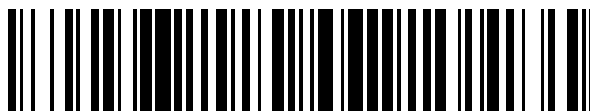


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 447 818**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

A01H 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.10.2003 E 10178584 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2013 EP 2275579**

54 Título: **Par de cebadores para la detección de un gen (VIP3A) que codifica un insecticida**

30 Prioridad:

29.10.2002 GB 0225129

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

13.03.2014

73 Titular/es:

**SYNGENTA PARTICIPATIONS AG (100.0%)
Seeds IP Wro1004.8.11 Schwarzwaldallee 215
4058 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**ELLIS, DANIEL MURRAY;
NEGROTTO, DAVID VINCENT;
SHI, LIANG;
SHOTKOSHI, FRANK ARTHUR y
THOMAS, CARLA RANDALL**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 447 818 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

Par de cebadores para la detección de un gen (VIP3A) que codifica un insecticida

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

5 Las plagas vegetales son un factor importante en la pérdida de las cosechas agrícolas importantes del mundo. Se pierden alrededor de 8 mil millones de dólares cada año en los Estados Unidos de América debido a infestaciones de plantas por plagas no mamíferas, incluyendo insectos. Además de las pérdidas en cosechas de campo, las plagas de insectos también son una carga para los cultivadores de vegetales y frutas, para productores de flores ornamentales, y para jardineros.

10 Las plagas de insectos se controlan principalmente mediante aplicaciones intensivas de plaguicidas químicos, que son activos mediante la inhibición del crecimiento de los insectos, prevención de la alimentación de reproducción de los insectos, o que provoca la muerte. De este modo se puede alcanzar un buen control de plagas de insectos, pero estos compuestos químicos pueden afectar también algunas veces a otros insectos beneficiosos. Otro problema que resulta del uso extendido de plaguicidas químicos es la aparición de variedades de insectos resistentes. Esto se ha
15 aliviado parcialmente mediante diversas prácticas de manejo de la resistencia, pero hay una creciente necesidad de agentes de control de plagas alternativos. Los agentes de control de plagas biológicos, tales como las cepas de *Bacillus thuringiensis* que expresan toxinas plaguicidas como δ -endotoxinas, también se han aplicado a plantas de cosechas con resultados satisfactorios, ofreciendo una alternativa o ayuda a plaguicidas químicos. Se han aislado los genes que codifican algunas de estas δ -endotoxinas, y se ha demostrado que su expresión en hospedantes
20 heterólogos proporciona otra herramienta para el control de plagas de insectos económicamente importantes. En particular, la expresión de toxinas insecticidas tales como δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* en plantas transgénicas, ha proporcionado protección eficiente frente a plagas de insectos seleccionadas, y se han comercializado plantas transgénicas que expresan tales toxinas, permitiendo a los granjeros reducir las aplicaciones de agentes de control de insectos químicos.

25 Recientemente, se ha identificado una nueva familia de proteínas insecticidas producidas mediante *Bacillus* sp. durante las etapas vegetativas de crecimiento (proteínas insecticidas vegetativas (VIPs)). Las patentes U.S. 5.877.012, 6.107.279, y 6.137.033 describen genes de la toxina vip3A, aislados de la especie *Bacillus*. Las toxinas VIP3A poseen actividad insecticida frente a un amplio espectro de insectos lepidópteros, que incluye, pero no se limita a, gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda*, gusano cortador grasiento, *Agrotis ipsilon*, taladrador de la caña de azúcar, *Diatraea saccharalis*, y gusano picador, *Elasmopalpus lignosellus*, y, cuando se expresan en
30 plantas transgénicas, por ejemplo algodón, confieren protección a la planta del daño por ingestión del insecto.

La familia del algodón, género *Gossypium*, un miembro de las Malváceas, consiste en 39 especies, de las cuales *Gossypium hirsutum* es la especie más habitualmente cultivada. También se cultivan otras tres especies: *G. arboreum*, *G. barbadense*, y *G. herbaceum*. Estas especies cultivadas se hacen crecer principalmente para las
35 masas de fibras sedosas que se convierten en telas. El algodón es adecuado como fibra textil debido a que las hebras secas maduras se retuercen de tal manera que se pueden hilar de ellas hebras fuertes finas. Otros productos, tales como aceite de semilla de algodón, torta, y removedoras de hilachas de algodón son subproductos de la producción de fibras.

40 El daño a las cosechas de algodón por plagas de insectos en todo el mundo da como resultado cada año una pérdida significativa de producción. El control eficaz de estas plagas para minimizar la pérdida de producción es de gran importancia económica. Los ejemplos de plagas de insectos de algodón incluyen rosquilla verde gardana (*Spodoptera exigua*), picudo del algodono (*Anthonomus grandis grandis*), gusano medidor del repollo (*Trichoplusia ni*), insecto de planta anubarrado (*Neurocolpus nubilus*), áfido del algodón (*Aphis gossypii*), gusano pelotero (*Heliooverpa zea*), gusanos cortadores (*Feltia subterranea*, *Peridroma saucia*, *Agrotis ipsilon*), taladrador del maíz europeo (*Ostrinia nubilalis*), cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*), trips de plántula (*Frankliniella spp.*), falso medidor (*Pseudoplusia includens*), insectos hediondos (*Nezara viridula*, *Acrosternum hilare*, *Euschistus servus*), chinche opaca de las plantas (*Lygus lineolaris*), perforador mayor de la bellota (*Heliothis virescens*) y moscas blancas (*Trialeurodes abutilonea*, *Bemisia tabaci*).
45

La transformación y regeneración de plantas de algodón es ahora un procedimiento bien consolidado, basado típicamente en transferencia de ADN extraño mediada por *Agrobacterium tumefaciens* en partes vegetales de algodón y la regeneración de dichas partes vegetales en cultivo tisular en plantas de algodón transgénicas, completamente fértiles.
50

Existe la necesidad de generar una planta de algodón que sea resistente a insectos, de manera que se reduzca la pérdida de producción por daño a las cosechas de algodón por plagas de insectos. Una planta de algodón resistente a insectos podría reducir la necesidad de aplicar plaguicidas químicos, que pueden ser perjudiciales a otros insectos
55 beneficiosos y al entorno.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a medios para detectar material vegetal derivado de un suceso de algodón transgénico resistente a insectos, denominado COT102. En particular, la presente invención se refiere a un par de cebadores para detectar la presencia de ácidos nucleicos específicos para el suceso COT102 en una muestra biológica, comprendiendo el par de cebadores un primer par y un segundo par diseñados para unirse a un polinucleótido que comprende al menos 20 nucleótidos contiguos de SEC ID NO: 1 o SEC ID NO: 2 cuando dicho polinucleótido es monocatenario, en el que el primer cebador y el segundo cebador, cuando se usan juntos en una reacción de PCR, producen un amplicón que comprende al menos una secuencia de SEC ID NO: 1 o SEC ID NO: 2, y en el que la producción de un amplicón es indicativa de ácidos nucleicos específicos para el suceso COT102. Preferiblemente, el primer cebador se diseña para unirse a una secuencia de ADN específica para el sitio de inserción de COT102, y el segundo cebador se diseña para unirse a una secuencia de ADN genómico flanqueante en dirección 3' del extremo 3' del sitio de inserción de COT102, o a una secuencia de ADN genómico flanqueante en dirección 5' del extremo 5' del sitio de inserción de COT102, en el que el sitio de inserción de COT102 comprende la secuencia de SEC ID NO: 1 o SEC ID NO: 2. En una realización preferida, el primer cebador tiene la secuencia de SEC ID NO: 3, y el segundo cebador tiene la secuencia de SEC ID NO: 4. En una realización preferida adicional, el primer cebador tiene la secuencia de SEC ID NO: 19, y el segundo cebador tiene la secuencia de SEC ID NO: 18.

