a que representaban una secuencia única (no homólogas con las secuencias genómicas endógenas de maíz) a partir de la cual se anclan los cebadores que se desplazan sobre el genoma.

40 Los productos obtenidos por la PCR anidada se analizaron por electroforesis en gel de agarosa (datos no mostrados). Para una caracterización adicional se identificaron fragmentos visibles en las genotecas preparadas a partir de una o más muestras de DNA con el evento DAS-59122-7 y ausentes en las genotecas preparadas a partir de las muestras de DNA genómico de Hi-II y PH09B. Los fragmentos amplificados por PCR identificados se separaron por electroforesis en gel preparatoria, se aislaron utilizando un QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) y se enviaron directamente para secuenciación o se clonaron en un vector plásmido pGEM-T Easy usando el pGEM-T Easy Vector System I (Promega Corp., Madison, WI) antes de la secuenciación del DNA. Las reacciones de secuenciación se realizaron con cebadores utilizados para la amplificación por PCR anidada o con cebadores específicos para uso con el vector pGEM-T Easy. La secuencia obtenida se utilizó para diseñar cebadores específicos de genes adicionales para continuar el "desplazamiento" sobre la secuencia genómica del maíz desconocida. Se realizaron múltiples rondas de desplazamientos genómicos hasta que se obtuvieron al menos 500 pb de la secuencia del borde de los extremos del inserto de T-DNA.

55 Con el fin de garantizar la validez de las secuencias de los bordes flanqueantes, se realizaron amplificaciones por PCR específicas de eventos adicionales en el DNA genómico a partir del evento DAS-59122-7. Se secuenciaron los fragmentos amplificados con el fin de ampliar aún más la región de solapamiento de secuencias a partir de la región del inserto de T-DNA en el DNA genómico flanqueante en 5' y 3'. Los cebadores, mostrados en la Tabla 2, se diseñaron basándose en la secuencia obtenida a partir de los experimentos de desplazamiento sobre el genoma para amplificar un fragmento que abarcaba la unión única del T-DNA con el DNA genómico de maíz. El conjunto de cebadores 03-O-506/02-O-476 (SEQ ID NO:10/SEQ ID NO:9) abarcaba la unión en 5' y amplificaba un fragmento de

ES 2 432 749 T3

313 pb (desde el pb 2427 hasta el pb 2739, véase la Figura 1) y el conjunto de cebadores 02-O-447/03-O-577 (SEQ ID NO:8/SEQ ID NO:17) abarcaba la unión en 3' y amplificaba un fragmento de 754 pb (desde el pb 9623 hasta el pb 10376, véase la Figura 1).

Tabla 2. Secuencias de cebadores

Nombre del cebador	Secuencia (5'-3')	Localización de la secuencia diana (pb hasta pb) ¹
02-O-215	(SEQ ID NO:1) GTGGCTCCTTCAACGTTGCGGTTCTGTC	2743-2716
02-O-219	(SEQ ID NO:2) CGTGCAAGCGCTCAATTCGCCCTATAGTG	9830-9858
02-O-227	(SEQ ID NO:3) AATTGAGCGCTTGCACGTTT	9846-9827
02-O-370	(SEQ ID NO:4) AACAAACAAGACCGGCCACACCCTC	4871-4894
02-O-371	(SEQ ID NO:5) GAGGTGGTCTGGATGGTGTAGGTCA	5187-5163
02-O-372	(SEQ ID NO:6) TACAACCTCAAGTGGTTCCTCTTCCCGA	7017-7044
02-O-373	(SEQ ID NO:7) GAGGTCTGGATCTGCATGATGCGGA	7897-7873
02-O-447	(SEQ ID NO:8) AACCCCTAGTATGTATTTGTATT	9623-9645
02-O-476	(SEQ ID NO:9) CTCCTTCAACGTTGCGGTTCTGTCAG	2739-2714
03-O-506	(SEQ ID NO:10) TTTTGCAAAGCGAACGATTCAGATG	2427-2451
03-O-514	(SEQ ID NO:11) GCGGGACAAGCCGTTTTACGTTT	2687-2709
03-O-542	(SEQ ID NO:12) GACGGGTGATTTATTTGATCTGCAC	10766-10742
03-O-543	(SEQ ID NO:13) CATCTGAATCGTTCGCTTTGCAAAA	2451-2427
03-O-564	(SEQ ID NO:14) CTACGTTCCAATGGAGCTCGACTGTC	2324-2299
03-O-569	(SEQ ID NO:15) GGTCAAGTGGACACTTGGTCACTCA	10150-10174
03-O-570	(SEQ ID NO:16) GAGTGAAGAGATAAGCAAGTCAAAG	10275-10299
03-O-577	(SEQ ID NO:17) CATGTATACGTAAGTTTGGTGCTGG	10376-10352

Nombre del cebador	Secuencia (5'-3')	Localización de la secuencia diana (pb hasta pb) ¹
03-O-784	(SEQ ID NO:18) AATCCACAAGATTGGAGCAAACGAC	2189-2213
67609	(SEQ ID NO:36) CGTATTACAATCGTACGCAATTCAG	9862-9886
69240	(SEQ ID NO:37) GGATAAACAAACGGGACCATAGAAG	9941-9965
¹ . Localización en la secuencia del evento DAS-59122-7 (véase la Figura 1). Bases 1 - 2593 = borde en 5', bases 2594 - 9936 = inserto de T-DNA, bases 9937 - 11922 = borde en 3'.		

5 Para la verificación de la secuencia de DNA que se insertó en el genoma del maíz, se realizó una PCR para amplificar, clonar y secuenciar el T-DNA insertado del evento DAS-59122-7. Se utilizaron los conjuntos de cebadores para PCR (SEQ ID NO:11/SEQ ID NO:5), (SEQ ID NO:4/SEQ ID NO:7) y (SEQ ID NO:6/SEQ ID NO:3) mostrados en la Tabla 3 para amplificar tres fragmentos solapantes etiquetados 22I-1 (SEQ ID NO:25), 22I-2 (SEQ ID NO:26) y 22I-3 (SEQ ID NO:27) que representan la secuencia desde la región 5' del T-DNA hasta la región 3' del inserto de T-DNA desde el pb 2687 hasta el pb 9846 para el evento DAS-59122-7 (véase la Figura 1). En la Tabla 3 se recoge la información del amplicón de PCR y en la Tabla 2 se recogen las secuencias de cebadores.

Tabla 3. Descripciones de cebadores y amplicones de PCR

Amplicón de PCR	Tamaño (pb)	Secuencia diana	Cebador directo	Cebador inverso	Localización del amplicón de PCR (pb hasta pb) ¹
22I-1 (SEQ ID NO:25)	2501	Inserto de T-DNA	03-O-514 (SEQ ID NO:11)	02-O-371 (SEQ ID NO:5)	2687 - 5187
22I-2 (SEQ ID NO:26)	3027	Inserto de T-DNA	02-O-370 (SEQ ID NO:4)	02-O-373 (SEQ ID NO:7)	4871 - 7897
22I-3 (SEQ ID NO:27)	2830	Inserto de T-DNA	02-O-372 (SEQ ID NO:6)	02-O-227 (SEQ ID NO:3)	7017 - 9846
O784/O564 (SEQ ID NO:28)	136	Borde genómico en 5'	03-O-784 (SEQ ID NO:18)	03-O-564 (SEQ ID NO:14)	2189 - 2324
O784/O543 (SEQ ID NO:29)	263	Borde genómico en 5'	03-O-784 (SEQ ID NO:18)	03-O-543 (SEQ ID NO:13)	2189-2451
O569/O577 (SEQ ID NO:30)	227	Borde genómico en 3'	03-O-569 (SEQ ID NO:15)	03-O-577 (SEQ ID NO:17)	10150 - 10376
O570/O542 (SEQ ID NO:31)	492	Borde genómico en 3'	03-O-570 (SEQ ID NO:16)	03-O-542 (SEQ ID NO:12)	10275 - 10766
O784/O215 (SEQ ID NO:32)	555	Unión en 5'	03-O-784 (SEQ ID NO:18)	02-O-215 (SEQ ID NO:1)	2189 - 2743
O219/O577 (SEQ ID NO:33)	547	Unión en 3'	02-O-219 (SEQ ID NO:2)	03-O-577 (SEQ ID NO:17)	9830 - 10376
O506/O476 (SEQ ID NO:34)	313	Unión en 5'	03-O-506 (SEQ ID NO:10)	02-O-476 (SEQ ID NO:9)	2427 - 2739
O447/O577 (SEQ ID NO:35)	754	Unión en 3'	02-O-447 (SEQ ID NO:8)	03-O-577 (SEQ ID NO:17)	9623 - 10376
67609/69240 (SEQ ID NO:38)	104	Unión en 3'	67609 (SEQ ID NO:36)	69240 (SEQ ID NO:37)	9862 - 9965

¹. Localización en la secuencia del evento DAS-59122-7 (véase la Figura 1). Bases 1 - 2593 = borde en 5', bases 2594 - 9936 = inserto de T-DNA, bases 9937 - 11922 = borde en 3'.

5 Se utilizó el kit de polimerasa PCR GC2 Advantage™ (BD Biosciences Clontech, Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante para amplificar los fragmentos de inserción (22I-1 (SEQ ID NO:25), 22I-2 (SEQ ID NO:26) y 22I-3 (SEQ ID NO:27)). En pocas palabras, una mezcla de reacción de 50 µL contenía cebadores en 5' y 3' a una concentración final de 0,2 µM y 40 ng de DNA genómico. Las PCR se realizaron por duplicado utilizando una preparación de DNA genómico de las plantas T1S2 1 con DAS-59122-7 y T1S2 2 con DAS-59122-7. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C durante 1 minuto, seguido por 35 ciclos de 94°/95°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 5 minutos, con una extensión final a 68°C durante 6 minutos. Los productos de amplificación por PCR se visualizaron bajo luz UV, seguido de electroforesis a través de un gel de agarosa al 1% en TBE 1X (Tris- borato 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,3) teñido con bromuro de etidio.

10 Los fragmentos de PCR 22I-1 (SEQ ID NO:25), 22I-2 (SEQ ID NO:26) y 22I-3 (SEQ ID NO:27) se purificaron por escisión de los fragmentos de gel de agarosa al 0,8% en TBE 1X teñido con bromuro de etidio y purificación del fragmento de la agarosa utilizando un kit de extracción de gel QIAquick (Qiagen). Los fragmentos de PCR se clonaron en un vector plasmídico pGEM-T Easy usando el pGEM-T Easy Vector System I (Promega Corp.). Los fragmentos clonados se verificaron por minipreparación del DNA del plásmido (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen) y digestión con restricción con *Not* I. Los clones del plásmido y/o fragmentos de inserción de PCR purificados se

usaron a continuación para la secuenciación del inserto completo. Las reacciones de secuenciación se realizaron con cebadores diseñados para ser específicos para las secuencias conocidas de T-DNA o con cebadores específicos para el uso con el vector pGEM-T Easy. Sigma - Genosys, Inc. (The Woodlands, TX) sintetizó todos los cebadores de PCR, que se usaron a una concentración final de 0,2-0,4 μ M en las PCR.

5 Las PCR con DNA genómico aislado de los eventos DAS-59122-7, DAS-45214-4 y DAS-45216-6 con Cry34/35Ab1 de *B.t.*, y las líneas de control sin modificar Hi-II y PH09B se utilizaron para confirmar (1) la presencia de DNA genómico de maíz en las regiones de los bordes secuenciadas del evento DAS-59122-7 y (2) la amplificación específica de los eventos través de las uniones del inserto de T-DNA y los bordes del DNA genómico en el evento DAS-9122 -7.

10 Los cebadores de PCR diseñados para amplificar la secuencia del borde que flanquea el inserto en el evento DAS-59122-7 se utilizaron para confirmar la presencia de las regiones en líneas de control no modificadas así como en el evento DAS-59122-7. Se analizaron dos (2) conjuntos de cebadores para cada uno de los bordes en 5' y 3' (cuatro (4) conjuntos en total). Los conjuntos de cebadores 03-O-784/03-O-564 (SEQ ID NO:18/SEQ ID NO:14) y 03-O-784/03-O-543 (SEQ ID NO:18/SEQ ID NO:13) se usaron para amplificar fragmentos de 136 pb y 263 pb, respectivamente, desde la secuencia del borde en 5' hasta el inserto de T-DNA en el evento DAS-59122-7 (Figuras 2 y 3). Igualmente, los conjuntos de cebadores 03-O-569/03-O-577 (SEQ ID NO:15/SEQ ID NO:17) y 03-O-570/03-O-542 (SEQ ID NO:16/SEQ ID NO:12) se usaron para amplificar fragmentos de 227 pb y 492 pb, respectivamente, desde el borde genómico en 3' (Figuras 2 y 3).

20 Los cebadores diseñados para amplificar fragmentos por la unión de la secuencia de borde y el inserto de T-DNA se utilizaron para establecer fragmentos de PCR específicos de eventos para el evento DAS-59122-7. Para cada una de las dos uniones se seleccionó un conjunto de cebadores. El conjunto de cebadores 03-O-784/02-O-215 (SEQ ID NO:18/SEQ ID NO:1) se diseñó para amplificar un fragmento de 555 pb por la unión en 5' y el conjunto de cebadores 02-O-219/03-O-577 (SEQ ID NO:2/SEQ ID NO:17) se diseñó para la amplificación de un fragmento de 547 pb por la unión en 3'. Se utilizó un conjunto de cebadores, IVR1 (O197) (SEQ ID NO:39) 5'-CCGCTGTATCAC AAGGGCTGGTACC-3' e IVR2 (O198) (SEQ ID NO:40) 5'-GGAGCCCGTGTAGAGCATGACGATC-3', basados en el gen endógeno de la invertasa de maíz (Hurst et al., (1999) *Molecular Breeding* 5 (6): 579-586) para generar un producto de amplificación de 226 pb como control positivo interno para todas las muestras de DNA genómico de maíz.

30 Todos los cebadores de la PCR fueron sintetizados por Sigma-Genosys, Inc. y se utilizaron a una concentración final de 0,2-0,4 μ M en las PCR. Las secuencias de los cebadores de PCR se recogen en la Tabla 2. Para amplificaciones por PCR, se utilizó el Advantage™-GC 2 PCR Kit (BD Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron aproximadamente 10-100 ng de molde de DNA genómico por PCR de 50 μ L. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial del molde a 94°C durante 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 95°C durante 1 minuto, 60°C durante 2 minutos y 72°C durante 3 minutos, con extensión final a 72°C durante 7 minutos. Los productos de amplificación por PCR se visualizaron bajo luz UV seguido de electroforesis en un gel de agarosa al 1% en TBE 1X y bromuro de etidio.

40 Los datos de las secuencias obtenidos para el inserto de T-DNA y las regiones de los bordes del evento DAS-59122-7 se revisaron y reunieron utilizando el programa informático Seqman II™ Versión 4.0.5 (DNASTar, Inc., Madison, WI). Las secuencias de los bordes 5' y 3' que flanquean el inserto presente en el evento DAS-59122-7 se utilizaron para la búsqueda de homología frente a las bases de datos públicas de GenBank con el fin de caracterizar adicionalmente el sitio de inserción en el genoma del maíz. El análisis para identificar marcos de lectura abiertos en las regiones de unión entre los bordes flanqueantes y el inserto de T-DNA en el evento DAS-59122-7 se realizó utilizando Vector NTI 8.0 (InforMax™, Inc., Frederick, MD).

45 En total, se confirmaron 11922 pb de la secuencia del DNA genómico del evento DAS-59122-7 (véase la Figura 1). En el extremo 5' del inserto de T-DNA, se identificaron 2593 pb de la secuencia del borde flanqueante y se obtuvieron 1986 pb de la secuencia del borde flanqueante en el extremo 3' a partir de fragmentos obtenidos de los experimentos de desplazamiento sobre el genoma. Un total de 7160 pb del inserto de T-DNA se clonó y secuenció usando conjuntos de cebadores de PCR diseñados para amplificar tres fragmentos solapantes etiquetados 221-1 (2501 pb) (SEQ ID NO:25), 221-2 (3027 pb) (SEQ ID NO:26) y 221-3 (2830 pb) (SEQ ID NO:27) que representaban la secuencia desde la región 5' del T-DNA que va hasta la región 3' del inserto de T-DNA para el evento DAS- 59122-7 desde el pb 2687 hasta el pb 9846 (véase la Figura 1). El resto de la región del inserto de T-DNA se secuenció a partir de dos fragmentos de PCR, O506/O476 (SEQ ID NO:10/SEQ ID NO:9) y O447/O577 (SEQ ID NO:8/SEQ ID NO:17) que abarcaban las uniones a 5' y 3', respectivamente, del inserto de T-DNA con el DNA genómico de maíz. Los cebadores usados se diseñaron basándose en la secuencia obtenida en los experimentos de desplazamiento sobre el genoma para amplificar un fragmento que abarcaba la unión única del T-DNA con el DNA genómico de maíz. El conjunto de cebadores 03-O-506/03-O-476 (SEQ ID NO:10/SEQ ID NO:9) abarcaba la unión a 5' y amplificó un fragmento de 313 pb (desde el pb 2427 hasta el pb 2739) y el conjunto de cebadores 03-O-447/03-O-577 (SEQ ID NO:8/SEQ ID NO:17) abarcaba la unión a 3' y amplificó un fragmento de 754 pb (desde el pb 9623 hasta el pb 10376). En combinación, un total de 7343 pb del inserto de T-DNA en el evento DAS-59122-7 se clonó y secuenció (desde el pb 2594 hasta el pb 9936, véase la Figura 1) y se comparó con la secuencia del plásmido transformante,

PHP 17662. Se observaron dos diferencias de nucleótidos en el pb 6526 y en el pb 6562 en la región del promotor de peroxidasa de trigo no traducida del inserto de T-DNA (véase la Figura 1). Ninguno de los cambios de bases observado afectó a la composición del marco de lectura abierto del inserto de T-DNA. Se encontró que tanto las regiones de los extremos 3' como las de 5' del inserto de T-DNA estaban intactas, excepto por la delección de los últimos 22 pb en el extremo 5' y los 25 pb en el extremo 3' incluyendo las regiones de los bordes izquierdo y derecho del T-DNA, respectivamente. Aunque se sabe que las secuencias de los bordes de T-DNA desempeñan un papel crítico en la inserción de T-DNA en el genoma, no se esperaba este resultado puesto que las inserciones son frecuentemente imperfectas, en particular en el borde izquierdo de T-DNA (Tinland (1996) *Trends in Plant Science* 1(6):178-184).

El análisis con el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de las regiones de los bordes genómicos del evento DAS-59122-7 mostró una homología limitada con las secuencias disponibles públicamente (Release 138.0 GenBank, Oct 25, 2003). El análisis de la región del borde 5' encontró dos zonas con homología significativa con las secuencias genómicas y EST (Expressed Sequence Tag) de maíz. La primera zona abarca 179 pb (desde el pb 477 hasta el pb 655 de la secuencia del borde) y muestra similitud con varios marcadores moleculares, secuencias cromosómicas y secuencias de consenso obtenidos por alineación de varias EST. La segunda zona se produce en el pb 1080 hasta el pb 1153 (74 pb) de la secuencia del borde 5' y muestra similitud con un número de diferentes secuencias EST y genómicas de maíz. La región del borde 3' tenía también dos pequeñas regiones no contiguas similares a las secuencias del DNA de la planta. La región interior en 3' de 162 pb (desde el pb 9954 hasta el pb 10115) mostró similitud con el extremo no traducido en 3' de dos genes genómicos de la alcohol-deshidrogenasa (*adh1*) de *Zea mays* así como con varias secuencias de consenso de EST. Una región más pequeña (57 pb) en el centro del borde 3' (desde el pb 10593 hasta el pb 10649) mostró similitud con regiones no codificadoras de múltiples secuencias genómicas de maíz.