"Suceso COT102", en el contexto de esta solicitud, se refiere a la planta de algodón transgénica insecticida original descrita aquí. "Insecticida", como se usa aquí, se refiere a cualquier efecto inhibidor sobre un insecto, incluyendo, pero sin limitarse a, alimentación reducida, crecimiento retardado, fecundidad reducida, parálisis o muerte. "Fecundidad" comprende todos los aspectos relacionados con la reproducción, tales como la capacidad reproductora, la frecuencia reproductora y el número de descendientes.

El suceso COT102 muestra un genotipo nuevo que comprende dos casetes de expresión. El primer casete comprende un promotor adecuado para la expresión en plantas, operablemente enlazado a un gen que codifica una toxina insecticida VIP3A, útil para controlar un amplio espectro de plagas de insectos lepidópteros, y una señal de poliadenilación adecuada. Los promotores adecuados se pueden aislar, *entre otros*, de plantas. Se han aislado y caracterizado numerosos promotores vegetales, incluyendo promotores constitutivos, encendibles y/o específicos de tejidos. Los promotores adecuados se pueden seleccionar del siguiente grupo no limitante: CaMV35S, FMV35S, ubiquitina, Act2, NOS, OCS, el promotor del virus de la hoja rizada amarilla del *Cestrum*, patatina, E9, el conector alcA/alcR, el conector GST, el conector RMS, oleosina, gelvina, la subunidad pequeña de ribulosa bifsosfato carboxilasa-oxigenasa, actina 7, el promotor MR7 (maíz), Gos 9 (arroz), los promotores GOS2, MasOcs (o superpromotor), el promotor RoID (*Agrobacterium rhizogenes*), el promotor SuperMAS, y el promotor Suc2 (*Arabidopsis*). Preferiblemente, el promotor es el promotor de actina, Act2, de *Arabidopsis*. También se pueden incorporar elementos adicionales, tales como secuencias potenciadoras, en el casete de expresión a fin de estimular niveles de expresión génica, por ejemplo potenciadores transcripcionales o traduccionales, tales como el activador de la traducción del virus del grabado del tabaco (TEV), el potenciador CaMV35S, y el potenciador FMV35S. Como alternativa, se puede incluir una secuencia seleccionadora de dianas, por ejemplo, para dirigir el transporte de la toxina VIP3A a un compartimento celular particular. Por ejemplo, si se desea proporcionar la proteína fuera de la célula, entonces se puede ligar una secuencia extracelular seleccionadora de dianas al polinucleótido que codifica la proteína VIP. Otros ejemplos de selección de dianas incluyen la selección de una diana de un orgánulo o compartimento intracelular específico, por ejemplo al retículo endoplásmico usando una secuencia de retención "KDEL". Se han aislado y caracterizado numerosas señales de poliadenilación. Los ejemplos de señales de poliadenilación adecuadas funcionales en plantas incluyen aquellas del gen de nopalina sintasa (nos) de *Agrobacterium tumefaciens*, del gen del inhibidor de proteinasa II y del gen de alfa-tubulina (documento EP-A 652.286). En una realización de la presente invención, la señal de poliadenilación es aquella del gen nos de *Agrobacterium tumefaciens*.

El polinucleótido que codifica la proteína VIP3A también se puede optimizar para los codones o se puede alterar de otro modo para potenciar, por ejemplo, la transcripción una vez que se incorpora en el material vegetal. Tal optimización de codones también se puede usar para alterar la estructura secundaria predicha del transcrito de ARN producido en cualquier célula transformada, o para destruir elementos de inestabilidad de ARN crípticos presentes en el transcrito no alterado, incrementando de ese modo la estabilidad y/o disponibilidad del transcrito en la célula transformada (Abler y Green (1996) *Plant Molecular Biology* (32) p.63-78).

El segundo casete de expresión comprende un gen que, cuando se expresa, se puede usar como un marcador seleccionable. Se han caracterizado numerosos marcadores seleccionables, incluyendo algunos que confieren tolerancia a antibióticos, y otros que confieren tolerancia a herbicidas. Los ejemplos de genes marcadores seleccionables adecuados incluyen aquellos que confieren tolerancia a higromicina, canamicina o gentamicina. Otros marcadores seleccionables adecuados incluyen genes que confieren resistencia a herbicidas, tales como herbicidas a base de glifosato, o resistencia a toxinas tales como eutipina. También existen otras formas de selección, tales como sistemas de selección a base de hormonas, tales como el sistema de multiautotransformación (MAT) de Hiroyasu Ebinuma et al. (1997) *PNAS* Vol. 94 p. 2117-2121; los sistemas de selección visual, que usan la proteína fluorescente verde conocida, β -glucuronidasa, o cualquier otro sistema de selección tal como manosa isomerasa (Positech™), xilosa isomerasa y 2-desoxiglucosa (2-DOG). Preferiblemente, el gen marcador seleccionable es aquel que confiere tolerancia a higromicina. Opcionalmente, en el suceso COT102 están

comprendidos casetes de expresión adicionales. Por ejemplo, estos pueden proporcionar otros beneficios deseables tales como resistencia a herbicidas.

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

Se proporciona un polinucleótido que comprende al menos 17 nucleótidos contiguos procedentes de la secuencia de 26 nucleótidos de SEC ID NO: 1. Preferiblemente, dicho polinucleótido comprende al menos 18 nucleótidos contiguos de SEC ID NO: 1. También se prefiere que dicho polinucleótido comprenda al menos 20 nucleótidos contiguos de SEC ID NO: 1. Como otra opción, dicho polinucleótido comprende al menos 22 nucleótidos contiguos de SEC ID NO: 1, o al menos 24 nucleótidos contiguos de SEC ID NO: 1. Finalmente, se describe un polinucleótido que comprende la secuencia de SEC ID NO: 1.

Además, se describe un polinucleótido que comprende al menos 17 nucleótidos contiguos procedentes de la secuencia de 26 nucleótidos de SEC ID NO: 2. Preferiblemente, dicho polinucleótido comprende al menos 18 nucleótidos contiguos de SEC ID NO: 2, o al menos 20 nucleótidos contiguos de SEC ID NO: 2, o al menos 22 nucleótidos contiguos de SEC ID NO: 2, o al menos 24 nucleótidos contiguos de SEC ID NO: 2. Finalmente, se describe un polinucleótido que comprende la secuencia de SEC ID NO: 2.

Adicionalmente, se describe un polinucleótido como se describe anteriormente, que comprende la secuencia de SEC ID NO: 7. Adicionalmente, se describe un polinucleótido como se describe anteriormente, que comprende la secuencia de SEC ID NO: 21.

Se describe además una planta que comprende un polinucleótido que comprende al menos 17 nucleótidos contiguos de SEC ID NO: 1 y/o SEC ID NO: 2. Preferiblemente, dicha planta comprende al menos 18 nucleótidos contiguos de SEC ID NO: 1 y/o SEC ID NO: 2, o al menos 20 nucleótidos contiguos de SEC ID NO: 1 y/o SEC ID NO: 2, o al menos 22 nucleótidos contiguos de SEC ID NO: 1 y/o SEC ID NO: 2. Adicionalmente preferido, dicha planta comprende al menos 24 nucleótidos contiguos de SEC ID NO: 1 y/o SEC ID NO: 2, o la secuencia de SEC ID NO: 1 y/o SEC ID NO: 2. Dicha planta puede comprender adicionalmente la secuencia de SEC ID NO: 7. Preferiblemente, dicha planta comprende la secuencia de SEC ID NO: 21. Dicha planta puede ser una planta de algodón. Lo más preferido, dicha planta es una planta de algodón insecticida que es el suceso COT102, o una planta derivada del mismo.

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

La transformación mediada por *Agrobacterium* es un método usado habitualmente para la transformación de plantas dicotiledóneas. El ADN extraño a introducir en la planta se clona en un vector binario entre las secuencias de consenso de frontera izquierda y derecha. Esta es la región de T-DNA. El vector binario se transfiere en una célula de *Agrobacterium*, que se usa subsiguientemente para infectar tejido vegetal. La región de T-DNA del vector que comprende el ADN extraño se inserta en el genoma de la planta. El casete del gen marcador y el casete del gen de rasgo pueden estar presentes en la misma región de T-DNA, en regiones diferentes de T-DNA en el mismo vector, o incluso en regiones diferentes de T-DNA en vectores diferentes. Preferiblemente, los casetes están presentes en la misma región de T-DNA.