En general, no se identificaron regiones homólogas mayor que 179 pares de bases en ninguna de las secuencias de bordes genómicas, ni se encontró más de una región homóloga procedente de la misma secuencia conocida. Se examinaron entradas individuales que mostraban similitud con las secuencias de los bordes del evento DAS-59122-7 para determinar si la inserción en el evento DAS-59122-7 tenía lugar en una secuencia codificadora de proteínas caracterizadas. Ninguna de las regiones de similitud se encontraba dentro de ninguna de las secuencias codificadoras de proteínas conocidas. La alineación local de toda la secuencia del plásmido de transformación, PHP17662, con las secuencias de los bordes del evento DAS-59122-7 no mostró homologías significativas, lo que indica que las regiones de los bordes que flanquean el inserto de T-DNA no contenían fragmentos del plásmido transformante. Por consiguiente, la identificación y caracterización de la secuencia genómica que flanquea el sitio de inserción en el evento DAS-59122-7 eran limitadas debido a la ausencia de regiones significativas de homología con secuencias conocidas.

Se analizaron las regiones de unión a 5' y 3' entre la secuencia del borde genómico de maíz y el inserto de T-DNA en el evento DAS-59122-7 para determinar la presencia de nuevos marcos de lectura abiertos. No se identificó ningún marco de lectura abierto de tamaño significativo (> 100 aminoácidos) en las regiones de unión al borde 5' o 3', lo que indicaba que no se generaron nuevos marcos de lectura abiertos como resultado de la inserción de T-DNA. Adicionalmente, las búsquedas de homología no indicaron la presencia de marcos de lectura abiertos endógenos de maíz en las regiones de los bordes que pudieran haber sido interrumpidos por la inserción de T-DNA en el evento DAS-59122-7 con Cry34/35Ab1 de *B.t.*

Ejemplo 5. Cebadores de la PCR

Se utilizaron pares de cebadores específicos del DNA del evento para producir un amplicón indicativo de la presencia de DAS-59122-7. Estos pares de cebadores de eventos incluyen, aunque sin limitación, SEQ ID NO:18 y SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:17; SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:9; y SEQ ID NO:8 y SEQ ID NO:17; y SEQ ID NO:36 y SEQ ID NO:37. Además de estos pares de cebadores, cualquier par de cebadores procedentes de SEQ ID NO:21 y SEQ ID NO:22, que cuando se utilizan en una reacción de amplificación de DNA producen un amplicón de DNA indicativo de la presencia de DAS-59122-7, son una realización de la presente invención. Cualquier modificación de estos métodos que utilizan cebadores de DNA o sus complementos para producir una molécula de DNA amplicón indicativo de la presencia de DAS-59122-7 está dentro de los conocimientos de los expertos en la técnica. Además, se incluyen como patrones internos para las condiciones de reacción, pares de cebadores de control, que incluyen IVR1(O197)/IVR2(O198) (SEQ ID NO:39/SEQ ID NO:40) para amplificación de un gen endógeno de maíz.

El análisis de los extractos de DNA de tejidos de plantas para determinar la presencia del evento DAS-59122-7 debe incluir un extracto de DNA de tejido positivo de control (una muestra de DNA que se sabe que contiene las secuencias transgénicas). Una amplificación esperada del control positivo demuestra que la PCR se realizó en condiciones que permiten la amplificación de secuencias diana. También debe incluirse un control de extracto de DNA negativo, o de tipo natural, en el que el DNA molde proporcionado es DNA genómico preparado a partir de una planta no transgénica o es una planta transgénica pero que no contiene DAS-59122-7. Adicionalmente, un control negativo que no contiene extracto de DNA molde de maíz será un indicador útil de los reactivos y las condiciones utilizados en el protocolo de la PCR.

Las moléculas de cebadores de DNA adicionales de longitud suficiente pueden ser seleccionadas de SEQ ID NO:21 y SEQ ID NO:22 por los expertos en la técnica de métodos de amplificación de DNA y las condiciones ser optimizadas para la producción de un amplicón indicativo de la presencia del evento DAS-59122-7. El uso de estas secuencias de cebadores de DNA con modificaciones de los métodos mostrados en estos Ejemplos está dentro del alcance de la invención. El amplicón, en el que al menos una molécula de cebador de DNA de longitud suficiente procedente de SEQ ID NO:21 y SEQ ID NO:22 que es indicativa de la presencia del evento DAS-59122-7, es una realización de la invención. El amplicón, en el que al menos un cebador de DNA de longitud suficiente procedente de cualquiera de los elementos genéticos de PHI17662A que es indicativo de la presencia del evento DAS-59122-7, es una realización de la invención. El ensayo del amplicón de DAS-59122-7 se puede realizar utilizando un Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin - Elmer 9700 o un termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient o por métodos y aparatos conocidos por los expertos en la técnica.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Pioneer Hi-Bred International, Inc. Dow AgroSciences LLC E. I. DuPont de Nemours & Co.

<120> EVENTO DAS-59122-7 DE MAÍZ Y MÉTODOS PARA SU DETECCIÓN

15 <130> 1895-PCT

<150> 60/614.225

<151> 29-09-2004

<160> 40

<170> FastSEQ for Windows Versión 4.0

20 <210> 1

<211> 28

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Cebador oligonucleótido

<400> 1

gtggctcctt caacgttgcg gttctgct 28

<210> 2

<211> 29

30 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleótido

<400> 2

35 cgtgcaagcg ctcaattcgc cctatagtg 29

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

40 <220>

<223> Cebador oligonucleótido

<400> 3

aattgagcgc ttgcacgttt 20

<210> 4

45 <211> 24

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleótido

	<400> 4 aacaacaaga ccggccacac cctc	24
5	<210> 5 <211> 25 <212> DNA <213> Secuencia Artificial <220> <223> Cebador oligonucleótido	
10	<400> 5 gaggtggtct ggatggtga ggtca	25
15	<210> 6 <211> 28 <212> DNA <213> Secuencia Artificial <220> <223> Cebador oligonucleótido	
20	<400> 6 tacaacctca agtggctcct cttccga	28
25	<210> 7 <211> 25 <212> DNA <213> Secuencia Artificial <220> <223> Cebador oligonucleótido	
30	<400> 7 gaggtctgga tctgcatgat gcgga	25
35	<210> 8 <211> 23 <212> DNA <213> Secuencia Artificial <220> <223> Cebador oligonucleótido	
40	<400> 8 aaccttagt atgtattgt att	23
45	<210> 9 <211> 26 <212> DNA <213> Secuencia Artificial <220> <223> Cebador oligonucleótido	
50	<400> 9 ctcctcaac gttgcggttc tgcag	26
	<210> 10 <211> 25 <212> DNA <213> Secuencia Artificial <220> <223> Cebador oligonucleótido	
50	<400> 10 tttgcaaag cgaacgattc agatg	25

	<210> 11	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador oligonucleótido	
	<400> 11	
	gcgggacaag ccgttttacg ttt	23
10	<210> 12	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador oligonucleótido	
15	<400> 12	
	gacgggtgat ttattgatc tgcac	25
20	<210> 13	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador oligonucleótido	
	<400> 13	
	catctgaatc gttcgcttg caaaa	25
25	<210> 14	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Cebador oligonucleótido	
	<400> 14	
	ctacgttcca atggagctcg actgc	26
35	<210> 15	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador oligonucleótido	
	<400> 15	
40	ggtcaagtgg aacttggtc actca	25
45	<210> 16	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador oligonucleótido	
	<400> 16	
	gagtgaagag ataagcaagt caaag	25
50	<210> 17	
	<211> 25	

ES 2 432 749 T3

<212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador oligonucleótido

5 <400> 17
 catgtatacg taagttggt gctgg 25

<210> 18
 <211> 25
 <212> DNA
 10 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador oligonucleótido

<400> 18
 aatccacaag attggagcaa acgac 25

15 <210> 19
 <211> 2593
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 20 <223> secuencia flanqueante en 5' de DAS 59122-7.

<400> 19

```

ctgagcgcac aacagcgcagt cgcattggcac cggacgacat gagcgcagatt tagatcggag 60
ggtgcggaca tggggcaacc tgccgagcta acgcagggat ccacacgacc accaacgaag 120
ccaagcccgg gcacgtcccc aggcagggtg ggccctgggt ccaccagcgg atgcatgcag 180
tgaagcgggg acggagagac aagccgaggg cgcgggtggg aatggcgtcc gggaggacga 240
gtggaggaga agaatctaga ggcatcgaga ttcgagaagc cgacggagac aagattcgtg 300
tggggggaga caaacgcggg ggctgagcgc cgttgatatg ggatcagacg gtgtggataa 360
aaaaagtgac gttgatagaa cgtctggcca gtgaaaaaac aaaacaactc caacaaaata 420
ctttaaagc tcttataccc taaatgtagg ggatcaaca cgtctctaca ctatttagca 480
gcgtcctcta aatgatcctc taaatttaga gaacgctact agattctcta tatatagttt 540
ctctaaacga tcttttatcc atttaaatac tttaaataac cggtttaaca aactaaaaat 600
atatacaata catttgagag tatgacaaat acgtatgtat aaaaataaaa aataaaataa 660
tgtattagtc tactttgaat cttcttttct tcataatata atgatgtata gctctcatgt 720
gcgttgagaa aaaagttaga gctagacgtt taatgtgtag tgacagtctt cgacgaaatc 780
tccctaata gaatgaattac tggaggttcc atcagaaagt cccctgaaa gaggcattta 840
tttagtttag tcagcaattt ctgggaacac aaatattctt ttgttatcac cactattaaa 900
  
```

ES 2 432 749 T3

```

aatctatggt tataacttat aataacatga aaaaataatt tagcatccca tatatataaa 960
aaçtgaagga agccatatat actaacataa gttaggagaa actaagaagg ttgtgcaaag 1020
cttgcaactgc tccaaaatac tgcaaacaac cactctcctc taccaaccaa agaaactcat 1080
gtactcctc cgttcttttt tatttgctgc attttagttt aaaaatgaac tagcagtcga 1140
caaatattcg agaacagata tagtatatac taacataact taggagatac taagaaagtt 1200
gçgçagagct ttcactgttc caaattactg caaagcctct cccctctgcc agtacatcta 1260
cgagatgttt cagttaaaca aagattcaga caagtgatga gccacttctt gtcatagatt 1320
gtgtggtcaa ccaaccatt gatgccacgg tttttgtgca tccatgcttt tgtattaaaa 1380
catcagttat gtttaccatg tccgatatgc tctacataat gacaatcaac ttggtgttca 1440
ttatatttac aatgtttagga atttcaatag ctacgaacac ttcaatagaa gtgcctttgt 1500
gggatcacct taatgtgttg ttgatgtaag gagaagaatc ttaatttact cttgctaaat 1560
ttgaactaca caaaaccact gcaactgagga ttgtcctaataa aaattactgc tcatacacgt 1620
tagcatctgt tcagatactg agctaataccc taggattaaa ggatttgtaa aagatatgcc 1680
caatcattca ttttagttat ttatttctta gttatccact tgaagattta catacatttg 1740
aaataaattt cttagaggta aagtgaaaat cagttattta aatacatttt agttatttat 1800
tttcttcttt ttcctaattt ttccttgtat ttgaagtctg aaaagataac tttgccctta 1860
tacatatttt atcttctacg tacgcatctg aacaacgtct ctttgtcccc tgatcgtgca 1920
gcaattagtg ctatgaatcg cgtttaagcg ctgcaaaatc atggctgggg cttcgtcctc 1980
gagtcgtcct gctgctcgat gtcacctcga gtcccgcacc gacctcagtg cttgttcttg 2040
ttggagccac ctctctcgga cgatcgccaa agacggataa ggccgaagcc gtcacttcag 2100
accgçgctca tgcgçcgtag cagaectcta catagcaggg ccagggtatg tggacctttg 2160
caagtttagg attggaacca gçgaccagaa tccacaagat tggagcaaac gaccaaaaat 2220
tcacaaggat tggcçgctga cattgccagc gçgggatcgc atgçggçggc ggçggçggg 2280
gçgagcagcg gagcagggca cagtcgagct ccattggaac gtagaaatac ttaagggcaa 2340
ggtctccaaa tacttgaaaa aataggaaaa agaagaaaat acatgaaatg atattgaaat 2400
caattggaag atgttatgaa tcttgttttt gcaaagcgaa cgattcagat ggcaaaaacta 2460
tgaatctttt tgtttgaagt cccaaatata aaattttctc gtactcacca acattggtgc 2520
gcacctgtga ttggctcata aaaattcttg gagggacgga agaaagagtg aagggataag 2580
caagtaaaag cgc 2593

```

<210> 20
 <211> 1986
 <212> DNA
 5 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia flanqueante en 3' de DAS 59122-7.

<400> 20

ES 2 432 749 T3

```

ttcccttcta tgggtcccggt tgtttatcct ctaaattata taatccagct taaataagtt 60
aagagacaaa caaacaacac agattattaa atagattatg taatctagat acctagatta 120
tgtaatccat aagtagaata tcaggtgctt atataatcta tgagctcgat tatataatct 180
taaaagaaaa caaacagagc ccctataaaa aggggtcaag tggacacttg gtcactcatt 240
taatccctcc ctctcctctt ttatccctct ttttgggtgta ttcaccaata gtgggtgtgca 300
cctgtgattg gctcgtaaaa attcttggac ggatggaaga gtgaagagat aagcaagtca 360
aagaaaagta acaacgaagc ttcatacagc acaaattttg gcccaactgg ttgcaccagc 420
accaaactta cgtatacatg attatctctg tttccctcat ttcgaagaaa aaaacgggtt 480
tcaaaaccca ctgctttcag gagtaaaaaa agataataat ctgaaacatt gcttccacct 540
tggcccttat ttggttacgt tgcaattcac cccaatccac atgtggattg agatggattg 600
cagtgtagct agacaaaacc ttaggccctg tttgcatagg aatacaccag gaattattcc 660
agctaataca aatttatata aatgagagaa acaattcgga taggaattgt tccaggactt 720
cattctgcag taaccgaacg gcccttaat ccacccaat acacgtggat tggagtggat 780
tgaggtacag ccaaacaagg cctaagtgca gatcaaataa atcacccgctc atattcttct 840
acctacaaaa acagcaataa acacctgaat gaagtcttaa tttgcacagt gtaggtagga 900
tgaaaatagt tacctcctca tggtcagtaa ctcttggcac acaacttcac atgtaatcga 960
tgtaccactt ggctcttgcc tgaaacccaa tacatcttta gcataagaat aatattatga 1020
tggcaaggca tgatcaccag cactccttta ttgtttagta agtctatcac tccccaaaac 1080
aattcaaatg aacagagatg cattgcccc aatgaattct atttcaatta gccggaaaat 1140
tctacttcat cagaagcatc caaattgcca gcacccctac tagactgacc atgaccaggc 1200
tgccgcagat gcctcttttt ctgtcctctc ctctttgctt tgagtttctc ttcaagatcc 1260
ctcaccaccac gtctcttata catcttaaag ctaacatgtc tctcctccgc catcttccca 1320
accttctcag taatctcagc agcaatctga cggttgtaca acttcttcag ccccttcctc 1380
aactttgcaa atgtgtcagg ctgtggcatc agtcctgcct cttagcatgtc taagcaatac 1440
aggcaggcct ccttgacatg tttcttcgca aacagtgcac gaatccagat agtccatgca 1500
ctcacattga gctcacagcc tttgctcaca atacatttcc aacatcctt tgcaagctca 1560
agtttctcat ctctgaccaa cgcattgagg aggtccttca gcaccccata ttgoggatcc 1620
acaaagagcc ccctcccaac catgtcttta aaataactac atgcctcaat cagcaaacc 1680
tgcccaacaa ggccactcac cacgatagca aatgtatcga ccacaggact gagcccagca 1740
ctttccatct cattccaaa tgatcatggct tgcttggctt cccaagcct gcaggccaac 1800
cgaatcacca cattgtatat cttgagatct ggtggacacc ggcactcccg cactctctcc 1860
atcagctcca agcactcctc aagctgctcc ttcttctcgt gtgctacaaa gaaacctatg 1920
tacacggcag cgtccaccgg caggccatcc ctgcacatag catccaagaa ctcgtacccc 1980
tgggat 1986

```

<210> 21

<211> 3594

5 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia que representa parte del inserto PHI17662A así como la secuencia flanqueante en 5' del inserto.