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

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

Una planta como se describe aquí tiene un efecto insecticida sobre insectos de una o más especies del grupo que comprende *Heliothis* sp., *Helicoverpa* sp. y *Spodoptera* sp. que la pueden infestar. "Infestar", como se usa aquí, se refiere a atacar, alimentarse o dañar de cualquier forma por uno o más insectos. De este modo, por ejemplo, la planta proporcionará un mecanismo de autodefensa frente a la infestación por insectos de plagas tales como *Helicoverpa zea* (gusano de la mazorca del maíz). Como resultado, se requiere un número reducido de

pulverizaciones de insecticida durante el cultivo de dicha planta en comparación con una planta de maíz no transgénica de la misma variedad, y la pérdida de producción debido a plagas de insectos se mantiene en un nivel mínimo.

La presente divulgación no está limitada al propio suceso COT102, sino que se amplía además para incluir cualquier material vegetal derivado del mismo, incluyendo semillas en tanto que contienen al menos uno de los polinucleótidos arriba. Se incluyen plantas que derivan de una reproducción cruzada con el suceso COT102 o un derivado del mismo mediante reproducción convencional u otros métodos. Se incluye también material vegetal derivado del suceso COT102 que puede comprender secuencias polinucleotídicas adicionales, modificadas o en menor número, en comparación con el suceso COT102, o presenta otras características fenotípicas. Por ejemplo, puede ser deseable transformar el material vegetal derivado del suceso COT102 para generar un nuevo suceso que posee un rasgo adicional, tal como un segundo gen de resistencia a insectos. Este procedimiento es conocido como apilamiento génico. El segundo gen de resistencia a insectos puede codificar, por ejemplo, lectinas insecticidas, inhibidores de proteasas insecticidas, y proteínas insecticidas que derivan de especies de *Bacillus thuringiensis*, *Xenorhabdus nematophilus*, o *Photorhabdus luminescens*.

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

También se describe un método para controlar insectos, que comprende proporcionar material vegetal derivado del suceso COT102 en un locus en el que se alimentan dichos insectos. Se describe adicionalmente un método para controlar insectos, que comprende proporcionar material vegetal derivado del suceso COT102 en un locus en el que se alimentan dichos insectos, y aplicar otras sustancias agroquímicas a dicho material vegetal, tales como herbicidas, fungicidas y otros compuestos insecticidas, incluyendo otras proteínas insecticidas. Los ejemplos de compuestos insecticidas posibles incluyen lectinas insecticidas inhibidores de proteasas insecticidas y proteínas insecticidas derivadas de las especies de *Bacillus thuringiensis*, *Xenorhabdus nematophilus*, o *Photorhabdus luminescens*. Los ejemplos de posibles sustancias químicas incluyen peritroides, carbamatos, imidacloprida, organocloros, y macromoléculas tales como spinosad, abamectina o emamectina.

Se divulga aquí también un método para detectar material vegetal derivado del suceso transgénico COT102, que comprende obtener una muestra para análisis; extraer ADN de la muestra; proporcionar un par de cebadores diseñados para unirse a un polinucleótido que comprende al menos 17 nucleótidos contiguos de SEC ID NO: 1 o SEC ID NO: 2; amplificar la región que se encuentra entre los sitios en los que se unen los cebadores; y detectar la presencia del producto de la amplificación. Los pares adecuados de cebadores para uso en este método de detección se pueden diseñar usando parámetros bien conocidos por los expertos en la técnica de biología molecular ahora que ya están proporcionados en la presente invención las SEC ID NOs: 1 y 2. Por ejemplo, uno o ambos cebadores del par se pueden diseñar para ser específicos del vector, específicos del gen de rasgo, específicos del promotor, específicos para la secuencia de la unión entre el ADN insertado y el ADN genómico y/o específicos del marcador.

En una realización, el par de cebadores comprende un primer cebador y un segundo cebador diseñados para unirse a un polinucleótido que comprende al menos 20 nucleótidos contiguos de SEC ID NO: 1 o SEC ID NO: 2 cuando dicho polinucleótido es monocatenario, en el que el primer cebador y el segundo cebador, cuando se usan juntos en una reacción de PCR, producen un amplicón que comprende al menos una secuencia de SEC ID NO: 1 o SEC ID NO: 2 y en el que la producción de un amplicón es indicativa de ácidos nucleicos específicos para el suceso COT102. En una realización adicional, el primer cebador se diseña para unirse a una secuencia de ADN específica para el sitio de inserción de COT102, y el segundo cebador se diseña para unirse a una secuencia de ADN genómico de flanqueo en dirección 3' del extremo 3' del sitio de inserción de COT102 o a una secuencia de ADN genómico de flanqueo en dirección 5' del extremo 5' del sitio de inserción de COT102, en el que el sitio de inserción de COT102 comprende la secuencia de SEC ID NO: 1 o SEC ID NO: 2. En otra realización, el primer cebador tiene la secuencia de SEC ID NO: 3 y el segundo cebador tiene la secuencia de SEC ID NO: 4. En una realización adicional, el primer cebador tiene la secuencia de SEC ID NO: 19 y el segundo cebador tiene la secuencia de SEC ID NO: 18 y producen un amplicón de 962pb.

Los cebadores alternativos que se pueden usar en combinación para detectar el suceso COT102 incluyen SEC ID NOs 22 y 23, que son específicas para el gen VIP y producen un amplicón de 556 pb, o SEC ID NOs 24 y 25 que son específicas para el gen que confiere resistencia al antibiótico higromicina y producen un amplicón de 367 pb.

Existen muchos métodos de amplificación que se pueden usar según este aspecto de la invención. El principio subyacente, una técnica conocida por los expertos en la técnica, es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El producto de la amplificación procedente de una reacción de PCR se puede visualizar tificando con bromuro de

etidio y excitando con luz UV, típicamente después de la separación de tamaños usando electroforesis en gel de agarosa.

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

Se describe adicionalmente el uso de PCR múltiple para distinguir entre material vegetal COT102 homocigoto y material vegetal COT102 heterocigoto. Esto se conoce por los expertos en la técnica como ensayo de cigocidad, e implica el uso de tres cebadores de PCR que se unen a partes específicas del genoma de algodón y/o ADN insertado. Los cebadores adecuados para uso en tal ensayo de cigocidad se representan como SEC ID NOs 18 a 20.

Se divulga además un kit de partes que comprende un medio para detectar en una muestra la presencia de material vegetal derivado del suceso COT102. Preferiblemente, dicho kit de partes comprende un medio para detectar en una muestra la presencia de un polinucleótido que comprende al menos 17 nucleótidos contiguos de la secuencia de SEC ID NO: 1 o SEC ID NO: 2. Preferiblemente, dicho kit de partes puede comprender tecnología de detección de amplificación de ADN, tal como PCR o TaqMan™ y instrucciones para uno o más de estos métodos.

EJEMPLOS

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

SEC ID NO 1: Secuencia polinucleotídica que se extiende a lo largo de la unión donde el extremo 5' del inserto COT102 se inserta en el genoma de algodón en el suceso COT102.

SEC ID NO 2: Secuencia polinucleotídica que se extiende a lo largo de la unión donde el extremo 3' del inserto COT102 se inserta en el genoma de algodón en el suceso COT102.

SEC ID NOs 3-4: Secuencias polinucleotídicas adecuadas para uso como cebadores en la detección del suceso COT102.

SEC ID NOs 5-7: Secuencias polinucleotídicas adecuadas para uso como sondas en la detección del suceso COT102.

SEC ID NO 8: Secuencia de aminoácidos de la proteína de la toxina VIP3A.

SEC ID NOs 9-17: Secuencias polinucleotídicas adecuadas para uso como cebadores TaqMan en la detección del suceso COT102.

SEC ID NOs 18-20: Secuencias polinucleotídicas adecuadas para uso como cebadores en la detección del suceso COT102 vía ensayo de cigocidad.

SEC ID NO 21: Secuencia polinucleotídica que caracteriza el suceso COT102.

SEC ID NOs 22-25: Secuencias polinucleotídicas adecuadas para uso como cebadores en la detección del suceso COT102.

Ejemplo ilustrativo 1: Clonación y transformación

1.1 Clonación del vector

Se usaron técnicas de clonación génica estándar de restricción, digestión y ligación de fragmentos de vectores domésticos para construir el vector de transformación, pNOV3001. El vector incluyó un casete marcador seleccionable que comprende un promotor de ubiquitina (UBQ3), una secuencia génica que codifica una proteína que confiere resistencia a higromicina, y una secuencia de poliadenilación nos. El vector también incluyó el casete de expresión del gen diana, casete el cual comprendió un promotor de actina Act2, el intrón Act2, una secuencia que codifica el gen de VIP3A que había sido optimizada en los codones para la expresión en maíz, y una secuencia de poliadenilación nos. El casete marcador seleccionable y el casete que contiene VIP3A se clonaron en la región T-DNA del vector pNOV3001, entre las secuencias frontera izquierda y derecha. El vector también comprendió un gen que confiere resistencia a un antibiótico, espectinomicina, para la selección procariota.

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

1.2 Transformación vegetal

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

Las semillas de Coker 312 se esterilizaron en la superficie durante 30 segundos en etanol al 70% usando suficiente etanol para recuperar la cantidad de semilla a esterilizar. Las semillas se lavaron con etanol, se aclararon con agua estéril y se empaparon en una disolución al 12% de Clorox + Tween 20, durante 20 minutos. El procedimiento de lavado se llevó a cabo 3 veces. Las semillas se colocaron entonces sobre medio de germinación (Stewart y Hsu, 1977) y se dejaron germinar a 30°C durante 7-10 días.

Cultivos de 2 ml de *Agrobacterium* que contiene el constructo pNOV3001 se hicieron crecer toda la noche en antibiótico apropiado, y después se diluyeron con medio MSNH (19:1) en una cápsula de petri estéril. Los hipocotilos se cortaron en longitudes de 6-8 mm y se colocaron en la disolución diluida de *Agrobacterium*, durante al menos 30 segundos. Los explantes de hipocotilos se retiraron de la disolución de *Agrobacterium* y se transfirieron sobre papel de filtro estéril, para eliminar las bacterias en exceso. Los hipocotilos se colocaron en medio T2 (sales MS, vitaminas B5, 0,1 mg/l de 2,4-D, 0,5 mg/ml de cinetina, 30 g/l de glucosa, 2 g/l de Phytigel – pH 5,8), y se cocultivaron con la *Agrobacterium* durante 72 horas en la oscuridad.

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

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

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

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

1.3 Identificación y selección de transgénicos

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

1.4 Verificación de la secuencia de COT102

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

Ejemplo 2: Detección de COT102 vía TaqMan™

2.1 Extracción de ADN

Se extrajo ADN de tejido de hoja usando el Wizard™ Magnetic 96 DNA Plant System (Promega, #FF3760), según las instrucciones del fabricante, con una etapa adicional al comienzo del protocolo: tras la molienda del material de

- 5 hoja, se añadieron a cada pocillo 0,9 ml de tampón de extracción de algodón (0,2M de Tris pH 8,0, 50 mM de EDTA, 0,25M de NaCl, 0,1% v/v de 2-mercaptoetanol, 2,5% p/v de polivinilpirrolidona), el tejido vegetal se resuspendió, y la placa se centrifugó a 4.000 rpm (2755 g) durante 10 minutos. Después de aspirar y desechar el sobrenadante, se añadieron 300 ul de tampón de lisis A (Promega) y se siguió el protocolo del fabricante a partir de este punto. Este procedimiento dio como resultado aproximadamente 85 ul de ADN genómico purificado, a una concentración de aproximadamente 10 ng/ul.

2.2 Reacciones de PCR TaqMan

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

- 10 625 ul 2x Jumpstart Master Mix for Q-PCR (Sigma, #P2893), suplementado con 15 mM de MgCl₂ y 200 nM de Strata-ROX
- 25 ul 50x de mezcla de cebador/sonda FAM
- 25 ul 50x de mezcla de cebador/sonda TET
- 200 ul agua.

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

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

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

Etapas	Temperatura	Tiempo
1	50°C	2 min.
2	95°C	10 min.
3	95°C	15 s
4	60°C	1 min.
5	Vaya a la etapa 3, repítase 40 veces	

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

Ejemplo 3: Detección de COT102 vía PCR

3.1 Extracción de ADN genómico

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

5 3.2 Ensayo de cigosidad de PCR Multiplex

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

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

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

3.3 Análisis

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

3.4 PCR específica del suceso

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

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

Ejemplo ilustrativo 4: Detección de COT102 vía transferencia Southern

4.1 Extracción de ADN para uso en transferencia Southern

40 Se molieron aproximadamente 5 a 10 gramos de tejido vegetal en nitrógeno líquido usando un mortero y mano de almirez. El tejido vegetal se resuspendió en 12,5 ml de tampón de extracción A (0,2M de Tris pH 8,0, 50 mM de EDTA, 0,25M de NaCl, 0,1% v/v de B-mercaptoetanol, 2,5% p/v de polivinilpirrolidona), y se centrifugó durante 10

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

4.2 Digestiones con enzimas de restricción

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

4.3 Electroforesis en gel

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

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

4.4 Hibridación

Se preparó una sonda de ADN adecuada mediante PCR. Se hirvieron 25 ng de ADN de sonda en 45 ul de TE durante 5 minutos, se colocó en hielo durante 7 minutos y después se transfirió a un tubo de Rediprime II (Amersham Pharmacia Biotech, #RPN1633). Tras añadir 5 ul de dCTP marcado con P32 al tubo de Rediprime, la sonda se incubó a 37°C durante 15 minutos. La sonda se purificó mediante centrifugación a través de una columna G50 de microrrotación (Amersham Pharmacia Biotech, #27-553-01) según las instrucciones del fabricante para eliminar dNTPs no incorporados. La actividad de la sonda se midió usando un contador de centelleo.

La membrana Hybond se prehibridó humedeciendo con 20 ml de disolución de prehibridación Church precalentada (500 mM de NaPO₄, 1 mM de EDTA, 7% de SDS, 1% de BSA) a 65°C durante 30 minutos. La sonda marcada se hirvió durante 5 minutos, y se colocó en hielo durante 10 minutos. Se añadió una cantidad apropiada de sonda (1 millón de recuentos por 1 ml de tampón de prehibridación) al tampón de prehibridación, y la hibridación transcurrió a 65°C toda la noche. Al siguiente día, el tampón de hibridación se desechó y le siguió un aclarado con 20 ml de disolución de lavado de Church 1 (40 mM de NaPO₄, 1 mM de EDTA, 5% de SDS, 0,5% de BSA), y la membrana se lavó en 150 ml de disolución de lavado de Church 2 (40 mM de NaPO₄, 1 mM de EDTA, 15% de SDS). La membrana se expuso a una pantalla de fósforo o a una película de rayos X, para detectar dónde se unió la sonda.

Ejemplo ilustrativo 5: Detección de COT102 vía ELISA

5.1 extracción proteica

El tejido de algodón para análisis se cosechó y se congeló a -70°C. Se molió tejido fresco hasta un polvo fino, y se pesó en un tubo de polipropileno marcado. Se añadió a la muestra tampón de extracción (100 mM de Tris, 100 mM de borato de sodio, 5 mM de MgCl, 0,05% de Tween 20, 0,2% de ascorbato de sodio, agua, pH 7,8, 1 mM de AEBSF, 0,001 mM de leupeptina) en una relación de 2:1 (volumen de tampón de extracción: peso de muestra

fresca) para tejido fresco, o 30:1 (volumen de tampón de extracción: peso de muestra seca) para tejido liofilizado. La muestra se sometió a vórtice y se homogeneizó usando un Brinkman PT 10/35 Polytron equipado con un generador reductor de espuma PTA 10TS, hasta que la mezcla se licuó. Los extractos se centrifugaron a 10.000 x g durante 15 minutos. El sobrenadante del extracto proteico se almacenó a 2-8°C.