<400> 21

ES 2 432 749 T3

ctgagcgcac	aacagcggagt	cgcatggcac	cggacgacat	gagcggagatt	tagatcggag	60
ggtgcggaca	tggggcaacc	tgcgcagcta	acgcagggat	ccacacgacc	accaacgaa	120
ccaagcccgg	gcacgtcccc	aggcaggttg	ggccctgggt	ccaccagcgg	atgcatgcag	180
tgaagcgggg	acggagagac	aagccgaggg	cgcggggtggg	aatggcgtcc	gggaggacga	240
gtggaggaga	agaatctaga	ggcatcgaga	ttcgagaagc	cgacggagac	aagattcgtg	300
tggggggaga	caaaccgcgg	ggctgagcgc	cgttgatgatg	ggatcagacg	gtgtggataa	360
aaaaagtac	gttgatagaa	cgtctggcca	gtgaaaaaac	aaaacaactc	caacaaaata	420
ctttaaaagc	tcttataccc	taaatgtagg	ggatcaaaca	cgtctctaca	ctatntagca	480
gcgtcctcta	aatgatcctc	taaatttaga	gaacgctact	agatttctcta	tatatagttt	540
ctctaaacga	tcttttatcc	atlttaatac	tttaataaac	cggtttaaca	aaactaaaat	600
atatacaata	catttgagag	tatgacaaat	acgtatgtat	aaaaataaaa	aataaaaata	660
tgtattagtc	tactttgaat	cttcttttct	tcataatata	atgatgtata	gctctcatgt	720
gcggtgagaa	aaaagttaga	gctagacggt	taatgtgtag	tgacagtctt	cgacgaaatc	780
tccctaatag	gatgaattac	tggaggttcc	atcagaaagt	cccctgaaaa	gaggcattta	840
tttagtttag	tcagcaattt	ctgggaacac	aaatattctt	ttgttatcac	cactatttaa	900
aatctatggt	tataacttat	aataacatga	aaaaataatt	tagcatcca	tatatataaa	960
aactgaagga	agccatata	actaacataa	gtaggagaa	actaagaagg	ttgtgcaaag	1020
cttgcaactgc	tccaaaatac	tgcaaacac	cactctcctc	taccaacca	agaaactcat	1080
gtactccctc	cgttcttttt	tatttgctgc	atlttagttt	aaaaatgaac	tagcagtcga	1140
caaatattcg	agaacagata	tagtatatac	taacataact	taggagatac	taagaaagtt	1200
gocgagagct	ttcactgttc	caaattactg	caaagcctct	cccctctgcc	agtacatcta	1260
cgagatgttt	cagttaaaca	aagattcaga	caagtgatga	gccacttctt	gtcatagatt	1320
gtgtggtcaa	ccaaccatt	gatgccacgg	ttttgtgca	tccatgcttt	tgtattaaaa	1380
catcagttat	gtttaccatg	tccgatatgc	tctacataat	gacaatcaac	ttgggtgttca	1440
ttataatttac	aatgtagga	atltcaatag	ctacgaacac	ttcaatagaa	gtgccctttgt	1500
gggatcacct	taatgtgttg	ttgatgtaag	gagaagaatc	ttaatttact	cttgctaaaat	1560
ttgaactaca	caaaaccact	gcaactgagga	ttgtcctaata	aaattactgc	tcatcacactg	1620
tagcatctgt	tcagatactg	agctaataccc	taggattaaa	ggatttgtaa	aagatatgcc	1680
caatcattca	tttagttat	ttatltctta	gttatccact	tgaagattta	catacatttg	1740
aaataaaattt	cttagaggta	aagtgaaaaat	cagttattta	aatacatttt	agttatlttat	1800
tttcttcttt	ttcctaattt	ttccttgat	ttgaagtctg	aaaagataac	tttgccctta	1860
tacatatttt	atcttctacg	tacgcatctg	aacaacgtct	ctttgtcccc	tgatcgtgca	1920
gcaattagtg	ctatgaatcg	cgttttaagcg	ctgcaaaaatc	atggctgggg	cttcgtcctc	1980
gagtcgtcct	gctgctcgat	gtcacctcga	gtcccgcacc	gacctcagtg	cttgttcttg	2040
ttggagccac	ctctctcgga	cgatcgccaa	agacggataa	ggccgaagcc	gtcacttcag	2100
accgcgctca	tgcgccgtag	cagactccta	catagcaggg	ccaggggatg	tggacctttg	2160

ES 2 432 749 T3

```

caagttagg attggaacca gcgaccagaa tccacaagat tggagcaaac gaccaaaaat 2220
tcacaaggat tggcggctga cattgccagc gcgggatcgc atgcggcggc ggcggccggg 2280
gcgagcacgg gagcaggcga cagtgcagct ccattggaac gtagaaatac ttaagggcaa 2340
ggctccaaa tacttgaaaa aataggaaaa agaagaaaat acatgaaatg atattgaaat 2400
caattggaag atgttatgaa tcttgttttt gcaaagcgaa cgattcagat ggcaaaacta 2460
tgaatctttt tgtttgaagt cccaaatata aaatthttct gtactacca acattgggtc 2520
gcacctgtga ttggctcata aaaattcttg gagggacgga agaaagagtg aagggataag 2580
caagtaaaag cgctcaaca ctgatagttt aaactgaagg cgggaaacga caatctgatc 2640
atgagcggag aattaaggga gtcacgttat gacccccgcc gatgacgcgg gacaagccgt 2700
tttacgtttg gaactgacag aaccgcaacg ttgaaggagc cactcagcaa gcttactagt 2760
agcgcgtgtt aaacgcctct caactggaag agcggttacc cggaccgaag cttgcatgcc 2820
tgcagtgcag cgtgaccggg tctgtgcccc ctctagagat aatgagcatt gcatgtctaa 2880
gttataaaaa attaccacat atthtttttg tcacacttgt ttgaagtgca gtttatctat 2940
ctttatacat atatttaaac tttactctac gaataatata atctatagta ctacaataat 3000
atcagtgttt tagagaatca tataaatgaa cagttagaca tggctctaaag gacaattgag 3060
tattttgaca acaggactct acagthttat cthtttagtg tgcattgtgt ctctthttt 3120
tttgcaata gcttcaccta tataatactt catccatttt attagtacat ccatttaggg 3180
tttagggtta atggthttta tagactaatt thtttagtac atctatthta thctatthta 3240
gcctctaaat taagaaaact aaaactctat thtagthttt thatttaata atthtagata 3300
aaaatagaat aaaataaagt gactaaaaat taacaaaata cctthtaaga aathaaaaaa 3360
actaagaaa cattthttct gthtcgagta gataatgcca gcctgttaa gcctgcgac 3420
gagtctaacc gacaccaacc agcgaaccag cagcgtcgcg tgggccaag cgaagcagac 3480
ggcacggcat ctctgtcgtt gcctctggac cctctcgcg agtccgcct caccgttggg 3540
cttgctccgc tgtcggcatc cagaaattgc gtggcggagc ggagacgtg agcc 3594

```

<210> 22

<211> 2987

<212> DNA

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia que representa parte del inserto PHI17662A así como la secuencia flanqueante en 3' del inserto.

<400> 22

```

ctccggagag gagaccagtt gagattaggc cagctacagc agctgatatg gccgcggttt 60
gtgatatcgt taaccattac attgagacgt ctacagtga ctttaggaca gagccacaaa 120
caccacaaga gtggattgat gatctagaga ggttgcaaga tagataccct tggttgggtg 180
ctgaggttga ggggtttgtg gctggattg cttacgcctg gccctggaag gctaggaacg 240
cttacgattg gacagttgag agtactgtht acgtgtcaca taggcatcaa aggttgggcc 300
taggatccac attgtacaca catttgctta agtctatgga ggcgcaaggt thtaagtctg 360
tggttgctgt tataggcctt ccaaacgatc catctgttag gttgcatgag gctthgggat 420
acacagcccg ggttacattg cgcgcagctg gatacaagca tggtgatgg catgatgttg 480
gthtttgcca aagggattht gagttgccag ctctccaag gccagttagg ccagttacc 540
agatctgagt cgacctgcag gcatgcccgc tgaatcacc agtctctct tacaatcta 600
tctctctcta taataatgtg tgagtgttc ccagataagg gaattaggt tcttatagg 660
thtcgctcat gtgttgagca tataagaaac ctttagtatg tthttgtatt tgtaaaatac 720
thctatcaat aaaatthcta atthctaaaa caaaatcca gggcgagctc ggtaccggg 780
gatcctctag agtcgacctg caggcatgcc cgcggatct gatgggccc ggccgaagct 840
tcggtccggg ccacgtggc ctcttgctct tcaggatgaa gagctatgtt taaacgtgca 900
agcgtcaat tcgccctata gtgagtcgta ttacaatcgt acgcaattca gtacattaaa 960
aacgtccgca atgtgttatt aagttgtcta agcgtcaatt thctctctct atggthccgt 1020
thgtthtacc tctaaattat ataatccagc thaaataagt taagagaca acaacaaca 1080
cagattatta aatagattat gtaatctaga tacctagatt atgtaatcca taagtagaat 1140
atcaggtgct tatataatct atgagctcga thatataat thaaaagaaa acaaacagag 1200
cccctataaa aaggggtcaa gtggacactt ggtcactcat thaatccctc cctctctct 1260
thtatccctc thtttggtgt atthaccaat agtggtgtgc acctgtgatt ggctcgtaaa 1320
aattcttggg cggatggaag agtgaagaga taagcaagtc aaagaaaagt aacaacgaag 1380
cttcatcagc tacaattht ggcccaactg gthgcaccag caccaactt acgtatacat 1440

```

ES 2 432 749 T3

```

gattatctct gtttcctca tttcgaagaa aaaaacgggt ttcaaaacc actgctttca 1500
ggagtaaaaa aagataataa tctgaaacat tgcttcacc ttggccctta tttggttacg 1560
ttgcaattca cccaatcca catgtggatt gagatggatt gcagtgtagc tagacaaacc 1620
cttaggccct gtttgcatag gaatacacca ggaattattc cagctaatac aaatttatat 1680
aaatgagaga aacaattcgg ataggaattg ttccaggact tcattctgca gtaaccgaac 1740
ggccccttaa tccaccccaa tacacgtgga ttggagtgga ttgaggtaca gccaaacaag 1800
gcctaagtgc agatcaaata aatcacccgt catattcttc tacctacaaa aacagcaata 1860
aacacctgaa tgaagttcta atttgcacag tgtaggtagg atgaaaatag ttacctcctc 1920
atggtcagta actcttggca cacaacttca catgtaatcg atgtaccact tggctcttgc 1980
ctgaaacca atacatcttt agcataagaa taatattatg atggcaaggc atgatcacca 2040
gcactccttt attgtttagt aagtctatca ctccccaaaa caattcaaat gaacagagat 2100
gcattgcccc caatgaattc tatttcaatt agccggaaaa ttctacttca tcagaagcat 2160
ccaaattgcc agcatcccta ctagactgac catgaccagg ctgccgcaga tgctctttt 2220
tctgtcctct cctctttgcc ttgagtttct cttcaagatc cctcacccca cgtctcttat 2280
acatcttaaa gctaacatgt ctctcctccg ccatcttctt aaccttctca gtaatctcag 2340
cagcaatctg acggttgtag aacttcttca gcccttcat caactttgca aatgtgtcag 2400
gctgtggcat cagtcctgcc tctagcatgt ctaagcaata caggcaggcc tccttgacat 2460
gtttcttgcg aaacagtgca tgaatccaga tagtccatgc actcacattg agctcacagc 2520
ctttgtcac aatacatttc caaacatcct ttgcaagtc aagtttctca tctctgacca 2580
acgcattgag gaggtccttc agcaccccat attgcggtac cacaaagagc cccctcccaa 2640
ccatgtcttt aaaataacta catgcctcaa tcagcaaacc ctgccaaca aggccactca 2700
ccacgatagc aatgtatcg accacaggac tgagcccagc actttccatc tcattccaca 2760
atgtcatggc ttgcttggtc tccccaagcc tgcaggccaa ccgaatcacc acattgtata 2820
tcttgagatc tgggtggacac cggcactccc gcacctctc catcagctcc aagcactcct 2880
caagctgctc cttcttctcg tgtgctacaa agaaaccatg gtacacggca gcgtccaccc 2940
gcaggccatc cctcgacata gcatccaaga actcgtaccc ctgggat 2987

```

<210> 23

<211> 11922

<212> DNA

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia representa la secuencia completa del inserto y las regiones flanqueantes del evento DAS 59122-7.

<400> 23

ES 2 432 749 T3

```

ctgagcgcac aacagcgcagc cgcatggcac cggacgacat gagcgcagatt tagatcggag 60
ggtgcggaca tggggcaacc tgcgcagcta acgcagggat ccacacgacc accaacgaag 120
ccaagcccgg gcacgtcccc aggcagggtg ggccctgggt ccaccagcgg atgcatgcag 180
tgaagcgggg acggagagac aagccgaggg cgcgggtggg aatggcgtcc gggaggacga 240
gtggaggaga agaatctaga ggcacgcaga ttcgagaagc cgacggagac aagattcgtg 300
tggggggaga caaacccggg ggctgagcgc cgttgatatg ggatcagacg gtgtggataa 360
aaaaagtgac gttgatagaa cgtctggcca gtgaaaaaac aaaacaactc caacaaaata 420
ctttaaaagc tcttataacc taaatgtagg ggatcaaaca cgtctctaca ctatttagca 480
gcgtcctcta aatgatcctc taaatttaga gaacgctact agattctcta tatatagttt 540
ctctaaacga tcttttatcc atttaataac tttaaataac cggtttaaca aaactaaaat 600
atatacaata catttgagag tatgacaaat acgtatgtat aaaaataaaa aataaaaataa 660
tgtattagtc tactttgaat cttcttttct tcataatata atgatgtata gctctcatgt 720
gcgttgagaa aaaagttaga gctagacggt taatgtgtag tgacagtctt cgacgaaatc 780
tccctaataga gatgaattac tggaggttcc atcagaaagt cccctgaaaa gaggcattta 840
tttagtttag tcagcaattt ctgggaacac aaatattctt ttgttatcac cactattaaa 900
aatctatggt tataacttat aataacatga aaaaataatt tagcatccca tatatataaa 960
aactgaagga agccatatat actaacataa gttaggagaa actaagaagg ttgtgcaaag 1020
cttgactgct tccaaaatac tgcaaacaac cactctctc taccaccaa agaaactcat 1080
gtactccctc cgttcttttt tatttgctgc attttagttt aaaaatgaac tagcagtcga 1140
caaatattcg agaacagata tagtatatac taacataact taggagatac taagaaagtt 1200
gcgcagagct ttcactgttc caaattactg caaagcctct cccctctgcc agtacatcta 1260
cgagatgttt cagttaaaca aagattcaga caagtgatga gccacttctt gtcatagatt 1320
gtgtggtcaa ccaaccatt gatgccacgg tttttgtgca tccatgcttt tgtattaaaa 1380

```

catbagttat gtttaccatg tccgatatgc tctacataat gacaatcaac ttggtgttca 1440
 ttaatatttac aatgtagga atttcaatag ctacgaacac ttcaatagaa gtgaccttgt 1500
 gggatcacct taatgtggtg ttgatgtaag gagaagaatc ttaatttact cttgctaaat 1560
 ttgaactaca caaaaccact gcactgagga ttgtcctaataa aaattactgc tcatacacgt 1620
 tagcatctgt tcagatactg agctaataccc taggattaaa ggatttgtaa aagatatgcc 1680
 caatcattca ttttagttat ttatttctta gttatccact tgaagattta catacatttg 1740
 aaataaattt cttagaggta aagtgaanaat cagttattta aatacatttt agttattttat 1800
 tttcttcttt ttccctaattt ttcccttgat ttgaagtctg aaaagataac tttgccctta 1860
 tacatatttt atcttctacg taogcatctg aacaacgtct ctttgcctcc tgatcgtgca 1920
 gcaattagtg ctatgaatcg cgtttaagcg ctgcaaaatc atggctgggg cttcgtcctc 1980
 gagtgcctct gctgctcgat gtcacctoga gtcccgacc gacctcagtg cttgttcttg 2040
 ttggagccac ctctctcgga cgatcgccaa agacggataa ggccgaagcc gtcacttcag 2100
 accgcgctca tgcgcgtag cagactccta catagcaggg ccagggtatg tggacctttg 2160
 caagtttagg attggaacca gcgaccagaa tccacaagat tggagcaaac gaccaaaaat 2220
 tcacaaggat tggcggtgga cattgccagc gcgggatcgc atgcggcggc ggcgccggg 2280
 gcgagcacgg gagcaggcga cagtcgagct ccattggaac gtagaaatac ttaagggcaa 2340
 ggtctccaaa tacttgaaaa aataggaaaa agaagaaaat acatgaaatg atattgaaat 2400
 caattggaag atgttatgaa tcttgttttt gcaaagcgaa cgattcagat ggcaaaacta 2460
 tgaatctttt tgtttgaagt cccaaatata aaattttctc gtactcacca acattggtgc 2520
 gcacctgtga ttggctcata aaaattcttg gagggacgga agaaagagtg aagggataag 2580
 caagtaaaag cgctcaaaca ctgatagttt aaactgaagg cgggaaacga caatctgatc 2640
 atgagcggag aattaaggga gtcacgttat gacctccgcc gatgacgcg gacaagccgt 2700
 tttacgtttg gaactgacag aaccgcaacg ttgaaggagc cactcagcaa gttactagt 2760
 agcgtgttt aaacgctctt caactggaag agcggttacc cggaccgaag cttgcatgcc 2820
 tgcagtgcag cgtgaccggg tegtgcctct ctctagagat aatgagcatt gcatgtctaa 2880
 gttataaaaa attaccacat attttttttg tcacacttgt ttgaagtgca gtttatctat 2940
 ctttatacat atatttaaac tttactctac gaataatata atctatagta ctacaataat 3000
 atcagtgttt tagagaatca tataaatgaa cagttagaca tggctctaaag gacaattgag 3060
 tattttgaca acaggactct acagttttat ctttttagtg tgcattgtgt ctctttttt 3120
 tttgcaaaata gcttcaccta tataatactt catccatttt attagtacat ccatttaggg 3180
 tttagggtta atggttttta tagactaatt ttttagtac atctatttta ttctatttta 3240
 gcctctaaat taagaaaact aaaactctat tttagttttt ttatttaata atttagatat 3300
 aaaatagaat aaaataaagt gactaaaaat taacaaata ccctttaaga aattaaanaa 3360
 actaaggaaa catttttctt gtttcgagta gataatgcca gctgtttaa cgccgtcgac 3420
 gagtctaacg gacaccaacc agcgaaccag cagcgtcgcg tccggccaag cgaagcagac 3480
 ggcacggcat ctctgtcgtt gcctctggac ccctctcgag agttccgctc caccgttggg 3540
 cttgctccgc tgtcggcatc cagaaattgc gtggcggagc ggcagacgtg agccggcacg 3600
 gcaggcggcc tctcctcct ctcaaggcac cggcagctac gggggattcc tttcccaccg 3660
 ctctctcgtt tctcctcct cgcgcgcgt aataaataga cccccctcc acaccctctt 3720
 tccccaacct cgtgttggtc ggagcgcaca cacacacaac cagatctccc ccaaatccac 3780
 ccgtcggcac ctccgcttca aggtacggcg ctctgctctc ccccccccc ctctctacct 3840
 tctctagatc ggcgttccgg tccatgggta gggcccggtg gttctacttc tgttcatggt 3900
 tgtgttagat ccgtgtttgt gttagatccg tgcctgtagc gttcgtacac ggatgcgacc 3960
 tgtacgtcag aacggtctg attgctaact tgccagtgtt tctctttggg gaatcctggg 4020
 atggctctag ccgttccgca gacgggatcg atttcatgat tttttttggt tcgttgcata 4080
 gggtttggtt tgcccttttc ctttatttca atatatgccc tgcacttgtt tgcgggtca 4140
 tcttttcatg cttttttttg tcttggttgt gatgatgtgg tctgggtggg cggctgttct 4200
 agatcggagt agaattctgt ttcaaaactac ctgggtggatt tattaatttt ggatctgtat 4260
 gtgtgtgcca tacatattca tagttacgaa ttgaagatga tggatggaaa tatcgatcta 4320
 ggataggat acatgttgat gcgggtttta ctgatgcata tacagagatg ctttttggtc 4380
 gcttggttgt gatgatgtgg tgtgggtggg cggctgttca ttogttctag atcggagtag 4440
 aatactgttt caaactacct ggtgtattta ttaattttgg aactgtatgt gtgtgtcata 4500
 catcttcata gttacgagtt taagatggat ggaaatatcg atgtaggata ggtatacatg 4560
 ttgatgtggg ttttactgat gcatatacat gatggcatat gcagcatcta ttcatatgct 4620
 ctaaccttga gtacctatct attataataa acaagtatgt tttataatta tttgatctt 4680
 gatatacttg gatgatggca tatgcagcag ctatatgtgg attttttttag ccctgccttc 4740
 atacgctatt tatttgcttg gtactgtttc tttttctgat gctcaccctg ttgtttggtg 4800
 ttacttctgc agtgcactc tagaggatcc acacgacacc atgtccgccc gcgaggtgca 4860
 catcgacgtg aacaacaaga ccggccacac cctccagctg gaggacaaga ccaagctcga 4920
 cggcggcagg tggcgcaact ccccgaccaa cgtggccaac gaccagatca agacctctgt 4980
 ggccgaatcc aacggcttca tgaccggcac cgagggcacc atctactact caattaatgg 5040