5 5.2 Protocolo de ELISA

El procedimiento de ELISA usó técnicas estándar según lo siguiente. Se empapó una placa de 96 pocillos en etanol durante 2 horas, y se secó al aire. La placa se revistió con 50 ul de anticuerpo anti-VIP3A de cabra por pocillo, y se incubó toda la noche a 2-8°C. Después de lavar tres veces con disolución de lavado 1X de ELISA (100 mM de Tris, 0,5% de Tween 20, 75 mM de NaCl, pH 8,5), la placa se secó brevemente dando golpecitos hacia arriba y hacia abajo en una toalla de papel. Se añadieron a cada pocillo 150 ul de disolución de bloqueo (10 mM de NaPO₄, 140 mM de NaCl, 1% de BSA, 0,02% de azida sódica, valorado hasta pH 7,4 con NaPi monobásico y NaPi dibásico), seguido de la incubación a temperatura ambiente durante 45 minutos. La placa se lavó 3 veces como se describe anteriormente.

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

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

6.1 Extracción proteica

Se colocó un trozo de tejido de hoja de aproximadamente 2 cm² en un tubo que contiene tampón de extracción. Para extraer la proteína del tejido se usó un agitador plástico, cortando y macerando el tejido.

6.2 Ensayo Dipstick

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

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

7.1 Bioensayos de hojas

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

7.2 Bioensayos de бага

Se saturaron cuatro almohadillas absorbentes con agua, y se colocaron dentro de una copa de plástico grande. Se colocaron tres filtros de vidrio extragrosos, cada uno empapado con 100 ul de agua destilada, en una copa de plástico más pequeña, que se situó entonces dentro de la copa más grande. Se cortó una бага de 1,25 pulgadas de longitud, se sumergió en nistatina 10 mg/ml a 20 mg/ml, y se colocó sobre los filtros en la pequeña copa. Se colocaron 50 larvas de insectos en el cuadrado o бага, y se adjuntó una tapa a la copa más grande. Los cuadrados o bagas se reinfestaron con 50 larvas más después de 7 días.

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

7.3 Bioensayos de hoja liofilizada

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

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

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

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ELLIS, Daniel Murray

NEGROTTO, David Vincent

SHI, Liang

SHOTKOSKI, Frank Arthur

THOMAS, Carla Randall

<120> ALGODÓN INSECTICIDA COT102

<130> 70159

<160> 25

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> motivo nucleotídico COT102

<400> 1

ggcaaatatt caggtaaaca aattga
26

<210> 2

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> motivo nucleotídico COT102

<400> 2

ctatcagtgt ttaataaata tgggca
26

<210> 3

<211> 20

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> motivo nucleotídico COT102

<400> 3

aaggacgtga gcgagatggt
20

10 <210>4

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> motivo nucleotídico COT102

<400> 4

tgtgacaccg atccacctaa
20

<210> 5

<211> 290

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> motivo nucleotídico COT102

<400> 5

gacaaggaca gcttgagcga ggtgatctac ggcgacatgg acaagctgct gtgtccggac
60

cagagcgagc aaatctacta caccaacaac atcgtgttcc cgaacgagta cgtgatcacc
120

aagatcgact tcaccaagaa gatgaagacc ctgcgctacg aggtgaccgc caacttctac
180

gacagcagca ccggcgagat cgacctgaac aagaagaagg tggagagcag cgaggccgag
240

taccgcaccc tgagcgcgaa cgacgacggc gtctacatgc cactgggcgt
290

<210> 6

<211> 347

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> motivo nucleotídico COT102

<400> 6

cgccgtgcac aggggtgtcac gttgcaagac ctgcctgaaa ccgaactgcc cgctgttctg
60

cagccggtcg cggaggccat ggatgcgac gctgcggccg atcttagcca gacgagcggg
120

ttcggcccat tcggaccgca aggaatcggc caatacacta atggcgtgat ttcatatgcg
180

cgattgctga tccccatgtg tatcactggc aaactgtgat ggacgacacc gtcagtgcgt
240

ccgtcgcgca ggctctcgat gagctgatgc tttgggcccga ggactgcccc gaagtccggc
300

acctcgtgca cgcggatttc ggctccaaca atgtcctgac ggacaat
347

10 <210> 7

<211> 7474

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> motivo nucleotídico COT102

<400> 7

gtaaacaaat tgacgcttag acaacttaat aacacattgc ggacgttttt aatgtacgcc
60

atgctggccg cccggggtac ccaattcccg atctagtaac atagatgaca ccgcgcgcga
120

taatttatcc tagtttgccg gctatatatt gttttctatc gcgtattaaa tgtataattg
180

cgggactcta atcataaaaa cccatctcat aaataacgtc atgcattaca tgttaattat
240

tacatgctta acgtaattca acagaaatta tatgataatc atcgcaagac cggcaacagg
300

attcaatctt aagaaacttt attgccaaat gtttgaacga tcggggaaat tcggggatcc
360

cggtcggcat ctactctatt cctttgccct cggacgagtg ctggggcgtc ggtttccact
420

atcggcgagt acttctacac agccatcggc ccagacggcc gcgcttctgc gggcgatttg
480

tgtacgcccc acagtcccg ctcgggatcg gacgattgcg tcgcatcgac cctgcgcccc
540

agctgcatca tcgaaattgc cgtcaaccaa gctctgatag agttgggtcaa gaccaatgcg
600

gagcatatac gcccgagacc gcggcgatcc tgcaagctcc ggatgcctcc gctcgaagta
660

gcgcgtctgc tgctccatac aagccaacca cggcctccag aagaagatgt tggcgacctc
720

gtattgggaa tccccgaaca tcgcctcgct ccagtcaatg accgctgtta tgcggccatt
780

gtccgtcagg acattgttgg agccgaaatc cgcgtgcacg aggtgccgga ctccggggca
840

gtccctcggcc caaagcatca gctcatcgag agcctgcgcg acggacgcac tgacgggtgc
900

gtccatcaca gtttgccagt gatacacatg gggatcagca atcgcgcata tgaaatcacg
960

ccatgtagtg tattgaccga ttccttgccg tccgaatggg ccgaaccgcg tcgtctggct
1020

aagatcggcc gcagcgatcg catccatggc ctccgcgacc ggctgcagaa cagcgggcag
1080

ttcggtttca ggcaggctctt gcaacgtgac accctgtgca cggcgggaga tgcaataggt
1140

caggctctcg ctgaatgccc caatgtcaag cacttccgga atcgggagcg cggccgatgc
1200

aaagtgccga taaacataac gatctttgta gaaaccatcg gcgcagctat ttaccgcgag
1260

gacatatcca cgccctccta catcgaagct gaaagcacga gattcttcgc cctccgagag
1320

ctgcatcagg tcggagacgc tgtcgaactt ttcgatcaga aacttctcga cagacgtcgc
1380

ggtgagttca ggctttttca tatcttattg ccccccctaga gtcgagatcc acctgaaata
1440

aaacaataga acaagtagaa accaatcagc gaacatatac caaatcaaaa gccgtaagag
1500

aatcaaaaac aacaccaaag agaaacggat ctaaacataa gaaacctaaa acagagagaa
1560

tcgaacaaag aaaacacaaa aattgaatag atcgtccttg aaaatcctaa tttcacaatc
1620

aagcaagaaa ttacacagat gtaaactacta cgaatcgata tottagtaat caggacaaaa
1680

tttagaagct ggattgacga aacgaacaat attgtcaaaa gcaatttata caaaagattc
1740

aataatccac ataacaaaaa ttggagatca gatacgaatc aaaaacaaaa agaatcagaa
1800

aatatacctt gaaagagaga gtcgcgagag atttgcagag atcgctttag gctttgggag
1860

agattgaaga gtcagaaaaa gacgaaagga tgaattatta tcttccacac gaagggtcttc
1920

tttatatcgc aaacccaaaag cccaaaaccg tctttttctat taatgagaat aaaatatctt
1980

tagccaaaac aaaaaaagga agatatcagt tgaggattat tatcacgaaa ctaaaggaag
2040

gaatcatatg atacgtgtca tattttccac cgtgcgtttt taaaagaccg actcaagtag
2100

aaacatccta tgggtggtggt tggattaggt catccattac atctgcttca ctgacatttt
2160

tctatttttc tttttgtata tacttttcct caaataattt ctttcttttc tatagaagaa
2220

tttaaatcaat aaggaaaaag ttcaaaaaag attctttcca ttaagactat gtcttggtta
2280

acccaacca ttaagaataa gcaatcataa tatatataga gaataactaat actatatatg
2340

agatttttct ttttaatttca tgttgattat gatagtttat cttcttgatt taatttatca
2400

atacttggca taaaagattc taatctactc taataaagaa aagaaaaaaa agtatctacc
2460

attgactaat taaaataagg aaacttatct accaaatttg agtatttttt agaacaatct
2520

ttttggttta attccaaaac tctaaaccta attggtggga aaaaggacct aatttttaag
2580

aaaagttaat aattagaaga tctgtatggt tttttttgat ccaagttttt atttcttttc
2640

tctttttttc atgataaaat ctatgttttt ttagtctaca attaaagtaa ttgttattat
2700

tttctttatc tttttttggt gttgttggtta attccctttt ttttttttaa cagcaacttc
2760

ttaaaaaaa aaacagttgg gccttgaatt tatttcaggc ctgcgttatt aagcccagat
2820

aataactcaa aacaaaaaaa atgttgaacc ggaataaacc cgcgagatta aatgccggtt
2880

ttcaggtaac atagaagaag aatatatgag gattgaagaa gtattcaaga ggcggaacaa
2940

ttcacaagtc caagagctta aattttctcct cactcttctg ctacagactc ggaactcttt
3000

ctcttttgcta aaataagatg ttcaggattt ttgttgcccg acaattcatg tatctcacac
3060

tctctctctt ctctgttctt actactctgt tacattacca ccaactcaag actttcttcc
3120

acaatggcgt ttatgagact tggctccaaa tccgggtaccg gagctcgaat tcgaagcttg
3180

catgcctgca gtgatcacca tggctcgacaa aatttagaac gaacttaatt atgatctcaa
3240

atacattgat acatatctca tctagatcta gggtatcatt atgtaagaaa gttttgacga
3300

atatggcacg acaaaatggc tagactcgat gtaattggta tctcaactca acattatact
3360

tataccaaac attagttaga caaaatttaa acaactattt tttatgtatg caagagtcag
3420

catatgtata attgattcag aatcgttttg acgagttcgg atgtagtagt agccattatt
3480

taatgtacat actaatcgtg aatagtgaat atgatgaaac attgtatctt attgtataaa
3540

tatccataaa cacatcatga aagacacttt ctttcacggg ctgaattaat tatgatataa
3600

ttctaataga aaacgaatta aattacgttg aattgtatga aatctaattg aacaagccaa
3660

ccacgacgac gactaacgtt gcctggattg actcggttta agttaaccac taaaaaacg
3720

gagctgtcat gtaacacgcg gatcgagcag gtcacagtca tgaagccatc aaagcaaaag
3780

aactaatcca agggctgaga tgattaatta gtttaaaaat tagttaaacac gagggaaaag
3840

gctgtctgac agccagggtca cgttatcttt acctgtggtc gaaatgattc gtgtctgtcg
3900

attttaatta tttttttgaa aggccgaaaa taaagttgta agagataaac ccgcctatat
3960

aaattcatat attttcctct ccgctttgaa ttgtctcggt gtccctctca ctttcatcag
4020

ccgttttgaa tctccggcga cttgacagag aagaacaagg aagaagacta agagagaaa
4080

taagagataa tccaggagat tcattctccg ttttgaatct tcttcaatct catcttcttc
4140

cgctctttct ttccaaggta ataggaactt tctggatcta ctttatttgc tggatctcga
4200

tcttgttttc tcaatttctt tgagatctgg aattcgttta atttggatct gtgaacctcc
4260

actaaatctt ttggttttac tagaatcgat ctaagttgac cgatcagtta gctcgattat
4320

agctaccaga atttggcttg accttgatgg agagatccat gttcatgtta cctgggaaat
4380

gatttgataa tgtgaattga aatctgaact gttgaagtta gattgaatct gaacactgtc
4440

aatgttagat tgaatctgaa cactgtttta ggtagatga agtttggtga tagattcttc
4500

gaaactttag gatttgtagt gtcgtacgtt gaacagaaag ctatttctga ttcaatcagg
4560

gtttatttga ctgtattgaa ctctttttgt gtgtttgcag ctcataaaaa ggatccacca
4620

tgaacaagaa caacaccaag ctgagcaccg gcgccctgcc gagcttcacg gactacttca
4680

acggcatcta cggcttcgcc accggcatca aggacatcat gaacatgatc ttcaagaccg
4740

acaccggcgg cgacctgacc ctggacgaga tctgaagaa ccagcagctg ctgaacgaca
4800

tcagcggcaa gctggacggc gtgaacggca gcctgaacga cctgatcgcc cagggcaacc
4860

tgaacaccga gctgagcaag gagatcctta agatcgccaa cgagcagaac caggtgctga
4920

acgacgtgaa caacaagctg gacgccatca acaccatgct gcgcgtgtac ctgccgaaga
4980

tcaccagcat gctgagcgac gtgatgaagc agaactacgc cctgagcctg cagatcgagt
5040

acctgagcaa gcagctgcag gagatcagcg acaagctgga catcatcaac gtgaacgtcc
5100

tgatcaacag caccctgacc gagatcacc cggcctacca gcgcatcaag tacgtgaacg
5160

agaagttcga agagctgacc ttcgccaccg agaccagcag caaggtgaag aaggacggca
5220

gcccggccga catcctggac gagctgaccg agctgaccga gctggcgaag agcgtgacca