ES 2 432 749 T3

cgaggccgag atcagcctct acttcgacaa cccgttcgcc ggctccaaca aatacgacgg 5100
 ccaactccaac aagtcccagt acgagatcat caccagggc ggctccggca accagtccca 5160
 cgtgacctac accatccaga ccacctctc ccgctacggc cacaagtctt gagtcatgag 5220
 tcatgagtca gttaacctag acttgccat cttctggatt ggccaactta attaatgtat 5280
 gaaataaaaag gatgcacaca tagtgacatg ctaatcacta taatgtgggc atcaaagttg 5340
 tgtgttatgt gtaattacta gttatctgaa taaaagagaa agagatcatc catatctctt 5400
 atcctaaatg aatgtcacgt gtctttataa ttctttgatg aaccagatgc atttcattaa 5460
 ccaaatccat atacatataa atattaatca tatataatta atatcaattg ggtagcaaa 5520
 acaaactctag tctaggtgtg ttttgcaat gggccggcg accgaattgg ggatctgcat 5580
 gaaagaaact gtgcactgc tgaaccgcac cttgtcactt tcatcgaaca cgacctgtgc 5640
 ccaagatgac ggtgctgagg tctaagttag gctgaattgc cttggacaga agcggactcc 5700
 ctacaattag ttaggccaaa cgggtcatcc atgtgtagct ccgggctcgg gctgtatcgc 5760
 catctgcaat agcatccatg gagctcgttc tagttagttg gagatgaacc aatgatcggg 5820
 cgtgtggacg tatgttctct gttactccga tagtagagta cgtgttagct ctttcatggg 5880
 gcaagtgaaa tttgtgttgg ttttaattacc cctacgttag ttgctggaca ggagacacat 5940
 catgaattta aaggcgatga tgtcctctcc tghtaatgta ttcttttgat gtgatgaatc 6000
 aaaatgtcat ataaaacatt tghtgtctct tagttaggcc tgatcgtaga acgaaatgct 6060
 cgtgtagcgg ggctacgagc ctatgacgca ataactctgg ttgcccggcc cggagtcgct 6120
 tgacaaaaaa aagcatgtta agtttattta caattcaaaa cctaacatat tatattccct 6180
 caaagcaggt tcacgatcac acctgtacct aaaaaaaca tgaagaatat attactccat 6240
 tattatgaga tgaaccactt ggcaagagt gtaagctata taaaaaatg aacattatta 6300
 cgagatgta tatgccatta tattgatctg aagatatatg tttctttctc ccacgggac 6360
 ctaacggata catgataagg ccaaggcaga tcacgggaaa ttattcgaat acatgttacg 6420
 ccctattgcc ggaaaaaaa tgcaaggcag gtgttggccg tagcgattta agcacttaag 6480
 ctggaggttg ccacacttgg atgcaagcgt ctgaccttc taaaacatcg gcggtttgt 6540
 ccgtatccgt atcccctatc cgacatctag ctggccacac gacggggctg ggcagatcgt 6600
 ggatgccggg tcgacgtcga tcgtcagcca tcatagacca atcgaccatc tgttatggat 6660
 gcttgctagc tagactagtc agacataaaa tttggatact ttctccaac tgggagacgg 6720
 ggactgatgt gcagctgcac gtgagctaaa tttttcccta taaatatgca tgaataactg 6780
 cattatcttg ccacagccac tgccacagcc agataacaag tgcagctggt agcacgcaac 6840
 gcatagctct ggactttag ctaggtagcc aaccggatcc acacgacacc atgctcgaca 6900
 ccaacaaggt gtacgagatc agcaaccag ccaacggcct ctacgccgc acctacctc 6960
 ccctcgacga ctccggcgtg tccctcatga acaagaacga cgacgacatc gacgactaca 7020
 acctcaagtg gttcctcttc ccgatcgac acgaccagta catcatcacc tcctacgccc 7080
 ccaacaactg caaggtgtgg aacgtgaaca acgacaagat taatgtgtca acctactcct 7140
 ccaccaactc catccagaag tggcagatca aggccaacgg ctctectac gtgatccagt 7200
 ccgacaacgg caagtgctc accgcccga cggccaggc cctggcctc atccgctca 7260
 ccgacagagc ctccaacaac ccgaaccga aatggaacct gacgtccgtg cagacctcc 7320
 agtcccgcga gaagccgatc atcgacacca agctcaagga ctaccggaag tactcccga 7380
 ccggcaacat cgacaacggc acctcccgc agctcatggg ctggaccctc gtgcccgtgca 7440
 tcatggtgaa cgacccgaac atcgacaaga acaccagat caagaccacc ccgtactaca 7500
 tctcaagaa gtaccagtac tggcagaggg ccgtgggctc caacgtcgcg ctccgcccgc 7560
 acgagaagaa gtccacacc tacgagtggg gcaccgagat cgaccagaag accaccatca 7620
 tcaacaccct cggcttccag atcaacatcg acagcggcat gaagttcgac atcccggagg 7680
 tgggcccggg taccgacgag atcaagacc agctcaacga ggagctcaag atcgagtatt 7740
 cacatgagac gaagatcatg gagaagtacc aggagcagtc cgagatcgac aaccgaccg 7800
 accagtccat gaactccatc ggcttctca ccatcaectc cctggagctc taccgctaca 7860
 acggctccga gatccgcac atgcagatcc agacctcga caacgacacc tacaacgtga 7920
 cctcctacc gaaccaccag caggccctgc tgtctgac caacctcc tacgaggagg 7980
 tggaggagat caccaacatc ccgaagtcca cctcaagaa gctcaagaag tactacttct 8040
 gagtcatgag tcatgagtca gttaacctca acttgccat cttctggatt ggccaactta 8100
 attaatgtat gaaataaaa tagtgacatg ctaatcacta taatgtgggc 8160
 atcaaagttg tgtgttatgt gtaattacta gttatctgaa taaaagagaa agagatcatc 8220
 catatctctt atcctaaatg aatgtcacgt gtctttataa ttctttgatg aaccagatgc 8280
 atttcattaa ccaaatccat atacatataa atattaatca tatataatta atatcaattg 8340
 ggtagcaaa acaaactctag tctaggtgtg ttttgcaat tccatggag tcaaagattc 8400
 aatagagga cctaacagaa ctgcgctaa agactggcga acagttcata cagagtctct 8460
 tacgactcaa tgacaagaag aaaatcttc tcaacatggt ggagcacgac acgcttgtct 8520
 actccaaaaa tatcaagat acagtctcag aagaccaaa ggcaattgag acttttcaac 8580
 aaagggtaat atccggaaac ctctcggat tccattgccc agctatctgt cactttattg 8640
 tgaagatagt ggaaaaggaa ggtggctcct acaaatgcca tcattgcgat aaaggaaagg 8700

ES 2 432 749 T3

ccatcggttga agatgcctct gccgacagtg gtcccaaaaga tggacccccca cccacgagga 8760
gcafcggtgga aaaagaagac gttccaacca cgtcttcaaa gcaagtggat tgatgtgata 8820
tctccactga cgtaagggat gacgcacaat cccactatcc ttcgcaagac ccttcctcta 8880
tataaggaag ttcatttcat ttggagagga cagggtaccc ggggatccac catgtctccg 8940
gagaggagac cagttgagat taggccagct acagcagctg atatggccgc ggtttgtgat 9000
atcgttaacc attacattga gacgtctaca gtgaacttta ggacagagcc acaaacacca 9060
caagagtgga ttgatgatct agagaggttg caagatagat acccttggtt ggttgctgag 9120
gttgaggttg ttgtggctgg tattgcttac gctgggccct ggaaggctag gaacgcttac 9180
gattggacag ttgagagtac tgtttacgtg tcacataggc atcaaagggt gggcctagga 9240
tccacattgt acacacattt gcttaagtct atggaggcgc aaggttttaa gtctgtgggt 9300
gctgttatag gccttccaaa cgatccatct gttaggttgc atgaggcttt gggatacaca 9360
gccccgggta cattgcgcgc agctggatac aagcatggtg gatggcatga tgttggtttt 9420
tggcaaaggg attttgagtt gccagctcct ccaaggccag ttaggccagt taccagatc 9480
tgagtgcacc tgcaggcatg cccgctgaaa tcaccagtct ctctctacaa atctatctct 9540
ctctataata atgtgtgagt agttcccaga taagggaatt agggttctta tagggtttcg 9600
ctcatgtgtt gagcatataa gaaaccctta gtatgtatit gtatitgtaa aatacttcta 9660
tcaataaaaat ttctaattcc taaaaccaaa atccagggcg agctcggtag ccggggatcc 9720
tctagagtcg acctgcaggc atgcccgcgg atatcgatgg gccccggccg aagcttcggt 9780
ccgggcatc gtggcctctt gctcttcagg atgaagagct atgtttaaac gtgcaagcgc 9840
tcaattcgcc ctatagttag tcgtattaca atcgtacgca attcagtaca ttaaaaaagc 9900
ccgcaatgtg ttattaagtt gtctaagcgt caatttttcc cttctatggt cccgtttgtt 9960
tatcctctaa attatataat ccagcttaa taagttaaga gacaaacaaa caacacagat 10020
tattaaatag attatgtaat ctagatacct agattatgta atccataagt agaatatcag 10080
gtgcttatat aatctatgag ctogattata taatcttaaa agaaaaacaaa cagagcccct 10140
ataaaaaggg gtcaagtgga cacttgggtca ctcatttaat ccctccctct cctcttttat 10200
ccctcttttt ggtgtattca ccaatagtgg tgtgcacctg tgattggctc gtaaaaaattc 10260
ttggacggat ggaagagtga agagataagc aagtcaaaga aaagtaacaa cgaagcttca 10320
tcagctacaa attttggccc aactggttgc accagacca aacttacgta tacatgatta 10380
tctctgtttc cctcatttcg aagaaaaaaa cgggtttcaa aaccactgc tttcaggagt 10440
aaaaaaagat aataatctga aacattgctt ccacttggc ccttatttgg ttactgtgca 10500
attcacccca atccacatgt ggattgagat ggattgcagt gtagctagac aaacccttag 10560
gcctgtttg cataggaata caccaggaat tattccagct aatcaaaatt tatataaatg 10620
agagaaacaa ttcggatagg aattgttcca ggacttcatt ctgcagtaac cgaacggccc 10680
cttaatccac cccaatacac gtggattgga gtggattgag gtacagcaa acaaggccta 10740
agtgcagatc aaataaatca cccgtcatat tcttctadct acaaaaaacag caataaacac 10800
ctgaatgaag ttctaatttg cacagtgtag gtaggatgaa aatagttacc tctcatggt 10860
cagtaactct tggcacacaa cttcacatgt aatcgatgta ccacttggct cttgcctgaa 10920
acccaataca tctttagcat aagaataata ttatgatggc aaggcatgat caccagcact 10980
cctttattgt ttagtaagtc tatcactccc caaaacaatt caaatgaaca gagatgcatt 11040
gcccccaatg aattctattt caattagccg gaaaattcta cttcatcaga agcatccaaa 11100
ttgccagcat ccctactaga ctgaccatga ccaggctgcc gcagatgcct ctttttctgt 11160
cctctcctct ttgccttgag tttctcttca agatccctca ccccacgtct cttatacatc 11220
ttaaagctaa catgtctctc ctccgccatc ttcttaacct tctcagtaat ctcagcagca 11280
atctgacggg tgtacaactt cttcagcccc ttcatcaact ttgcaaatgt gtcaggctgt 11340
ggcatcagtc ctgcctctag catgtctaag caatacaggc aggcctcctt gacatgtttc 11400
ttcgaaacaa gtgcatgaat ccagatagtc catgcactca cattgagctc acagcctttg 11460
ctcacaatac atttccaaac atcctttgca agctcaagtt tctcatctct gaccaacgca 11520
ttgaggaggt ccttcagcac cccatattgc ggtaccacaa agagccccct cccaaccatg 11580
tctttaaaat aactacatgc ctcaatcagc aaaccctgcc caacaaggcc actcaccagc 11640
atagcaaatg tatcgaccac aggactgagc ccagcacttt ccatctcatt ccacaatgtc 11700
atggcttget tggctcccc aagcctgacg gccaacggaa tcaccacatt gtatatcttg 11760
agatctggtg gacaccggca ctcccgcac ctctccatca gctccaagca ctctcaagc 11820
tgctccttct tctcgtgtgc tacaagaaa cctgggtaca cggcagcgtc caccgcagc 11880
ccatccctcg acatagcatc caagaactcg taccctggg at 11920

<210> 24
<211> 7390
<212> DNA
5 <213> Secuencia Artificial
<220>

<223> Esta secuencia representa la molécula DNA usada para transformar la línea de maíz DAS59122-7 y representa el inserto PHI 17662A.

<221> característica_misclánea

<222> (1)...(25)

5 <223> Borde derecho de T-DNA

<221> característica_misclánea

<222> (7366) ... (7390)

<223> Borde izquierdo de T-DNA

<400> 24

```

gtttaccgc caatatatcc tgtcaaacac tgatagtta aactgaaggc gggaaacgac 60
aatctgatca tgagcggaga attaagggag tcacgttatg acccccgccg atgacgcggg 120
acaagccggt ttacgtttgg aactgacaga accgcaacgt tgaaggagcc actcagcaag 180
cttactagta gcgctgttta aacgctcttc aactggaaga gcggttaccg ggaccgaagc 240
ttgcatgcct gcagtgcagc gtgaccgggt cgtgcccttc tctagagata atgagcattg 300
catgtctaag ttataaaaaa ttaccacata tttttttgt cacacttgtt tgaagtgcag 360
tttatctatc ttataacata tatttaaact ttactctacg aataatataa tctatagtac 420
tacaataata tcagtgtttt agagaatcat ataaatgaac agttagacat ggtctaaagg 480
acaattgagt attttgacaa caggactcta cagttttatc tttttagtgt gcatgtgttc 540
tccttttttt ttgcaaatag cttcacctat ataatacttc atccatttta ttagtacatc 600
catttagggt ttagggttaa tggtttttat agactaattt ttttagtaca tctattttat 660
tctattttag cctctaaatt aagaaaacta aaactctatt ttagtttttt tatttaataa 720
tttagatata aaatagaata aaataaagtg actaaaaatt aaacaaatac cttttaagaa 780
attaaaaaaa ctaaggaaac atttttcttg tttcgagttag ataatgccag cctgttaaagc 840
gccgtcgacg agtctaacgg acaccaacca gcgaaccagc agcgtcgcgt cgggccaagc 900
gaagcagacg gcacggcatc tctgtcgcgt cctctggacc cctctcgaga gttccgctcc 960
accgttggac ttgctccgct gtcggcatcc agaaattgcg tggcggagcg gcagacgtga 1020
gccggcacgg caggcggcct ctcctcctc tcacggcacc ggcagctacg ggggattcct 1080
ttcccaccgc tccttcgctt tcccttcctc gcccgccgta ataaatagac accccctcca 1140
cacctcttt ccccaacctc gtgtgttgc gagcgcacac acacacaacc agatctcccc 1200
caaattccacc cgtcggcacc tccgcttcaa ggtacgcgcg tcgtcctccc ccccccccc 1260
tctctacctt ctctagatcg gcgttccggt ccatggttag ggcccggtag ttctactct 1320
gttcatgttt gtgttagatc cgtgtttgtg ttagatccgt gctgctagcg ttogtacacg 1380
gatgcgacct gtacgtcaga cacgttctga ttgctaactt gccagtgttt ctctttgggg 1440
aatcctggga tggctctagc cgttccgcag acgggatcga tttcatgatt tttttgttt 1500
cgttgcatag ggtttggttt gcccttttcc tttatttcaa tatatgccgt gcaottgttt 1560
gtcgggtcat cttttcatgc tttttttgt cttggttgtg atgatgtggt ctggttgggc 1620
ggtcgttcta gatcggagta gaattctgtt tcaaactacc tgggtgattt attaattttg 1680
gatctgtatg tgtgtgccat acatattcat agttacgaat tgaagatgat ggatggaaat 1740
atcgatctag gataggtata catgttgatg cgggttttac tgatgcatat acagagatgc 1800
tttttgttcg cttggttgtg atgatgtggt gtggttgggc ggtcgttcat tcgttctaga 1860
tcggagtaga atactgtttc aaactacctg gtgtatztat taattttgga actgtatgtg 1920
tgtgtcatac atcttcatag ttacgagttt aagatggatg gaaatatcga tgtaggatag 1980
gtatacatgt tgatgtgggt tttactgatg catatacatg atggcatatg cagcatctat 2040
tcatatgctc taaccttgag tacctatcta ttataataaa caagtatgtt ttataattat 2100
tttgatcttg atataacttg atgatggcat atgcagcagc tatatgtgga tttttttagc 2160
cctgccttca tacgctattt atttgcttg tactgtttct tttgtcgatg ctccacctgt 2220
tgtttgggtg tacttctgca ggtcgactct agaggatcca cacgacacca tgtccgcccg 2280
cgaggtgcac atcgacgtga acaacaagac cggccacacc ctccagctgg aggacaagac 2340
caagctcgac ggcggcaggt ggcgcacctc cccgaccaac gtggccaacg accagatcaa 2400
gaccttcgtg gccgaatcca acggttcat gaccggcacc gagggacca tctactactc 2460
aattaatggc gaggccgaga tcagcctcta cttcgacaac ccgttcgccg gctccaacaa 2520
atacgacggc cactccaaca agtcccagta cgagatcatc acccaggcg gctccggcaa 2580
ccagtcccac gtgacctaca ccatccagac cacctcctcc cgctacggcc acaagtctg 2640
agtcatgagt catgagtcag ttaacctaga cttgtccatc ttctggattg gccaacttaa 2700
ttaatgtatg aaataaaaagg atgcacacat agtgacatgc taatcactat aatgtgggca 2760
tcaaagtgtg gtgttatgtg taattactag ttatctgaat aaaagagaaa gagatcatcc 2820
atatttctta tcctaaatga atgtcacgtg tctttataat tctttgatga accagatgca 2880

```

10

ES 2 432 749 T3

tttcattaac caaatccata tacatataaa tattaatcat atataattaa tatcaattgg 2940
 gtttagcaaaa caaatctagt ctagggtgtgt tttgccaagt cggccgcgga ccgaattggg 3000
 gatctgcatg aaagaaactg tcgcactgct gaaccgcacc ttgtcacttt catcgaacac 3060
 gacctgtgcc caagatgacg gtgctgcggt ctaagtgagg ctgaattgcc ttggacagaa 3120
 gcggaactccc tacaattagt taggccaaac ggtgcatcca tgtgtagctc cgggctcggg 3180
 ctgtatcgcc atctgcaata gcatccatgg agctcgttcc atgtagttgg agatgaacca 3240
 atgatcgggc gtgtggacgt atgttcctgt gtactccgat agtagagtac gtgttagctc 3300
 tttcatggtg caagtgaaat ttgtgttggg ttaattacc ctacgttagt tgcgggacag 3360
 gagacacatc atgaatttaa aggcgatgat gtcctctcct gtaatgttat tcttttgatg 3420
 tgatgaatca aaatgtcata taaaacattt gttgctcttt agttaggcct gatcgtagaa 3480
 cgaatgctc gtgtagcggg gctacgagcc tatgacgcaa taacactggt ttgccggccc 3540
 ggagtcgctt gacaaaaaaa agcatgttaa gtttatttac aattcaaaac ctaacatatt 3600
 atattccctc aaagcagggt cacgatcaca cctgtacct aaaaaaacat gaagaatata 3660
 ttactccatt attatgagat gaaccacttg gcaagagtgg taagctatat aaaaaaatga 3720
 acattattac gagatgttat atgccattat attgattcga agatataatgt ttctttctcc 3780
 cacgggcacc taacggatac atgataaggc caaggcagat cacgggaaat tattogaata 3840
 catgttacgc cctattgccg gaaaaaaaat gcagggcagg tgttggccgt agcgaattaa 3900
 gcacttaagc tggaggttgc cacacttggg tgaagcgtc tgacccttct aaaaaatcgg 3960
 cggctttgtc cgtatccgta tcccctatcc aacatctagc tggccacacg acggggctgg 4020
 gcagatcgtg gatgccgggt cgacgtcgat cgtcagccat catagaccaa tcgaccatct 4080
 gttatggatg cttgctagct agactagtca gacataaaat ttggatactt tctcccaact 4140
 gggagacggg gactgatgtg cagctgcacg tgagctaaat ttttccctat aaatatgcat 4200
 gaaatactgc attatcttgc cacagccact gccacagcca gataacaagt gcagctggta 4260
 gcacgcaacg catagctctg gacttgtagc taggtagcca accggatcca cacgacacca 4320
 tgctcgacac caacaagggt tacgagatca gcaaccacgc caacggcctc tacgccgcca 4380
 cctacctctc cctcgacgac tccggcgtgt ccctcatgaa caagaacgac gacgacatcg 4440
 acgactaca cctcaactgg ttctcttccc cgatcgacga cgaccagtac atcatcacct 4500
 cctacgccgc caacaactgc aagggtgtag acgtgaacaa cgacaagatt aatgtgtcaa 4560
 cctactctc caccaactcc atccagaagt ggcagatcaa ggccaacggc tctctctacg 4620
 tgatccagtc cgacaacggc aagggtgctc ccgcccggc acggccaggcc ctccggcctca 4680
 tccgctcac cgaogagtcc tccaacaacc cgaaccagca atggaacctg acgtccgtgc 4740
 agaccatcca gctcccgcag aagccgatca tcgacaccaa gctcaaggac taccggaagt 4800
 actccccgac cggcaacatc gacaacggca cctccccgca gctcatgggc tggaccctcg 4860
 tgccgtgcat catggtgaac gacccgaaca tcgacaagaa caccagatc aagaccacc 4920
 cgtactacat cctcaagaag taccagtact ggcagagggc cgtgggctcc aacgtcgcgc 4980
 tccgcccgca cgagaagaag tcttacacct acgagtgggg caccgagatc gaccagaaga 5040
 ccaccatcat caacaccctc ggcttccaga tcaacatcga cagcggcatg aagttcgaca 5100
 tccggagggt gggcggcggg accgacgaga tcaagaccca gctcaacgag gagctcaaga 5160
 tcgagtattc acatgacagc aagatcatg agaagtacca ggagcagtcc gagatcgaca 5220
 accgaccga ccagtcgatg aactccatcg gttcctcac catcacctcc ctggagctct 5280
 accgtacaa cggctccgag atccgcatca tgcagatcca gacctccgac aacgacacct 5340
 acaactgac ctctaccgc aaccaccagc aggccctgct gctgctgacc aaccactcct 5400
 acgaggagggt ggaggagatc accaacatcc cgaagtccac cctcaagaag ctcaagaagt 5460
 actacttctg agtcatgagt catgagtcag ttaacctaga cttgtccatc ttctggattg 5520
 gccacttaa ttaatgtatg aaataaaagg atgcacacat agtgacatgc taatcactat 5580
 aatgtgggca tcaaagttgt gtgttatgtg taattactag ttatctgaat aaaagagaaa 5640
 gagatcatcc atatttctta tcttaaatag atgtcacgtg tctttataat tctttgatga 5700
 accagatgca tttcattaac caaatccata tacatataaa tattaatcat atataattaa 5760
 tatcaattgg gttagcaaaa caaatctagt ctagggtgtgt tttgccaatt cccatggagt 5820
 caaagattca aatagaggac ctaacagaac tcgccgtaaa gactggcgaa cagttcatal 5880
 agagtctct acgactcaat gacaagaaga aaactctcgt caacatggtg gagcacgaca 5940
 cgcttctca ctccaaaaat atcaaagata cagtctcaga agaccaaagg gcaattgaga 6000
 cttttcaaca aagggttaata tccggaaacc tctcggatt ccattgccc gctatctgtc 6060
 actttattgt gaagatagt gaaaaggaa gttggctccta caaatgccat cattgcgata 6120
 aaggaaaggc catcgttgaa gatgcctctg ccgacagtgg tcccaaagat ggacccccac 6180
 ccacgaggag catcgtggaa aaagaagacg ttccaaccac gtcttcaaag caagtggatt 6240
 gatgtgatat ctccactgac gtaagggatg acgcacaatc ccactatcct tcgcaagacc 6300
 ctctctctat ataagggaagt tcatttcatt tggagaggac agggtaaccg gggatccacc 6360
 atgtctccgg agaggagacc agttgagatt aggccagcta cagcagctga tatggccgcg 6420
 gtttgtgata tcgttaacca ttacattgag acgtctacag tgaacttag gacagagcca 6480
 caaacaccac aagagtggat tgatgatcta gagaggttgc aagatagata cccttggttg 6540

ES 2 432 749 T3

g ttgctgagg ttgaggggtgt tgtggctggt attgcttacg ctgggccctg gaaggctagg 6600
aacgcttacg attggacagt tgagagtact gtttacgtgt cacataggca tcaaagggtg 6660
ggcctaggat ccacattgta cacacatttg cttaagtcta tggaggcgca aggttttaag 6720
tctgtggttg ctgttatagg ccttccaaac gatccatctg ttaggttgca tgaggctttg 6780
ggatacacag cccggggtac attgcgcgca gctggataca agcatggtgg atggcatgat 6840
g ttgggttttt ggcaaaggga ttttgagttg ccagctcctc caaggccagt taggccagtt 6900
accagatct gagtcgacct gcaggcatgc ccgctgaaat caccagtctc tctctacaaa 6960
tctatctctc tctataataa tgtgtgagta gttcccagat aagggaatta gggttcttat 7020
agggtttcgc tcatgtggtg agcatataag aaacccttag tatgtatttg tatttgtaaa 7080
atacttctat caataaaatt tctaattcct aaaaccaaaa tccagggcga gctcgggtacc 7140
cggggatcct ctagagtcga cctgcaggca tgcccgcgga tatcgatggg ccccgccga 7200
agcttcggtc cgggccatcg tggcctcttg ctcttcagga tgaagagcta tgtttaaacg 7260
tgcaagcgct caattcgccc tatagtgagt cgtattacaa tcgtacgcaa ttcagtacat 7320
taaaaacgtc cgcaatgtgt tattaagttg tctaagcgtc aatttgttta caccacaata 7380
t atcctgcca 7390

<210> 25

<211> 2501

<212> DNA

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón 221-1 de PCR

<400> 25

ES 2 432 749 T3

```

gcgggacaag ccgttttacg tttggaactg acagaaccgc aacggtgaag gagccactca 60
gcaagcttac tagtagcgct gtttaaaccg tcttcaactg gaagagcggg taccgggacc 120
gaagcttgca tgcctgcagt gcagcgtgac ccggtcgtgc ccctctctag agataatgag 180
cattgcatgt ctaagttata aaaaattacc acatattttt tttgtcacac ttgtttgaag 240
tgcagtttat ctatctttat acatataatt aaactttact ctacgaataa tataatctat 300
agtactacaa taatatcagt gttttagaga atcatataaa tgaacagtta gacatggctc 360
aaaggacaat tgagtatttt gacaacagga ctctacagtt ttatcttttt agtgtgcatg 420
tgttctcctt tttttttgca aatagcttca cctatataat acttcatcca ttttattagt 480
acatccattt agggtttagg gttaatgggt tttatagact aattttttta gtacatctat 540
tttattctat tttagcctct aaattaagaa aactaaaact ctattttagt ttttttattt 600
aataatttag atataaaata gaataaaata aagtgactaa aaattaaaca aatacccttt 660
aagaaattaa aaaaactaag gaaacatttt tcttgtttcg agtagataat gccagcctgt 720
taaacgccgt cgacgagctt aacggacacc aaccagcgaa ccagcagcgt cgcgtcgggc 780
caagcgaagc agacggcaag gcacatctgt cgctgcctct ggacccctct cgagagttcc 840
gctccaccgt tggacttgct ccgctgtcgg catccagaaa ttgctggtgg gagcggcaga 900
cgtgagccgg cacggcaggc ggccctcctc tctctcacg gcaccggcag ctacggggga 960
ttcctttccc accgctcctt cgctttccct tctctgcccg ccgtaataaa tagacacccc 1020
ctccacaccc tctttcccca acctcgtggt gttcggagcg cacacacaca caaccagatc 1080
tcccccaaat ccaccgcgtc gcacctccgc ttcaaggtag gccgctcgtc ctcccccccc 1140
ccccctctct accttctcta gatcggcggt ccggtccatg gttaggggccc ggtagttcta 1200
cttctgttca tgtttgtggt agatccgtgt ttgtgttaga tccgtgctgc tagcgttctg 1260
acacggatgc gacctgtacg tcagacacgt tctgattgct aacttgccag tgtttctctt 1320
tggggaatcc tgggatggct ctagccgttc cgcgacggg atcgatttca tgattttttt 1380
tgtttcgttg catagggttt ggtttgccct tttcctttat ttcaatatat gccgtgcact 1440
tgtttgtcgg gtcacttttt catgcttttt tttgtcttgg ttgtgatgat gtggtctggt 1500
tgggcggtcg ttctagatcg gagtagaatt ctgtttcaaa ctacctggtg gatttattaa 1560
ttttggatct gtatgtgtgt gccatacata ttcatagtta cgaattgaag atgatggatg 1620
gaaatatcga tctaggatag gtatacatgt tgatgcgggt tttactgatg catatacaga 1680
gatgcttttt gttcgcttgg ttgtgatgat gtggtgtggt tgggcggtcg ttcattcgtt 1740
ctagatcgga gtagaatact gtttcaaact acctgggtgta tttattaatt ttggaactgt 1800
atgtgtgtgt catacatctt catagttacg agtttaagat ggatggaaat atcgatgtag 1860
gataggata catgttgatg tgggttttac tgatgcatat acatgatggc atatgcagca 1920
tctattcata tgctctaacc ttgagtacct atctattata ataaacaagt atgttttata 1980
attattttga tcttgatata cttggatgat ggcatatgca gcagctatat gtggattttt 2040
ttagccctgc cttcatacgc tatttatttg cttgggtactg tttcttttgt cgatgctcac 2100
cctgttgttt ggtgttactt ctgcaggctg actctagagg atccacacga caccatgtcc 2160
gcccgcgagg tgcacatcga cgtgaacaac aagaccggcc acaccctcca gctggaggac 2220

```

```

aagadcaagc tcgacggcgg caggtggcgc acctccccga ccaacgtggc caacgaccag 2280
atcaagacct tcgtggccga atccaacggc ttcatgaccg gcaccgaggg caccatctac 2340
tactoaatta atggcgaggc cgagatcagc ctctacttgc acaaccggtt cgccggctcc 2400
aacaataacg acggccactc caacaagtcc cagtacgaga tcatcaccca gggcggctcc 2460
ggcaaccagt cccacgtgac ctacaccatc cagaccacct c 2501

```

<210> 26

<211> 3027

5 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón 221-2 de PCR.

<400> 26

ES 2 432 749 T3

aacaacaaga ccggccacac cctccagctg gaggacaaga ccaagctcga cggcggcagg 60
tggcgcacct ccccgaccaa cgtggccaac gaccagatca agaccttcgt ggccgaatcc 120
aacggcttca tgaccggcac cgagggcacc atctactact caattaatgg cgaggccgag 180
atcagcctct acttcgacaa cccgttcgcc ggctccaaca aatagcagcg ccaactccaac 240
aagtcccagt acgagatcat caccagggc ggctccggca accagtccca cgtgacctac 300
accatccaga ccacctcctc ccgctacggc cacaagtcct gagtcatgag tcatgagtca 360
gtaaacctag acttgccat ctctggatt ggccaactta ataatgtat gaaataaaag 420
gatgcacaca tagtgacatg ctaatcacta taatgtgggc atcaaagttg tgtgttatgt 480
gtaattacta gttatctgaa taaaagagaa agagatcatc catatttctt atcctaaatg 540
aatgtcacgt gtctttataa ttctttgatg aaccagatgc atttcattaa ccaaatccat 600
atacatataa atattaatca tatataatta atatcaattg ggtagcaaaa acaaactctag 660
tctaggtgtg ttttgcgaaat gcggccgagg accgaattgg ggatctgcat gaaagaaact 720
gtcgcactgc tgaaccgcac cttgtcactt tcatcgaaca cgacctgtgc ccaagatgac 780
gggtgctgagg tctaagttag gctgaattgc cttggacaga agcggactcc ctacaattag 840
ttaggcaaaa cgggtgcatcc atgtgtagct ccgggctcgg gctgtatcgc catctgcaat 900
agcatccatg gagctcgttc catgtagtgt gagatgaacc aatgatcggg cgtgtggacg 960
tatgttctctg tgtactccga tagtagagta cgtgttagct ctttcatggt gcaagtgaaa 1020
tttgtgttg ttttaattacc cctacgtag ttgctgggaca ggagacacat catgaattta 1080
aaggcgatga tgtcctctcc tgtaatgtta ttctttgat gtgatgaatc aaaatgtcat 1140
ataaaacatt tgttgctctt tagttaggcc tgatcgtaga acgaaatgct cgtgtagcgg 1200
ggctacgagc ctatgacgca ataacactgg tttgcgggcc cggagtcgct tgacaaaaaa 1260
aagcatgta agtttattta caattcaaaa ttaacatat tatattccct caaagcaggt 1320
tcacgatcac acctgtacct aaaaaaaca tgaagaatat attactccat tattatgaga 1380
tgaaccactt ggcaagagtg gtaagctata taaaaaatg aacattatta cgagatgta 1440
tatgccatta tattgattcg aagatatatg tttctttctc ccacgggcac ctaacggata 1500
catgataagg ccaaggcaga tcacgggaaa ttattcgaat acatgttacg ccctattgcc 1560
ggaaaaaaa tgcagggcag gtgttggccg tagcgattta agcacttaag ctggaggttg 1620
ccacacttgg atgcaagcgt ctgacccttc taaaacatcg gcggctttgt ccgatccgt 1680
atcccctatc cgacatctag ctggccacac gacggggctg ggagatcgt ggatgccggg 1740
tcgacgtcga tcgtcagcca tcatagacca atcgaccatc tgttatggat gcttgctagc 1800
tagactagtc agacataaaa tttggatact ttctccaac tgggagacgg ggactgatgt 1860
gcagctgcac gtgagctaaa tttttcccta taaatatgca tgaataactg cattatcttg 1920
ccacagccac tgccacagcc agataacaag tgcagctggt agcacgcaac gcatagctct 1980
ggacttgtag ctaggtagcc aaccggatcc acacgacacc atgctcgaca ccaacaaggt 2040
gtacggatc agcaaccacg ccaacggcct ctacgcccgc acctacctct cctcgcaga 2100
ctccggcgtg tccctcatga acaagaacga cgacgacatc gacgactaca acctcaagt 2160
gttctctctc ccgatcgacg acgaccagta catcatcacc tctacgccc ccaacaactg 2220
caaggtgtgg aacgtgaaca acgacaagat taatgtgtca acctactcct ccaccaactc 2280
catccagaag tggcagatca aggccaacgg ctctctctac gtgatccagt ccgacaacgg 2340
caaggtgtct accgccggca ccggccaggc cctcggcctc atccgcctca ccgacgagtc 2400
ctccaacaac ccgaaccagc aatggaacct gacgtccgtg cagaccatcc agctcccga 2460
gaagccgatc atcgacacca agctcaagga ctaccggaag tactccccga ccggcaacat 2520
cgacaacggc acctccccgc agctcatggg ctggaccctc gtgccgtgca tcatggtgaa 2580
cgaccggaac atcgacaaga acaccagat caagaccacc ccgtactaca tcctcaagaa 2640
gtaccagtac tggcagaggg ccgtgggctc caacgtcgcg ctccgcccgc acgagaagaa 2700
gtcctacacc tacgagtggg gcaccgagat cgaccagaag accaccatca tcaacacct 2760

cggcttccag atcaacatcg acagcggcat gaagttcgac atcccggagg tgggcggcgg 2820
taccgacgag atcaagacc agctcaacga ggagctcaag atcgagtatt cacatgagac 2880
gaagatcatg gagaagtacc aggagcagtc cgagatcgac aaccgaccg accagtccat 2940
gaactccatc ggcttctca ccatcacctc cctggagctc taccgctaca acggctccga 3000
gatccgcac atgcagatcc agacctc 3027

<210> 27

<211> 2830

5 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón 221-3 de PCR.

<400> 27

ES 2 432 749 T3

tacaacctca	agtggttcct	cttcccgatc	gacgacgacc	agtacatcat	cacctcctac	60
gccgccaaca	actgcaaggt	gtggaacgtg	aacaacgaca	agattaatgt	gtcaaoctac	120
tcctccacca	actccatcca	gaagtggcag	atcaaggcca	acggctcctc	ctacgtgatc	180
cagtccgaca	acggcaaggt	gctcaccgcc	ggcaccggcc	aggccctcgg	cctcatccgc	240
ctcaccgacg	agtcctccaa	caaccggaac	cagcaatgga	acctgacgtc	cgtgcagacc	300
atccagctcc	cgcagaagcc	gatcatcgac	accaagctca	aggactaccc	gaagtactcc	360
ccgaccggca	acatcgacaa	cggcacctcc	ccgcagctca	tgggctggac	cctcgtgccc	420
tgcatacatg	tgaacgaccc	gaacatcgac	aagaacaccc	agatcaagac	caccccgtac	480
tacatcctca	agaagtacca	gtactggcag	agggccgtgg	gctccaacgt	cgcgctccgc	540
ccgcacgaga	agaagtccta	cacctacgag	tggggcaccg	agatcgacca	gaagaccacc	600
atcatcaaca	ccctcggctt	ccagatcaac	atcgacagcg	gcatgaagtt	cgacatcccg	660
gaggtgggcg	cgggtaccga	cgagatcaag	accagctca	acgaggagct	caagatcgag	720
tattcacatg	agacgaagat	catggagaag	taccaggagc	agtccgagat	cgacaacccc	780
accgaccagt	ccatgaactc	catcggcttc	ctcaccatca	cctccctgga	gctctaccgc	840
tacaacggct	ccgagatccg	catcatgcag	atccagacct	ccgacaacga	cacctacaac	900
gtgacctcct	accgaaacca	ccagcaggcc	ctgctgctgc	tgaccaacca	ctcctacgag	960
gaggtggagg	agatcaccaa	catcccgaag	tccaccctca	agaagctcaa	gaagtactac	1020
ttctgagtca	tgagtcatga	gtcagttaac	ctagacttgt	ccatcttctg	gattggccaa	1080
cttaattaat	gtatgaaata	aaaggatgca	cacatagtga	catgctaata	actataatgt	1140
gggcatcaaa	gttgtgtgtt	atgtgtaatt	actagttatc	tgaataaaag	agaaagagat	1200
catccatatt	tcttatccta	aatgaatgtc	acgtgtcttt	ataattcttt	gatgaaccag	1260
atgcatttca	ttaaccaa	ccatatacat	ataaatatta	atcatatata	attaatatca	1320
attgggttag	caaaacaaat	ctagtctag	tgtgttttgc	gaattcccat	ggagtcaaag	1380
attcaaatag	aggacctaac	agaactcgcc	ttaagactg	gcgaacagtt	catacagagt	1440
ctcttacgac	tcaatgacaa	gaagaaaatc	ttcgtcaaca	tgggtggagca	cgacacgctt	1500
gtctactcca	aaaatatcaa	agatacagtc	tcagaagacc	aaagggcaat	tgagactttt	1560
caacaaaggg	taatatccgg	aaacctcctc	ggattccatt	gccagctat	ctgtcacttt	1620
attgtgaaga	tagtggaaaa	ggaaggtggc	tcctacaaat	gccatcattg	cgataaagga	1680
aaggccatcg	ttgaagatgc	ctctgccgac	agtggctcca	aagatggacc	cccaccacg	1740
aggagcatcg	tggaaaaaga	agacgttcca	accacgtctt	caaagcaagt	ggattgatgt	1800
gatatctcca	ctgacgtaag	ggatgacgca	caatcccact	atccttcgca	agacccttcc	1860
tctatataag	gaagttcatt	tcatttggag	aggacagggt	accgggggat	ccaccatgtc	1920
tccggagagg	agaccagttg	agattaggcc	agctacagca	gctgatatgg	ccgcggtttg	1980
tgatatcggt	aaccattaca	ttgagacgtc	tacagtgaac	tttaggacag	agccacaaac	2040
accacaagag	tggattgatg	atctagagag	gttgcaagat	agataccctt	ggttggttgc	2100
tgaggttgag	ggtgttgtgg	ctggtattgc	ttacgctggg	ccctggaagg	ctaggaacgc	2160
ttacgattgg	acagttgaga	gtactgttta	cgtgtcacat	aggcatcaaa	ggttgggcct	2220
aggatccaca	ttgtacacac	atltgcttaa	gtctatggag	gcgcaagggt	ttaagtctgt	2280
ggttgcgtgt	ataggccttc	caaacgatcc	atctgttagg	ttgcatgagg	ctttgggata	2340
cacagcccgg	ggtacattgc	gcgcagctgg	atacaagcat	ggtggatggc	atgatgttgg	2400
tttttggcaa	agggattttg	agttgccagc	tcctccaagg	ccagttaggc	cagttacca	2460
gatctgagtc	gacctgcagg	catgcccget	gaaatcacca	gtctctctct	acaaatctat	2520
ctctctctat	aataatgtgt	gagtagttcc	cagataaggg	aattagggtt	cttatagggt	2580
ttcgctcatg	tgttgagcat	ataagaaacc	cttagtatgt	atltgtatlt	gtaaaatact	2640
tctatcaata	aaatttctaa	ttcctaaaac	caaaatccag	ggcgagctcg	gtacccgggg	2700
atcctctaga	gtcgacctgc	aggcatgccc	gcggatatcg	atgggccccg	gccgaagctt	2760
cggtccgggc	catcgtggcc	tcttgcctct	caggatgaag	agctatgttt	aaacgtgcaa	2820
gcgctcaatt						2830