5280

agaacgacgt ggacggcttc gagttctacc tgaacacctt ccacgacgtg atggtgggca
5340

acaacctgtt cggccgcagc gccctgaaga ccgccagcga gctgatcacc aaggagaacg
5400

tgaagaccag cggcagcgag gtgggcaacg tgtacaactt cctgatcgtg ctgaccgccc
5460

tgcaggccca ggccctcctg accctgacca cctgtcgcaa gctgctgggc ctggccgaca
5520

tcgactacac cagcatcatg aacgagcact tgaacaagga gaaggaggag ttccgcgtga
5580

acatcctgcc gaccctgagc aacaccttca gcaacccgaa ctacgccaaag gtgaagggca
5640

gcgacgagga cgccaagatg atcgtggagg ctaagccggg ccacgcgttg atcggcttcg
5700

agatcagcaa cgacagcatc accgtgctga aggtgtacga ggccaagctg aagcagaact
5760

accaggtgga caaggacagc ttgagcgagg tgatctaagg cgacatggac aagctgctgt
5820

gtccggacca gagcgagcaa atctactaca ccaacaacat cgtgttcccg aacgagtacg
5880

tgatcaccaa gatcgacttc accaagaaga tgaagacctt gcgctacgag gtgaccgcca
5940

acttctacga cagcagcacc ggcgagatcg acctgaacaa gaagaagggtg gagagcagcg
6000

agggcgagta ccgcaccctg agcgcgaaacg acgacggcgt ctacatgccca ctgggcgtga
6060

tcagcgagac ctctctgacc ccgatcaacg gctttggcct gcaggccgac gagaacagcc
6120

gcctgatcac cctgacctgt aagagctacc tgccgcgagct gctgctagcc accgacctga
6180

gcaacaagga gaccaagctg atcgtgccac cgagcggctt catcagcaac atcgtggaga
6240

acggcagcat cgaggaggac aacctggagc cgtggaaggc caacaacaag aacgcctacg
6300

tggaccacac cggcggcgtg aacggcacca aggccctgta cgtgcacaag gacggcggca
6360

tcagccagtt catcggcgac aagctgaagc cgaagaccga gtacgtgatc cagtacaccg
6420

tgaagggcaa gccatcgatt cacctgaagg acgagaacac cggctacatc cactacgagg
6480

acaccaacaa caacctggag gactaccaga ccatcaacaa gcgcttcacc accggcaccg
6540

acctgaaggg cgtgtacctg atcctgaaga gccagaacgg cgacgaggcc tggggcgaca
6600

acttcatcat cctggagatc agcccgagcg agaagctgct gagcccgag ctgatcaaca
6660

ccaacaactg gaccagcacc ggcagcacca acatcagcgg caacaccctg accctgtacc
6720

agggcggccg cggcatcctg aagcagaacc tgcagctgga cagcttcagc acctaccgcg
6780

tgtacttcag cgtgagcggc gacgccaacg tgcgcatccg caactccgc gaggtgctgt
6840

tcgagaagag gtacatgagc ggcgccaaagg acgtgagcga gatgttcacc accaagttcg
6900

agaaggacaa cttctacatc gagctgagcc agggcaacaa cctgtacggc ggcccgatcg
6960

tgcacttcta cgacgtgagc atcaagtagg agctctagat ccccgaaattt ccccgatcgt
7020

tcaaacattt ggcaataaag tttcttaaga ttgaatcctg ttgccggtct tgcgatgatt
7080

atcatataat ttctgttgaa ttacgttaag catgtaataa ttaacatgta atgcatgacg
7140

ttatttatga gatgggtttt tatgattaga gtcccgcaat tatacattta atacgcgata
7200

gaaaacaaaa tatagcgcgc aaactaggat aaattatcgc gcgcggtgtc atctatgtta
7260

ctagatcggg aattgggtac cgagctcgaa ttcggcgcgc ccaattgatt taaatggccg
7320

ctgcggccaa ttcctgcagc gttgcgggtc tgtcagttcc aaacgtaaaa cggtttgtcc
7380

cgcgctcatcg gcgggggtca taacgtgact cccttaattc tccgctcatg atcagattgt
7440

cgtttcccg cttcagttta aactatcagt gttt
7474

<210> 8

<211>789

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> motivo proteico VIP3A

<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu	Glu	Asp	Asn	Leu	Glu	Pro	Trp	Lys	Ala	Asn	Asn	Lys	Asn	Ala	Tyr	545	550	555	560
Val	Asp	His	Thr	Gly	Gly	Val	Asn	Gly	Thr	Lys	Ala	Leu	Tyr	Val	His	565	570	575	
Lys	Asp	Gly	Gly	Ile	Ser	Gln	Phe	Ile	Gly	Asp	Lys	Leu	Lys	Pro	Lys	580	585	590	
Thr	Glu	Tyr	Val	Ile	Gln	Tyr	Thr	Val	Lys	Gly	Lys	Pro	Ser	Ile	His	595	600	605	
Leu	Lys	Asp	Glu	Asn	Thr	Gly	Tyr	Ile	His	Tyr	Glu	Asp	Thr	Asn	Asn	610	615	620	
Asn	Leu	Glu	Asp	Tyr	Gln	Thr	Ile	Asn	Lys	Arg	Phe	Thr	Thr	Gly	Thr	625	630	635	640
Asp	Leu	Lys	Gly	Val	Tyr	Leu	Ile	Leu	Lys	Ser	Gln	Asn	Gly	Asp	Glu	645	650	655	
Ala	Trp	Gly	Asp	Asn	Phe	Ile	Ile	Leu	Glu	Ile	Ser	Pro	Ser	Glu	Lys	660	665	670	
Leu	Leu	Ser	Pro	Glu	Leu	Ile	Asn	Thr	Asn	Asn	Trp	Thr	Ser	Thr	Gly	675	680	685	
Ser	Thr	Asn	Ile	Ser	Gly	Asn	Thr	Leu	Thr	Leu	Tyr	Gln	Gly	Gly	Arg	690	695	700	
Gly	Ile	Leu	Lys	Gln	Asn	Leu	Gln	Leu	Asp	Ser	Phe	Ser	Thr	Tyr	Arg	705	710	715	720
Val	Tyr	Phe	Ser	Val	Ser	Gly	Asp	Ala	Asn	Val	Arg	Ile	Arg	Asn	Ser	725	730	735	
Arg	Glu	Val	Leu	Phe	Glu	Lys	Arg	Tyr	Met	Ser	Gly	Ala	Lys	Asp	Val	740	745	750	
Ser	Glu	Met	Phe	Thr	Thr	Lys	Phe	Glu	Lys	Asp	Asn	Phe	Tyr	Ile	Glu	755	760	765	

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

Asp Val Ser Ile Lys
785

<210> 9

<211> 20

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> motivo nucleotídico COT102

<400> 9

ggccccctgga tacggtgtca
20

10 <210> 10

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> motivo nucleotídico COT102

<400> 10

ttgaggggttg gatcctttgc
20

<210> 11

<211> 27

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> motivo nucleotídico COT102

<220>

25 <221> base_modificada

<222> (1)..(1)

<223> marcador TET en el extremo 5'

<220>

<221> base_modificada

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

<223> marcador TAMRA en el extremo 3'

<400> 11

ccaacatcat caatggtggc atcgaat
27

<210> 12

5 <211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> motivo nucleotídico COT102

10 <400> 12

caggcaggtc ttgcaacgt
19

<210> 13

<211> 21

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> motivo nucleotídico COT102

<400> 13

cgagagcctg acctattgca t
21

20 <210> 14

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> motivo nucleotídico COT102

<220>

<221> base_modificada

<222> (1)..(1)

<223> marcador FAM en el extremo 5'

30 <220>

<221> base_modificada

<222> (19)..(19)

<223> marcador TAMRA en el extremo 3'

<400> 14

acaccctgtg cacggcggg
19

<210> 15

<211> 20

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> motivo nucleotídico COT102

<400> 15

atgaagaccc tgcgctacga
20

10

<210> 16

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> motivo nucleotídico COT102

<400> 16

acgcccagtg gcatgtaga
19

<210> 17

20 <211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> motivo nucleotídico COT102

25 <220>

<221> base_modificada

<222> (1)..(1)

<223> marcador FAM en el extremo 5'

<220>

30 <221> base_modificada

<222> (21)..(21)

<223> marcador TAMRA en el extremo 3'

<400> 17

agcgaggccg agtaccgcac c
21

<210> 18

<211> 19

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> motivo nucleotídico COT102

<400> 18

ccaacctatt cttcctctc
19

10 <210> 19

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> motivo nucleotídico COT102

<400> 19

gtatatgctc cgcattggt
19

<210> 20

<211> 19

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> motivo nucleotídico COT102

<400> 20

gtgttgcatt agaagatgt
19

25

<210> 21

<211> 9356

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> motivo nucleotídico COT102