<210> 28

<211> 136

5 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón 0784/0564 de PCR

<400> 28

ES 2 432 749 T3

aatccacaag attggagcaa acgaccaaaa attcacaagg attggcggct gacattgcca 60
 gcgcgggatc gcatgcggcg gcggcggccg gggcgagcac gggagcaggc gacagtcgag 120
 ctccattgga acgtag 136

<210> 29
 <211> 263
 <212> DNA
 5 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Amplicón 0784/0543 de PCR

<400> 29

aatccacaag attggagcaa acgaccaaaa attcacaagg attggcggct gacattgcca 60
 gcgcgggatc gcatgcggcg gcggcggccg gggcgagcac gggagcaggc gacagtcgag 120
 ctccattgga acgtagaaat acttaagggc aaggctctcca aatacttgaa aaaataggaa 180
 aaagaagaaa atacatgaaa tgatattgaa atcaattgga agatgttatg aatcttgttt 240
 ttgcaaagcg aacgattcag atg 263

10 <210> 30
 <211> 227
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 15 <223> Amplicón 0569/0577 de PCR

<400> 30

ggtcaagtgg acacttggtc actcatttaa tccctccctc tcctctttta tccctctttt 60
 tgggtgtattc accaatagtg gtgtgcacct gtgattggct cgtaaaaatt cttggacgga 120
 tgggaagagtg aagagataag caagtcaaag aaaagtaaca acgaagcttc atcagctaca 180
 aatthttggcc caactggttg caccagcacc aaacttacgt atacatg 227

20 <210> 31
 <211> 492
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Amplicón 0570/0542 de PCR

<400> 31

gagtgaagag ataagcaagt caaagaaaag taacaacgaa gcttcatcag ctacaaattt 60
 tggcccaact ggttgcacca gcaccaaact tacgtataca tgattatctc tgtttccctc 120
 atttogaaga aaaaaacggg tttcaaaaacc cactgctttc aggagtaaaa aaagataata 180
 atctgaaaca ttgcttccac cttggccctt atttggttac gttgcaattc accccaatcc 240
 acatgtggat tgagatggat tgcagtgtag ctagacaaac ccttaggccc tgtttgcata 300
 ggaatacacc aggaattatt ccagctaatac aaaatttata taaatgagag aaacaattcg 360
 25 gataggaatt gttccaggac ttcattctgc agtaaccgaa cggcccctta atccacccca 420

atacacgtgg attggagtgg attgaggtac agcceaacaa ggcctaagtg cagatcaaat 480
 aatcaccocg tc 492

30 <210> 32
 <211> 555
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Amplicón 0784/0215 de PCR

<400> 32

ES 2 432 749 T3

```

aatccacaag attggagcaa acgaccaaaa attcacaagg attggcggct gacattgcca 60
gcgcggggatc gcatgcgggc gcgggcgccg gggcgagcac gggagcaggc gacagtcgag 120
ctccattgga acgtagaaat acttaagggc aaggtctcca aatacttgaa aaaataggaa 180
aaagaagaaa atacatgaaa tgatattgaa atcaattgga agatgttatg aatcttgttt 240
ttgcaaagcg aacgattcag atggcaaaac tatgaatctt tttgtttgaa gtcccaaata 300
taaaattttc tcgtactcac caacattggt gcgcacctgt gattggctca taaaaattct 360
tggaggggacg gaagaaagag tgaagggata agcaagtaaa agcgcctcaa cactgatagt 420
ttaaactgaa ggcgggaaac gacaatctga tcatgagcgg agaattaagg gagtcacggt 480
atgacccccg ccgatgacgc gggacaagcc gttttacgtt tggaactgac agaaccgcaa 540
cgttgaagga gccac 555

```

<210> 33

<211> 547

<212> DNA

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón 0219/0577 de PCR

<400> 33

```

cgtgcaagcg ctcaattcgc cctatagtga gtcgtattac aatcgtacgc aattcagtac 60
attaaaaacg tccgcaatgt gttattaagt tgtctaagcg tcaatttttc ccttctatgg 120
tcccgtttgt ttatcctcta aattatataa tccagcttaa ataagttaag agacaaacaa 180
acaacacaga ttattaaata gattatgtaa tctagatacc tagattatgt aatccataag 240
tagaatatca ggtgcttata taatctatga gctcgattat ataatcttaa aagaaaacaa 300
acagagcccc tataaaaagg ggtcaagtgg acacttggtc actcatttaa tccctccctc 360
tcctctttta tccctctttt tgggtgattc accaatagtg gtgtgcacct gtgattggct 420
cgtaaaaatt cttggacgga tggagagtg aagagataag caagtcaaag aaaagtaaca 480
acgaagcttc atcagctaca aattttggcc caactggtt caccagcacc aaacttacgt 540
atacatg 547

```

10 <210> 34

<211> 243

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Amplicón 0506/0476 de PCR

<400> 34

```

tctcgtactc accaacattg gtgcgcacct gtgattggct cataaaaatt cttggagggg 60
cggaagaaag agtgaagggg taagcaagta aaagcgctca aacactgata gtttaaactg 120
aaggcgggaa acgacaatct gatcatgagc ggagaattaa gggagtcacg ttatgacccc 180
cgccgatgac gcgggacaag ccgttttacg tttggaactg acagaaccgc aacgttgaag 240
gag 243

```

<210> 35

<211> 754

20 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón 0447/0577 de PCR

<400> 35

ES 2 432 749 T3

```

aacccttagt atgtatattgt atttgtaaaa tacttctatc aataaaaatt ctaattccta 60
aaacccaaaat ccagggcgag ctcggtaccg ggggatcctc tagagtcgac ctgcaggcat 120
gcccgcggat atogatgggc cccggccgaa gcttcgggtcc gggccatcgt ggcctcttgc 180
tcttcaggat gaagagctat gtttaaactg gcaagcgctc aattcgccct atagtgagtc 240
gtattacaat cgtacgcaat tcagtacatt aaaaacgtcc gcaatgtgtt attaagttgt 300
ctaagcgtca atttttccct tctatggtcc cgtttgttta tcctctaaat tatataatcc 360
agcttaaata agttaagaga caaacaaca acacagatta ttaaatagat tatgtaatct 420
agatacctag attatgtaat ccataagtag aatatcaggt gcttatataa tctatgagct 480
cgattatata atcttaaaag aaaacaaca gagcccctat aaaaaggggt caagtggaca 540
cttggtcact catttaaatcc ctccctctcc tcttttatcc ctcttttttg tgtattcacc 600
aatagtggtg tgcacctgtg attggctcgt aaaaattctt ggacggatgg aagagtgaag 660
agataagcaa gtcaaagaaa agtaacaacg aagcttcatc agctacaaat tttggcccaa 720
ctggttgac cagcaccaaa cttacgtata catg 754

```

<210> 36

<211> 25

<212> DNA

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleótido

<400> 36

cgattacaa tcgtacgcaa ttcag 25

10 <210> 37

<211> 25

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Cebador oligonucleótido

<400> 37

ggataaaca acgggacat agaag 25

<210> 38

<211> 104

20 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Amplicón de la SEQ ID NOS: 36 y 37

<400> 38

25 cgattacaa tcgtacgcaa ttcagtacat taaaacgtc cgcaatgtgt tattaagttg 60
tctaagcgtc aatttttccc ttctatggtc cgtttgttt atcc 104

<210> 39

<211> 25

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Cebador IVR1 (0197) usado para generar un amplicón 226 bp como un control positivo interno

<400> 39

ccgctgtatc acaagggtg gtacc 25

<210> 40

35 <211> 25

<212> DNA

ES 2 432 749 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador IVR2 (0198) usado para general un amplicón 226 bp como un control positivo interno

<400> 40

5 ggagcccgtg tagagcatga cgatc

25

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de DNA aislada que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de:
 - (a) la secuencia de nucleótidos descrita en la SEQ ID NO:23;
 - (b) la secuencia de nucleótidos descrita en la SEQ ID NO:21; y
 - 5 (c) la secuencia de nucleótidos descrita en la SEQ ID NO:22.
2. Un kit para identificar el evento DAS-59122-7 en una muestra biológica que detecta una región específica de DAS-59122-7, comprendiendo dicho kit al menos un primer cebador, que reconoce una secuencia dentro de la SEQ ID NO:19 o dentro de la SEQ ID NO:20, y que comprende además al menos un segundo cebador que reconoce una secuencia de nucleótidos dentro de la secuencia SEQ ID NO:24 .
- 10 3. El kit de la reivindicación 2, en donde dichos al menos primero y segundo cebadores, respectivamente, comprenden un par de secuencias seleccionadas de:
 - (a) las secuencias SEQ ID NO:18 y SEQ ID NO:1;
 - (b) las secuencias SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:9;
 - (c) las secuencias SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:17;
 - 15 (d) las secuencias SEQ ID NO:8 y SEQ ID NO:17; y
 - (e) las secuencias SEQ ID NO:36 y SEQ ID NO:37.
4. Un kit de detección de DNA específico para el DNA de unión del evento DAS-59122-7 de maíz y su progenie, que comprende al menos una molécula de DNA de una longitud suficiente de polinucleótidos de DNA contiguos para funcionar en un método de detección de DNA, en donde dicha molécula de DNA se hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con una secuencia de DNA de unión del evento DAS-59122-7 de maíz, abarcando dicha secuencia de unión la unión entre el DNA heterólogo insertado en el genoma y el DNA flanqueante, y no se hibrida en dichas condiciones de hibridación rigurosas con un DNA de planta de maíz que no es DAS-59122-7 y dicha molécula de DNA es homóloga o complementaria de una secuencia seleccionada de:
 - (a) la secuencia de nucleótidos descrita en la SEQ ID NO:21; y
 - 25 (b) la secuencia de nucleótidos descrita en la SEQ ID NO:22.
5. Un método para identificar el evento DAS-59122-7 en una muestra biológica, que comprende detectar una región específica de DAS-59122-7 por amplificación de un fragmento de DNA de un ácido nucleico presente en dicha muestra biológica usando una reacción en cadena de la polimerasa con al menos dos cebadores, en donde un primer cebador reconoce una secuencia dentro de la SEQ ID NO:19 o la SEQ ID NO:20, y un segundo cebador reconoce una secuencia dentro de la SEQ ID NO:24.
- 30 6. El método de la reivindicación 5, en donde dichos primero y segundo cebadores comprenden las secuencias SEQ ID NO:18 y SEQ ID NO:1, respectivamente.
7. El método de la reivindicación 5, en donde dichos primero y segundo cebadores comprenden las secuencias SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:9, respectivamente.
- 35 8. El método de la reivindicación 5, en donde dichos primero y segundo cebadores comprenden las secuencias SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:17, respectivamente.
9. El método de la reivindicación 5, en donde dichos primero y segundo cebadores comprenden las secuencias SEQ ID NO:8 y SEQ ID NO:17, respectivamente.
- 40 10. El método de la reivindicación 5, en donde dichos primero y segundo cebadores comprenden las secuencias SEQ ID NO:36 y la SEQ ID NO:37, respectivamente .
11. Un método para detectar la presencia del evento DAS-59122-7 de maíz o su progenie en una muestra biológica, que comprende:
 - (a) extraer una muestra de DNA de dicha muestra biológica;
 - (b) proporcionar un par de moléculas de cebadores de DNA seleccionado de:
 - 45 (i) las secuencias SEQ ID NO:18 y SEQ ID NO:1;

- (ii) las secuencias SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:9;
 - (iii) las secuencias SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:17; y
 - (iv) las secuencias SEQ ID NO:8 y SEQ ID NO:17;
- (c) proporcionar condiciones de reacción de amplificación del DNA;
- 5 (d) realizar dicha reacción de amplificación de DNA, produciendo con ello una molécula de amplicón de DNA; y
- (e) detectar dicha molécula de amplicón de DNA, en donde la detección de dicha molécula de amplicón de DNA en dicha reacción de amplificación de DNA indica la presencia del evento DAS-59122-7 de maíz.
12. Una molécula de DNA aislada que comprende uno cualquiera de los amplicones producidos por el método de la reivindicación 11.
- 10 13. Un método para detectar la presencia de DNA correspondiente al evento DAS-59122-7 en una muestra, comprendiendo el método:
- (a) poner en contacto la muestra que comprende DNA de maíz con una sonda de polinucleótidos que se hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con DNA de unión del evento DAS-59122-7 de maíz, dicho DNA de unión la unión entre el DNA heterólogo insertado en el genoma y el DNA flanqueante, y no se hibrida bajo dichas
 - 15 condiciones de hibridación rigurosas con un DNA de planta de maíz que no es DAS-59122-7 y dicha sonda es de una longitud suficiente de nucleótidos contiguos homólogos o complementarios de una secuencia seleccionada de:
 - (i) la secuencia de nucleótidos descrita en la SEQ ID NO:21; y
 - (ii) la secuencia de nucleótidos descrita en la SEQ ID NO:22;
- 20 (b) someter la muestra y la sonda a condiciones de hibridación rigurosas; y
- (c) detectar la hibridación de la sonda con el DNA de unión, en donde la detección de la hibridación indica la presencia del evento DAS-5912-7.
14. Un par de moléculas de DNA que comprende: una primera molécula de DNA y una segunda molécula de DNA, en donde las moléculas de DNA tienen una longitud suficiente de nucleótidos contiguos de una secuencia
- 25 seleccionada de:
- (a) la secuencia descrita en la SEQ ID NO:21 o su complemento; y
 - (b) la secuencia descrita en la SEQ ID NO:22 o su complemento;
- en donde el par de moléculas de DNA es capaz de amplificar, en una reacción en cadena de la polimerasa, un amplicón que comprende una región específica de DAS-59122-7 procedente del evento DAS-59122-7 de maíz y su
- 30 progenie, en donde dicha región específica de DAS-59122-7 comprende al menos una secuencia de unión dentro de la SEQ ID NO:23, y dicha secuencia de unión abarca la unión entre el DNA heterólogo insertado en el genoma y el DNA flanqueante.
15. Un par de moléculas de DNA de la reivindicación 14, en donde cada molécula de DNA es un cebador que comprende una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO:2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 36
- 35 y 37 o sus complementos.
16. Un par de moléculas de DNA de la reivindicación 15, en donde cada cebador comprende una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO:2, 8, 9, 10, 17 y 18 o sus complementos.
17. Una molécula de DNA aislada que comprende una secuencia de unión que comprende una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO:32, 33, 34 y 35 y sus complementos.
- 40 18. Un método para confirmar la pureza de semillas, que comprende la detección de una región específica de DAS-59122-7 con un cebador o sonda específico que se hibrida específicamente en condiciones de hibridación rigurosas con una secuencia de unión dentro de la SEQ ID NO:21 o la SEQ ID NO:22, abarcando dicha secuencia de unión la unión entre el DNA heterólogo insertado en el genoma y el DNA flanqueante o su complemento, en una muestra de semillas, y no se hibrida en dichas condiciones de hibridación rigurosas con el DNA de una planta de maíz que no es
- 45 no DAS-59122-7.
19. Un método para cribar semillas para detectar la presencia del evento DAS-59122-7, que comprende la detección de una región específica de DAS-59122-7 con un cebador o sonda específico que se hibrida específicamente en

condiciones de hibridación rigurosas con una secuencia de unión dentro de la SEQ ID NO:21 o la SEQ ID NO:22, abarcando dicha secuencia de unión la unión entre el DNA heterólogo insertado en el genoma y el DNA flanqueante o su complemento, en una muestra de un lote de semillas, y no se hibrida en dichas condiciones de hibridación rigurosas con el DNA de una planta que no es DAS-59122-7.

- 5 20. Una planta de maíz resistente a los insectos, en donde el DNA que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:23 forma parte del genoma de la planta.
21. Una planta descendiente de la planta de maíz resistente a los insectos de la reivindicación 20, en donde el DNA que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:23, forma parte del genoma de la planta.
22. Semilla de una planta de la reivindicación 20 o 21, en donde dicha semilla comprende la SEQ ID NO:23.
- 10 23. Un método para detectar la presencia de la inserción del evento DAS-59122-7 en el tejido de maíz que comprende:
- (a) seleccionar un par de cebadores comprendiendo cada uno AL menos diez nucleótidos de la SEQ ID NO:21 o la SEQ ID NO:22, en donde cada miembro del par está en lados opuestos de una secuencia indicativa de la presencia de dicha inserción del evento DAS-59122-7, comprendiendo dicha secuencia al menos una secuencia de unión de DAS-59122-7;
- 15 (b) poner en contacto una muestra de dicho tejido de maíz con dicho par de cebadores; y
- (c) realizar la amplificación del DNA y analizar los amplicones.
24. El método de la reivindicación 23, en donde cada cebador de dicho par se selecciona de las SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 30, 36 y 37 o sus complementos.
- 20 25. Un método para detectar la presencia de la inserción del evento DAS-59122-7 en el tejido de maíz, que comprende:
- (a) poner en contacto una muestra de dicho tejido de maíz con una sonda de polinucleótidos que se hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con una o más secuencias de DNA seleccionadas de las SEQ ID NO:32, 33, 34 y 35 y sus complementos, en donde la sonda se hibrida específicamente con una región dentro de la región flanqueante en 5' o 3' del evento DAS-59122-7 y también comprende una parte del DNA extraño contiguo a dicha región;
- 25 (b) someter dichas muestra y sonda a condiciones de hibridación rigurosas; y
- (c) analizar la hibridación de la sonda .
- 30 26. Un kit de detección de DNA que comprende una sonda de polinucleótidos que se hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con una o más secuencias de DNA seleccionadas de las SEQ ID NO:32, 33, 34 y 35 y sus complementos, y en donde la sonda se hibrida específicamente con una región dentro de la región flanqueante en 5' o 3' del evento DAS-59122-7 y comprende también una parte del DNA extraño contiguo a dicha región.
- 35 27. Un kit de detección de DNA que comprende un par de cebadores, comprendiendo cada cebador al menos 10 nucleótidos dentro de la SEQ ID NO:21 y la SEQ ID NO:22, en donde cada cebador está en los lados opuestos de una secuencia indicativa de la presencia de la inserción del evento DAS-59122-7, comprendiendo dicha secuencia al menos una secuencia de unión de DAS-59122-7, abarcando dicha secuencia de unión la unión entre el DNA heterólogo insertado en el genoma y el DNA flanqueante.
28. El kit de detección de DNA de la reivindicación 27, en donde cada cebador de dicho par se selecciona de las SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 36 y 37 y sus complementos.

Figura 1

1 CTGAGCGCAC AACAGCGAGT CGCATGGCAC CGGACGACAT GAGCGAGATT
 51 TAGATCGGAG GGTGCGGACA TGGGGCAACC TGCGCAGCTA ACGCAGGGAT
 101 CCACACGACC ACCAACGAAG CCAAGCCCGG GCACGTCCCC AGGCAGGTTG
 151 GGCCCTGGTT CCACCAGCGG ATGCATGCAG TGAAGCGGGG ACGGAGAGAC
 201 AAGCCGAGGG CGCGGGTGGG AATGGCGTCC GGGAGGACGA GTGGAGGAGA
 251 AGAATCTAGA GGCATCGAGA TTCGAGAAGC CGACGGAGAC AAGATTTCGTG
 301 TGGGGGGAGA CAAACCGCGG GGCTGAGCGC CGTTGATATG GGATCAGACG
 351 GTGTGGATAA AAAAAGTGAC GTTGATAGAA CGTCTGGCCA GTGAAAAAAC
 401 AAAACAACTC CAACAAAATA CTTTAAAAGC TCTTATACCC TAAATGTAGG
 451 GGATCAAACA CGTCTCTACA CTATTTAGCA GCGTCTCTA AATGATCCTC
 501 TAAATTTAGA GAACGCTACT AGATTCTCTA TATATAGTTT CTCTAAACGA
 551 TCTTTTATCC ATTTAAATAC TTTAAATAAC CGGTTTAAACA AAACATAAAT
 601 ATATACAATA CATTGAGAG TATGACAAAT ACGTATGTAT AAAAATAAAA
 651 AATAAAATAA TGTATTAGTC TACTTTGAAT CTTCTTTTCT TCATAATATA
 701 ATGATGTATA GCTCTCATGT GCGTTGAGAA AAAAGTTAGA GCTAGACGTT
 751 TAATGTGTAG TGACAGTCTT CGACGAAATC TCCCTAATGA GATGAATTAC
 801 TGGAGGTTCC ATCAGAAAGT CCCCTGAAA GAGGCATTTA TTTAGTTTGG
 851 TCAGCAATTT CTGGGAACAC AAATATTCTT TTGTTATCAC CACTATTA
 901 AATCTATGGT TATAACTTAT AATAACATGA AAAAAATAATT TAGCATCCCA
 951 TATATATAAA AACTGAAGGA AGCCATATAT ACTAACATAA GTTAGGAGAA
 1001 ACTAAGAAGG TTGTGCAAAG CTGCACTGC TCCAAAATAC TGCAAAACAC
 1051 CACTCTCCTC TACCAACCAA AGAAACTCAT GTACTCCCTC CGTTCTTTTT
 1101 TATTTGTGCG ATTTTAGTTT AAAAATGAAC TAGCAGTCGA CAAATATTCG
 1151 AGAACAGATA TAGTATATC TAACATAACT TAGGAGATAC TAAGAAGTTT
 1201 GCGCAGAGCT TTCACTGTTT CAAATFACTG CAAAGCCTCT CCCCTCTGCC
 1251 AGTACATCTA CGAGATGTTT CAGTTAAACA AAGATTCAGA CAAGTGATGA
 1301 GCCACTTCTT GTCATAGATT GTGTGGTCAA CCAACCCATT GATGCCACGG
 1351 TTTTGTGCA TCCATGCTTT TGTATTAATA CATCAGTTAT GTTTACCATG
 1401 TCCGATATGC TCTACATAAT GACAATCAAC TTGGTGTTCA TTATATTTAC
 1451 AATGTTAGGA ATTTCAATAG CTACGAACAC TTCAATAGAA GTGCCTTTGT
 1501 GGGATCACCT TAATGTGTTG TTGATGTAAG GAGAAGAATC TTAATTTACT
 1551 CTTGCTAAAT TTGAACTACA CAAAACCACT GCACTGAGGA TTGTCCATA
 1601 AAATTACTGC TCATACACGT TAGCATCTGT TCAGATACTG AGCTAATCCC
 1651 TAGGATTAATA GGATTGTAA AAGATATGCC CAATCATTCA TTTTAGTTAT
 1701 TTATTTCTTA GTATCCACT TGAAGATTTA CATACATTTG AAATAAATTT
 1751 CTTAGAGGTA AAGTGAATA CAGTTATTTA AATACATTTT AGTTATTTAT
 1801 TTTCTTCTT TTCCTAATTT TTCCTGTAT TTGAAGTCTG AAAAGATAAC
 1851 TTTGCCCTTA TACATATTT ATCTTCTACG TACGCATCTG AACCAAGTCT
 1901 CTTTGTCCCC TGATCGTGCA GCAATTAGTG CTATGAATCG CGTTTAAAGCG
 1951 CTGCAAAATC ATGGCTGGGG CTTCGTCTC GAGTCGTCTT GCTGCTCGAT
 2001 GTCACCTCGA GTCCCGCACC GACCTCAGTG CTTGTCTTG TTGGAGCCAC
 2051 CTCTCTCGGA CGATCGCCAA AGACGGATAA GGCCGAAGCC GTCACTTCAG
 2101 ACCGCGCTCA TCGCGCGTAG CAGACTCCTA CATAGCAGGG CCAGGGTATG
 2151 TGGACCTTTG CAAGTTTAGG ATTGGAACCA GCGACCAGAA TCCACAAGAT
 2201 TGGAGCAAAC GACCAAAAAT TCACAAGGAT TGGCGGCTGA CATTGCCAGC
 2251 GCGGGATCGC ATGCGGCGGC GCGGCGGG GCGAGCACGG GAGCAGGCGA
 2301 CAGTCGAGCT CCATTGGAAC GTAGAAATAC TTAAGGGCAA GGTCTCCAAA
 2351 TACTTGAAA AATAGGAAA AGAAGAAAAT ACATGAAATG ATATTGAAAT
 2401 CAATTGGAAG ATGTTATGAA TCTTGTTTT GCAAAGCGAA CGATTAGAT
 2451 GGCAAACTA TGAATCTTT TGTGTAAGT CCCAAATATA AAATTTCTC
 2501 GTACTACCA ACATTGGTGC GCACCTGTGA TTGGCTCATA AAAATTTCTG
 2551 GAGGGACGGA AGAAAGAGTG AAGGGATAAG CAAGTAAAAG CGCTCAAACA
 2601 CTGATAGTTT AACTGAAGG CGGAAACGA CAATCTGATC ATGAGCGGAG
 2651 AATTAAGGGA GTCACGTTAT GACCCCGCC GATGACGCGG GACAAGCCGT
 2701 TTTACGTTT GAACTGACAG AACCGCAACG TTGAAGGAGC CACTCAGCAA
 2751 GCTTACTAGT AGCGCTGTT AAACGCTCTT CAACTGGAAG AGCGGTTACC
 2801 CGGACCGAAG CTTGCATGCC TGCAGTGCAG CGTGACCCGG TCGTGCCCT
 2851 CTCTAGAGAT AATGAGCATT GCATGTCTAA GTTATAAAAA ATTACCACAT
 2901 ATTTTTTTT TCACACTTGT TTGAAGTGCA GTTATCTAT CTTTATACAT
 2951 ATATTTAAAC TTTACTCTAC GAATAATATA ATCTATAGTA CTACAATAAT

Figura 1 continuación

3001	ATCAGTGT	TAGAGAATCA	TATAAATGAA	CAGTTAGACA	TGGTCTAAAG
3051	GACAATTGAG	TATTTTGACA	ACAGGACTCT	ACAGTTTTAT	CTTTTTAGTG
3101	TGCATGTGTT	CTCCTTTTTT	TTTGAAAATA	GCTTCACCTA	TATAATACTT
3151	CATCCATTTT	ATTAGTACAT	CCATTTAGGG	TTTAGGGTTA	ATGGTTTTTA
3201	TAGACTAATT	TTTTTAGTAC	ATCTATTTTA	TTCTATTTTA	GCCTCTAAAT
3251	TAAGAAAAC	AAAACCTAT	TTTAGTTTTT	TTATTTAATA	ATTTAGATAT
3301	AAAATAGAAT	AAAATAAAGT	GACTAAAAAT	TAAACAAATA	CCCTTTAAGA
3351	AATTAAAAAA	ACTAAGGAAA	CATTTTCTT	GTTTCGAGTA	GATAATGCCA
3401	GCCTGTAAA	CGCCGTCGAC	GAGTCTAACG	GACACCAACC	AGCGAACCAG
3451	CAGCGTCGCG	TCGGGCCAAG	CGAAGCAGAC	GGCACGGCAT	CTCTGTCGCT
3501	GCCTCTGGAC	CCCTCTCGAG	AGTTCGGCTC	CACCGTTGGA	CTTGCTCCGC
3551	TGTCGGCATC	CAGAAATTGC	GTGGCGGAGC	GGCAGACGTG	AGCCGGCAGC
3601	GCAGGCGGCC	TCCTCCTCCT	CTCACGGCAC	CGGCAGCTAC	GCGGGCTTCC
3651	TTTCCCACCG	CTCCTTCGCT	TTCCCTTCCT	CGCCCGCCGT	AATAAATAGA
3701	CACCCCTCC	ACACCCTCTT	TCCCAACCT	CGTGTGTTC	GGAGCGCACA
3751	CACACACAAC	CAGATCTCCC	CCAAATCCAC	CCGTCGGCAC	CTCCGCTTCA
3801	AGGTACGCCG	CTCGTCCTCC	CCCCCCCCC	CTCTCTACCT	TCTCTAGATC
3851	GGCGTCCGG	TCCATGGTTA	GGGCCCGGTA	GTTCTACTTC	TGTTTCATGTT
3901	TGTGTTAGAT	CCGTGTTTGT	GTTAGATCCG	TGCTGCTAGC	GTTCGTACAC
3951	GGATGCGACC	TGTACGTCAG	ACACGTTCTG	ATTGCTAACT	TGCCAGTGT
4001	TCTCTTTGGG	GAATCCTGGG	ATGGCTCTAG	CCGTTCCGCA	GACGGGATCG
4051	ATTTTCATGAT	TTTTTTTGT	TCGTTGCATA	GGGTTTGGTT	TGCCCTTTTC
4101	CTTTATTTCA	ATATATGCCG	TGCACTGTGTT	TGTCGGGTCA	TCTTTTCATG
4151	CTTTTTTTTG	TCTTGGTTGT	GATGATGTGG	TCTGGTTGGG	CGGTGCTTCT
4201	AGATCGGAGT	AGAATCTGT	TTCAAACCTAC	CTGGTGGATT	TATTAATTTT
4251	GGATCTGTAT	GTGTGTGCCA	TACATATTCA	TAGTTACGAA	TGAAGATGA
4301	TGGATGGAAA	TATCGATCTA	GGATAGGTAT	ACATGTTGAT	GCGGGTTTTA
4351	CTGATGCATA	TACAGAGATG	CTTTTGTTC	GCTTGGTTGT	GATGATGTGG
4401	TGTGGTTGGG	CGGTCGTTCA	TTGCTTCTAG	ATCGGAGTAG	AATACTGTTT
4451	CAAACCTACCT	GGTGTATTTA	TTAATTTTGG	AACTGTATGT	GTGTGTCATA
4501	CATCTTCATA	GTTACGAGTT	TAAGATGGAT	GGAAATATCG	ATGTAGGATA
4551	GGTATACATG	TTGATGTGGG	TTTTACTGAT	GCATATACAT	GATGGCATAT
4601	GCAGCATCTA	TTCATATGCT	CTAACCTTGA	GTACCTATCT	ATTATAATAA
4651	ACAAGTATGT	TTTATAATTA	TTTTGATCTT	GATATACTTG	GATGATGGCA
4701	TATGCAGCAG	CTATATGTGG	ATTTTTTTAG	CCCTGCCTTC	ATACGCTATT
4751	TATTTGCTTG	GTACTGTTTC	TTTTGTCGAT	GCTCACCTTG	TTGTTTGGTG
4801	TTACTTCTGC	AGGTCGACTC	TAGAGGATCC	ACACGACACC	ATGTCCGCC
4851	GCGAGGTGCA	CATCGACGTG	AACAACAAGA	CCGGCCACAC	CCTCCAGCTG
4901	GAGGACAAGA	CCAAGCTCGA	CGGCGGCAGG	TGGCGCACCT	CCCCGACCAA
4951	CGTGGCCAAC	GACCAGATCA	AGACCTTCGT	GGCCGAATCC	AACCGCTTCA
5001	TGACCGGCAC	CGAGGGCACC	ATCTACTACT	CAATTAATGG	CGAGGCCGAG
5051	ATCAGCCTCT	ACTTCGACAA	CCCGTTCGCC	GGCTCCAACA	AATACGACGG
5101	CCACTCCAAC	AAGTCCAGT	ACGAGATCAT	CACCCAGGGC	GGCTCCGGCA
5151	ACCAGTCCCA	CGTGACCTAC	ACCATCCAGA	CCACCTCCTC	CCGCTACGGC
5201	CACAAGTCCT	GAGTCATGAG	TCATGAGTCA	GTTAACCTAG	ACTTGTCCAT
5251	CTTCTGGATT	GGCCAACCTA	ATTAATGTAT	GAAATAAAAG	GATGCACACA
5301	TAGTGACATG	CTAATCACTA	TAATGTGGGC	ATCAAAGTTG	TGTGTTATGT
5351	GTAATTAATA	GTTATCTGAA	TAAAAGAGAA	AGAGATCATC	CATATTTCTT
5401	ATCCTAAATG	AATGTCACGT	GTCTTTATAA	TTCTTTGATG	AACCAGATGC
5451	ATTTTCATTAA	CCAAATCCAT	ATACATATAA	ATATTAATCA	TATATAATTA
5501	ATATCAATTG	GGTTAGCAAA	ACAAATCTAG	TCTAGGTGTG	TTTTGCGAAT
5551	GCGGCCGCGG	ACCGAATTGG	GGATCTGCAT	GAAAGAAACT	GTCGCACTGC
5601	TGAACCGCAC	CTTGTCACTT	TCATCGAACA	CGACCTGTGC	CCAAGATGAC
5651	GGTGTGCGG	TCTAAGTGAG	GCTGAATTGC	CTTGACAGAG	AGCCGACTCC
5701	CTACAATTAG	TTAGGCCAAA	CGGTGCATCC	ATGTGTAGCT	CCGGGCTCGG
5751	GCTGTATCGC	CATCTGCAAT	AGCATCCATG	GAGCTCGTTC	CATGTAGTTG
5801	GAGATGAACC	AATGATCGGG	CGTGTGGACG	TATGTTCCCTG	TGTACTCCGA
5851	TAGTAGAGTA	CGTGTAGCT	CTTTCATGGT	GCAAGTGAAA	TTGTGTTGG
5901	TTTAATTACC	CCTACGTTAG	TTGCGGGACA	GGAGACACAT	CATGAATTTA
5951	AAGGCGATGA	TGTCCTCTCC	TGTAATGTTA	TTCTTTTGAT	GTGATGAATC
6001	AAAATGTCAT	ATAAAACATT	TGTTGCTCTT	TAGTTAGGCC	TGATCGTAGA
6051	ACGAAATGCT	CGTGTAGCGG	GGCTACGAGC	CTATGACGCA	ATAACACTGG

Figura 1 continuación

6101	TTTGCCGGCC	CGGAGTCGCT	TGACAAAAAA	AAGCATGTTA	AGTTTATTTA
6151	CAATTCAAAA	CCTAACATAT	TATATTCCTT	CAAAGCAGGT	TCACGATCAC
6201	ACCTGTACCT	AAAAAAAACA	TGAAGAATAT	ATTACTCCAT	TATATGAGA
6251	TGAACCACTT	GGCAAGAGTG	GTAAGCTATA	TAAAAAATG	AACATTATTA
6301	CGAGATGTTA	TATGCCATTA	TATTGATTCG	AAGATATATG	TTCTTTCTC
6351	CCACGGGCAC	CTAACGGATA	CATGATAAGG	CCAAGGCAGA	TCACGGGAAA
6401	TTATTGCAAT	ACATGTTACG	CCCTATTGCC	GGAAAAAAA	TGCAGGGCAG
6451	GTGTTGGCCG	TAGCGATTTA	AGCACTTAAG	CTGGAGGTTG	CCACACTTGG
6501	ATGCAAGCGT	CTGACCCTTC	TAAAAACATCG	GCGGCTTTGT	CCGTATCCGT
6551	ATCCCCCTATC	CGACATCTAG	CTGGCCACAC	GACGGGGCTG	GGCAGATCGT
6601	GGATGCCGGG	TGACGCTCGA	TCGTCAGCCA	TCATAGACCA	ATCGACCATC
6651	TGTTATGGAT	GCTTGCTAGC	TAGACTAGTC	AGACATAAAA	TTTGATACT
6701	TTCTCCCAAC	TGGGAGACGG	GGACTGATGT	GCAGCTGCAC	CAAGGTGAAA
6751	TTTTTCCCTA	TAAATATGCA	TGAAATACTG	CATTATCTTG	CCACAGCCAC
6801	TGCCACAGCC	AGATAACAAG	TGCAGCTGGT	AGCACGCAAC	GCATAGCTCT
6851	GGACTTGTAG	CTAGGTAGCC	AACCGGATCC	ACACGACACC	ATGCTCGACA
6901	CCAACAAGGT	GTACGAGATC	AGCAACCACG	CCAACGGCCT	CTACGCCGCC
6951	ACCTACCTCT	CCCTCGACGA	CTCCGGCGTG	TCCCTCATGA	ACAAGAACGA
7001	CGACGACATC	GACGACTACA	ACCTCAAGTG	GTTCTCTTC	CCGATCGACG
7051	ACGACCAGTA	CATCATCACC	TCCTACGCCG	CCAACAAC TG	CAAGGTGTGG
7101	AACGTGAACA	ACGACAAGAT	TAATGTGTCA	ACCTACTCCT	CCACCAACTC
7151	CATCCAGAAG	TGGCAGATCA	AGGCCAACGG	CTCCTCCTAC	GTGATCCAGT
7201	CCGACAACGG	CAAGGTGCTC	ACCGCCGGCA	CCGGCCAGGC	CTCGGCCCTC
7251	ATCCGCCTCA	CCGACGAGTC	CTCCAACAAC	CCGAACCAGC	AATGGAACCT
7301	GACGTCCGTG	CAGACCATCC	AGCTCCCGCA	GAAGCCGATC	ATCGACACCA
7351	AGCTCAAGGA	CTACCCGAAG	TACTCCCCGA	CCGGCAACAT	CGACAACGGC
7401	ACCTCCCCGC	AGCTCATGGG	CTGGACCCTC	GTGCCGTGCA	TCATGGTGAA
7451	CGACCCGAAC	ATCGACAAGA	ACACCAGAT	CAAGACCACC	CCGTACTACA
7501	TCCTCAAGAA	GTACCAGTAC	TGGCAGAGGG	CCGTGGGCTC	CAACGTCGCG
7551	CTCCGCCCGC	ACGAGAAGAA	GTCTTACACC	TACGAGTGGG	GCACCGAGAT
7601	CGACCAGAAG	ACCACCATCA	TCAACACCTT	CGGCTTCCAG	ATCAACATCG
7651	ACAGCGGCAT	GAAGTTCGAC	ATCCCGGAGG	TGGCGGGCGG	TACCGACGAG
7701	ATCAAGACCC	AGTCAACGA	GGAGCTCAAG	ATCGAGTATT	CACATGAGAC
7751	GAAGATCATG	GAGAAGTACC	AGGAGCAGTC	CGAGATCGAC	AACCCGACCG
7801	ACCAGTCCAT	GAACTCCATC	GGCTTCTCA	CCATCACCTC	CCTGGAGCTC
7851	TACCGCTACA	ACGGCTCCGA	GATCCGCATC	ATGCAGATCC	AGACCTCCGA
7901	CAACGACACC	TACAACGTGA	CCTCTACCC	GAACCACCAG	CAGGCCCTGC
7951	TGCTGCTGAC	CAACCACTCC	TACGAGGAGG	TGGAGGAGAT	CACCAACATC
8001	CCGAAGTCCA	CCCTCAAGAA	GCTCAAGAAG	TACTACTTCT	GACTCATGAG
8051	TCATGAGTCA	GTTAACCTAG	ACTTGTCAT	CTTCTGGATT	GGCCAACTTA
8101	ATTAATGTAT	GAAATAAAAG	GATGCACACA	TAGTGACATG	CTAATCACTA
8151	TAATGTGGGC	ATCAAAGTTG	TGTGTTATGT	GTAATTACTA	GTTATCTGAA
8201	TAAAAGAGAA	AGAGATCATC	CATATTTCTT	ATCCTAAATG	AATGTCACGT
8251	GTCTTTATAA	TTCTTTGATG	AACCAGATGC	ATTTCAATTA	CCAAATCCAT
8301	ATACATATAA	ATATTAATCA	TATATAATTA	ATATCAATTG	GGTTAGCAAA
8351	ACAAATCTAG	TCTAGGTGTG	TTTTGCGAAT	TCCCATGGAG	TCAAAGATTCT
8401	AAATAGAGGA	CCTAACAGAA	CTCGCCGTAA	AGACTGGCGA	ACAGTTCATA
8451	CAGAGTCTCT	TACGACTCAA	TGACAAGAAG	AAAATCTTCG	TCAACATGGT
8501	GGAGCACGAC	ACGTTGTCT	ACTCCTAAAA	TATCAAAGAT	ACAGTCTCAG
8551	AAGACCAAAG	GGCAATTGAG	ACTTTTCAAC	AAAGGGTAAT	ATCCGGAAAC
8601	CTCCTCGGAT	TCCATTGCC	AGTATCTGT	CACTTTATTG	TGAAGATAGT
8651	GGAAAAGGAA	GGTGGCTCCT	ACAAATGCCA	TCATTGCGAT	AAAGGAAAGG
8701	CCATCGTTGA	AGATGCCTCT	GCCGACAGTG	GTCCCAAAGA	TGACACCCCA
8751	CCCACGAGGA	GCATCGTGGA	AAAAGAAAGAC	GTTCCAACCA	CGTCTTCAAA
8801	GCAAGTGGAT	TGATGTGATA	TCTCCACTGA	CGTAAGGGAT	GACGCACAAT
8851	CCCCTATCC	TTGCGAAGAC	CCTTCTCTA	TATAAGGAAG	TTCATTTTCT
8901	TTGGAGAGGA	CAGGGTACCC	GGGGATCCAC	CATGTCTCCG	GAGAGGAGAC
8951	CAGTTGAGAT	TAGGCCAGCT	ACAGCAGCTG	ATATGGCCGC	GGTTTGTGAT
9001	ATCGTTAACC	ATTACATTGA	GACGTCTACA	GTGAACTTTA	GGACAGAGCC
9051	ACAAACACCA	CAAGAGTGGA	TTGATGATCT	AGAGAGGTTG	CAAGATAGAT
9101	ACCCTTGCTT	GGTTGCTGAG	GTTGAGGGTG	TTGTGGCTGG	TATTGCTTAC
9151	GCTGGGCCCT	GGAAGGCTAG	GAACGCTTAC	GATTGGACAG	TTGAGAGTAC

Figura 1 continuación

9201	TGTTTACGTG	TCACATAGGC	ATCAAAGGTT	GGGCCTAGGA	TCCACATTGT
9251	ACACACATTT	GCTTAAGTCT	ATGGAGGCGC	AAGGTTTTAA	GTCTGTGGTT
9301	GCTGTTATAG	GCCTTCCAAA	CGATCCATCT	GTTAGGTTGC	ATGAGGCTTT
9351	GGGATACACA	GCCCGGGGTA	CATTGCGCGC	AGCTGGATAC	AAGCATGGTG
9401	GATGGCATGA	TGTTGGTTTT	TGGCAAAGGG	ATTTTGAGTT	GCCAGCTCCT
9451	CCAAGGCCAG	TTAGGCCAGT	TACCCAGATC	TGAGTCGACC	TCAGGCATG
9501	CCCCTGAAA	TCACCAGTCT	CTCTCTACAA	ATCTATCTCT	CTCTATAATA
9551	ATGTGTGAGT	AGTCCCAGA	TAAGGGAATT	AGGGTTCTTA	TAGGGTTTCG
9601	CTCATGTGTT	GAGCATATAA	GAAACCCTTA	GTATGTATTT	GTATTTGTAA
9651	AATACTTCTA	TCAATAAAAAT	TTCTAATTCC	TAAAACCAA	ATCCAGGGCG
9701	AGCTCGGTAC	CCGGGGATCC	TCTAGAGTCG	ACCTGCAGGC	ATGCCCGCGG
9751	ATATCGATGG	GCCCCGGCCG	AAGCTTCGGT	CCGGGCCATC	GTGGCCCTTT
9801	GCTCTTCAGG	ATGAAGAGCT	ATGTTTAAAC	GTGCAAGCGC	TCAATTTCGCC
9851	CTATAGTGAG	TCGTATTACA	ATCGTACGCA	ATTCAGTACA	TTAAAAACGT
9901	CCGCAATGTG	TTATTAAGTT	GTCTAAGCGT	CAATTTTTCC	CTTCTATGGT
9951	CCCGTTTGTT	TATCCTCTAA	ATTATATAAT	CCAGCTTAAA	TAAGTTAAGA
10001	GACAAACAAA	CAACACAGAT	TATTAATAG	ATTATGTAAT	CTAGATACCT
10051	AGATTATGTA	ATCCATAAGT	AGAATATCAG	GTGCTTATAT	AATCTATAGG
10101	CTCGATTATA	TAATCTTAAA	AGAAAACAAA	CAGAGCCCCT	ATAAAAAGGG
10151	GTCAAGTGGG	CATCTGGTCA	CTCATTTAAT	CCCTCCCTCT	CCTCTTTTAT
10201	CCCTCTTTTT	GGTGTATTCA	CCAATAGTGG	TGTGCACCTG	TGATTGGCTC
10251	GTAAAAATTC	TTGGACGGAT	GGAAGAGTGA	AGAGATAAGC	AAGTCAAAGA
10301	AAAGTAACAA	CGAAGCTTCA	TCAGCTACAA	ATTTTGGCCC	AACGTGTTGC
10351	ACCAGCACCA	AACTTACGTA	TACATGATTA	TCTCTGTTTC	CCTCATTTTCG
10401	AAGAAAAAAA	CGGGTTTCAA	AACCCACTGC	TTTCAGGAGT	AAAAAAAGAT
10451	AATAATCTGA	AACATTGCTT	CCACCTTGGC	CCTTATTTGG	TTACGTTGCA
10501	ATTCACCCCA	ATCCACATGT	GGATTGAGAT	GGATTGCAGT	GTAGCTAGAC
10551	AAACCCTTAG	GCCCTGTTTG	CATAGGAATA	CACCAGGAAT	TATTCCAGCT
10601	AATCAAATTT	TATATAAATG	AGAGAAACAA	TTCGGATAGG	AATTTGTTCCA
10651	GGACTTCATT	CTGCAGTAAC	CGAACGGCCC	CTTAATCCAC	CCAATACAC
10701	GTGGATTGGA	GTGGATTGAG	GTACAGCCAA	ACAAGGCCCTA	AGTGCAGATC
10751	AAATAAATCA	CCCGTCATAT	TCTTCTACCT	ACAAAAACAG	CAATAAACAC
10801	CTGAATGAAG	TTCTAATTTG	CACAGTGTAG	GTAGGATGAA	AATAGTTACC
10851	TCCTCATGGT	CAGTAACTCT	TGGCACACAA	CTTCACATGT	AATCGATGTA
10901	CCACTTGGCT	CTTGCCTGAA	ACCCAATACA	TCTTTAGCAT	AAGAATAATA
10951	TTATGATGGC	AAGGCATGAT	CACCAGCACT	CCTTTATTGT	TTAGTAAGTC
11001	TATCACTCCC	CAAAACAATT	CAAATGAACA	GAGATGCATT	GCCCCAATG
11051	AATTCTATTT	CAATTAGCCG	GAAAATTCTA	CTTCATCAGA	AGCATCCAAA
11101	TTGCCAGCAT	CCCTACTAGA	CTGACCATGA	CCAGGCTGCC	GCAGATGCCT
11151	CTTTTTCTGT	CCTCTCCTCT	TTGCCTTGAG	TTTCTCTTCA	AGATCCCTCA
11201	CCCCACGTCT	CTTATACATC	TTAAAGCTAA	CATGTCTCTC	CTCCGCCATC
11251	TTCCTAACCT	TCTCAGTAAT	CTCAGCAGCA	ATCTGACGGT	TGTACAACCT
11301	CTTCAGCCCC	TTCATCAACT	TTGCAAATGT	GTCAGGCTGT	GGCATCAGTC
11351	CTGCCTCTAG	CATGTCTAAG	CAATACAGGC	AGGCCTCCTT	GACATGTTTC
11401	TTCGCAAACA	GTGCATGAAT	CCAGATAGTC	CATGCACTCA	CATTGAGCTC
11451	ACAGCCTTTG	CTCACAATAC	ATTTCCAAAC	ATCCTTTGCA	AGCTCAAGTT
11501	TCTCATCTCT	GACCAACGCA	TTGAGGAGGT	CCTTCAGCAC	CCCATATTGC
11551	GGTACCACAA	AGAGCCCCCT	CCCAACCATG	TCTTTAAAAT	AACTACATGC
11601	CTCAATCAGC	AAACCCTGCC	CAACAAGGCC	ACTCACCACG	ATAGCAAATG
11651	TATCGACCAC	AGGACTGAGC	CCAGCACTTT	CCATCTCATT	CCACAATGTC
11701	ATGGCTTGCT	TGGTCTCCCC	AAGCCTGCAG	GCCAACCGAA	TCACCACATT
11751	GTATATCTTG	AGATCTGGTG	GACACCGGCA	CTCCCGCATC	CTCTCCATCA
11801	GCTCCAAGCA	CTCCTCAAGC	TGCTCCTTCT	TCTCGTGTGC	TACAAAGAAA
11851	CCATGGTACA	CGGCAGCGTC	CACCCGAGG	CCATCCCTCG	ACATAGCATC
11901	CAAGAACTCG	TACCCCTGGG	AT		

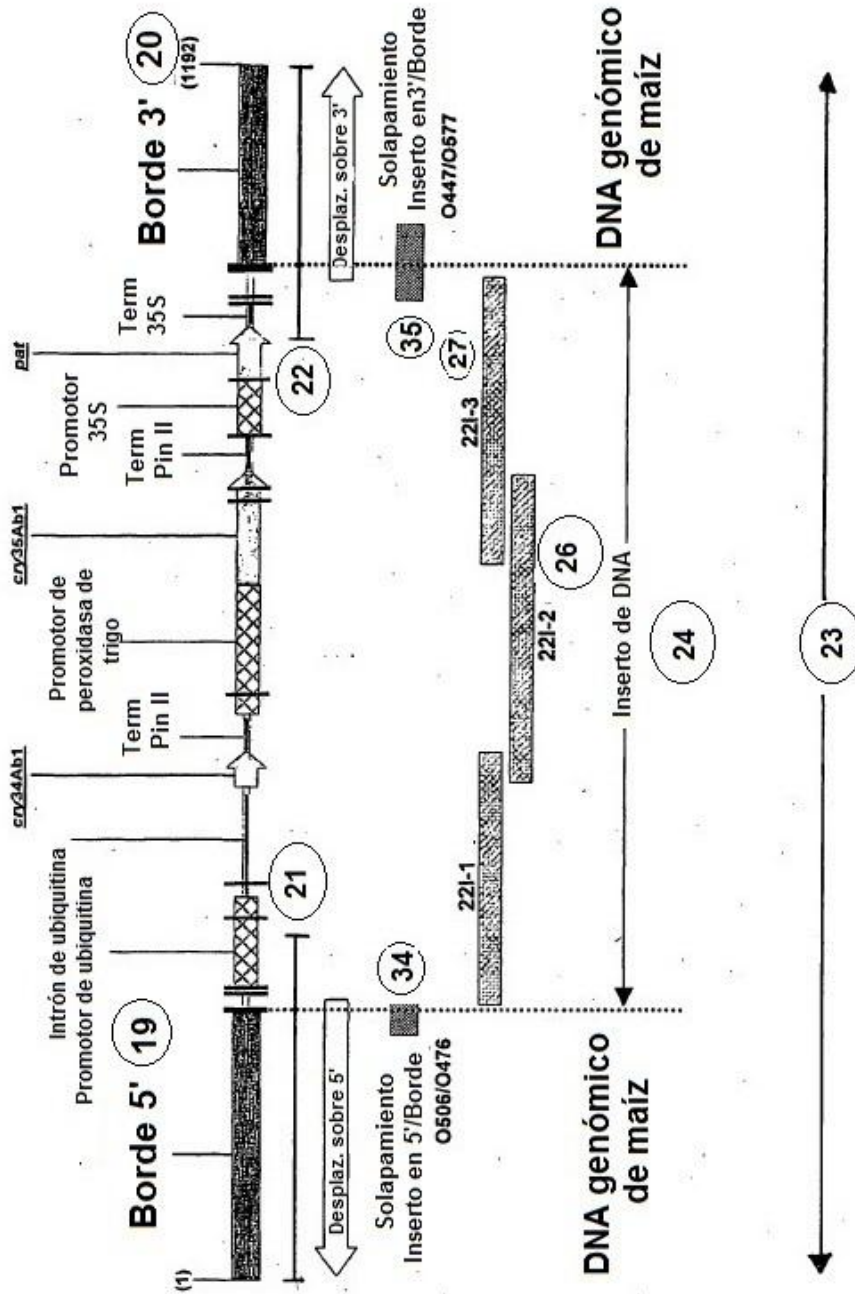


FIGURA 2

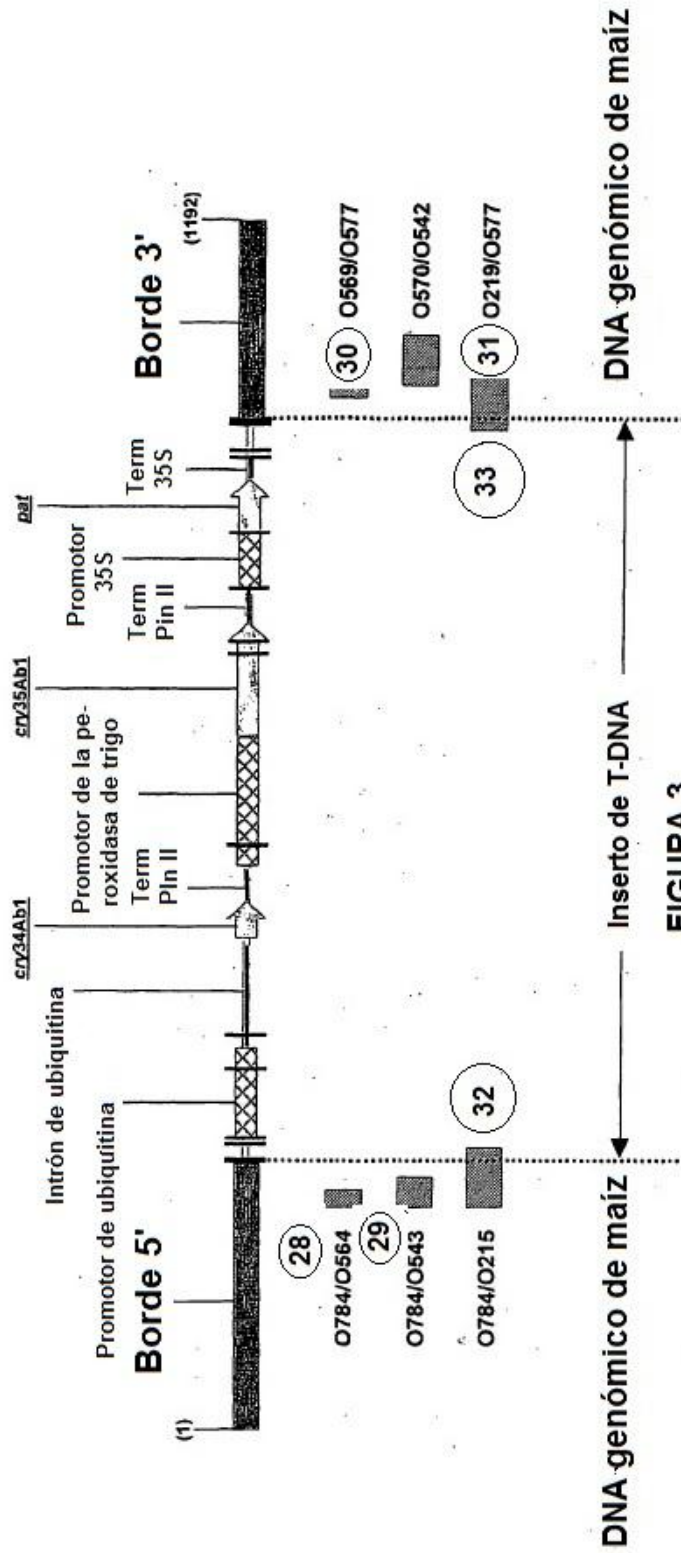


FIGURA 3