<400> 21

ctatagggca cgcgtggtcg acggcccggg ctggtgtcga aactactttg taatatacaa
60

ccaccttttc agttaaattg catccctaatt tctagccatg ccatgcattt agatattacc
120

tgaatatttc aatcaaaatc catttcctaaa tcatgtaagt .accagcacac aaacaattcc
180

aactaagttc attgatgagc tccactcaac tatttttaaag aaaatctacc ccaatcctta
240

ctgatgagtg aaagcaccta gcagtgtgaa aagaaaacca aatatgcatt gatccatgga
300

cagactaata tgcaacacct tagcactaga taaaatgcaa gactttttcac tctaaatatg
360

accatgttct tctagttaaa attgatgtta attgaaccca gtgtctctta ctttcgattc
420

tattagaaaa cacacaacaa tgccatacaa actgcatttt tccttgaaaa aagaaaatca
480

aacagcaatt gtataaggaa agtggcctta aatatatatt aactgaagat taaatgaaaa
540

cagccaagtg ttcaagtaat tggaaacagc tattccctga ccttaaatat ataaaaaac
600

tgtagattaa aggatatcaa cctcatttaa cactcaagat caaacttacc agtaaacaga
660

gagtaggctt cccctaacat acctatatct tgacagttca gaaaattaca gcataacttt
720

ttcacattgt cctaatacaa tttctaaata catcaaactt tggcaactta gaacaaacct
780

aataaactgc tccaacttgg gcatggacag caaatgtaga tatggacaac tttgacccaa
840

aattcaaaga taaaggcca aaagtggaac cactactagg gtcttttagt cgtaagtgtg
900

gagctgcctt atcctaagtt tcccaaacc ttttatgctt catttgaggt tagaatctcg
960

ggaaggcagg tcttttacia gcgttagcac aatttagttg catcattgtt ggtgccaaac
1020

catttttttc tcaaccaacc tattcttctt ctctgtttta aggtactatt cacagaagaa
1080

gataggtagt ttttaaggag aattactatc caacattagc aaatagaaac ccaactatct
1140

gctggcttca aaatgtagcg acagactaat accaaacaaa accatgagat tgtagagaga
1200

taccttgggt ttgatatgaa tggccgacgt cctcaaaaga gaaatcttcg tttctacat
1260

aattaacaat gccaaagcaa aagatgagta atttggattt tttgaaaaat aaaccaataa
1320

tacaattcaa atatgaaact ttgaaagaaa acactcattg taagatcaaa aaaggcaaat
1380

attcaggtaa acaaattgac gcttagacaa cttaataaca cattgoggac gtttttaatg
1440

tacgccatgc tggccgcccg gggtagccaa ttcccgatct agtaacatag atgacaccgc
1500

gcgcgataat ttatcctagt ttgcgcgcta tattttgttt tctatcgct attaaatgta
1560

taattgcggg actctaata taaaaacca tctcataaat aacgtcatgc attacatggt
1620

aattattaca tgcttaacgt aattcaacag aaattatatg ataatcatcg caagaccggc
1680

aacaggattc aatcttaaga aactttattg ccaaagtgtt gaacgatcgg ggaaattcgg
1740

ggatcccggg cgccatctac tctattcctt tgccctcgga cgagtgcgg ggcgctcggt
1800

tccactatcg gcgagtactt ctacacagcc atcgggtccag acggccgcgc ttctgcgggc
1860

gatttggtga cgcccgacag tcccggctcc ggatcggacg attgcgtcgc atcgaccctg
1920

cgcccaagct gcatcatcga aattgcgctc aaccaagctc tgatagagtt ggtcaagacc
1980

aatgcggagc atatacgccc ggagccgcgg cgatcctgca agctccggat gctccgctc
2040

gaagtagcgc gtctgctgct ccatacaagc caaccacggc ctccagaaga agatgttggc
2100

gacctcgat tgggaatccc cgaacatcgc ctcgctccag tcaatgaccg ctgttatgcg
2160

gccattgtcc gtcaggacat tggtggagcc gaaatccgcg tgcacgaggt gccggacttc
2220

ggggcagtc tcggcccaaa gcatcagctc atcgagagcc tgcgcgacgg acgcactgac
2280

ggtgtcgtcc atcacagttt gccagtata cacatgggga tcagcaatcg cgcatatgaa
2340

atcacgccat gtagtgtatt gaccgattcc ttgcgggtccg aatgggcca acccgctcgt
2400

ctggctaaga tcggccgcag cgatcgcatc catggcctcc gcgaccggct gcagaacagc
2460

gggcagttcg gtttcaggca ggtcttgcaa cgtgacaccc tgtgcacggc gggagatgca
2520

ataggtcagg ctctcgctga atgccccaat gtcaagcact tccggaatcg ggagcgcggc
2580

cgatgcaaag tgccgataaa cataacgac tttgtagaaa ccatcggcgc agctatttac
2640

ccgcaggaca tatccacgcc ctctacatc gaagctgaaa gcacgagatt cttcgccctc
2700

cgagagctgc atcaggtcgg agacgctgtc gaacttttcg atcagaaact tctcgacaga
2760

cgtcgcggtg agttcaggct ttttcatatc ttattgcccc cctagagtcg agatccacct
2820

gaaataaaac aatagaacaa gtagaaacca atcagcgaac atataccaaa tcaaaagccg
2880

taagagaaat caaaacaaca ccaaagagaa acggatctaa acataagaaa cctaaaacag
2940

agagaatcga acaaagaaaa cacaaaaatt gaatagatcg tccttgaaaa tcctaatttc
3000

acaatcaagc aagaaattac acagatgtaa aactacgaa tcgatatctt agtaatcagg
3060

acaaaattta gaagctggat tgacgaaacg aacaatattg tcaaaagcaa tttatacaaa
3120

agattcaata atccacataa caaaaattgg agatcagata cgaatcaaaa acaaaaagaa
3180

tcagaaaata taccttgaaa gagagagtcg cgagagattt gcagagatcg ctttaggctt
3240

tgggagagat tgaagagtca gaaaaagacg aaaggatgaa ttattatctt ccacacgaag
3300

gtcttcttta tatcgcaaac caaaagccca aaaccgtctt ttctattaat gagaataaaa
3360

tatcttttagc caaaacaaaa aaaggaagat atcagttgag gattattatc acgaaactaa
3420

aggaaggaat catatgatac gtgtcatatt ttccaccgtg cgtttttaaa agaccgactc
3480

aagtagaaac atcctatggt ggtggttgga ttaggtcatc cattacatct gcttcactga
3540

cattttttcta tttttctttt tgtatatact tttcctcaaa taattttcttt cttttctata
3600

gaagaattta atcaataagg aaaaagttca aaaaagattc tttccattaa gactatgtct
3660

tggttaaccc aaccatttaa gaataagcaa tcataatata tatagagaat actaatacta
3720

tatatgagat ttttctttta atttcatgtt gattatgata gtttatcttc ttgatttaat
3780

ttatcaatac ttggcataaa agattcta'at ctactcta'at aaagaaaaga aaaaaagta
3840

tctaccattg actaattaaa ataaggaaac ttatctacca aatttgagta ttttttagaa
3900

caatcttttt ggtttaattc caaaactcta aacctaattg ttgggaaaaa ggacctaat
3960

tttaagaaaa gttaataatt agaagatctg tatgtttttt tttgatccaa gtttttattt
4020

cttttctctt tttttcatga taaaatctat gtttttttag tctacaatta aagtaattgt
4080

tattattttc tttatctttt tttgttggtg ttgttaattc cttttttttt ttttaacagc
4140

aacttcttaa aaaaaaaaaac agttgggcct tgaatttatt tcaggcctgc gttattaagc
4200

ccagataata actcaaaaca aaaaaaatgt tgaaccggaa taaaccgcgc agattaaatg
4260

ccggttttca ggtaacatag aagaagaata tatgaggatt gaagaagtat tcaagaggcg
4320

gaacaattca caagtccaag agcttaaatt tctcctcact cttctgctac agactcggaa
4380

ctctttctct ttgctaaaat aagatgttca ggatttttgt tgcccgacaa ttcattgata
4440

tcacactctc tctcttctct gttcttacta ctctgttaca ttaccaccaa ctcaagactt
4500

tcttcacaa tggcgtttat gagacttggc tccaaatccg gtaccggagc tcgaattcga
4560

agcttgcatt cctgcagtga tcaccatggt cgacaaaatt tagaacgaac ttaattatga
4620

tctcaaatac attgatacat atctcatcta gatctagggt atcattatgt aagaaagttt
4680

tgacgaatat ggcacgacaa aatggctaga ctcgatgtaa ttggtatctc aactcaacat
4740

tatacttata ccaaacatta gttagacaaa atttaaacaa ctatttttta tgtatgcaag
4800

agtcagcata tgtataattg attcagaatc gttttgacga gttcggatgt agtagtagcc
4860

attatttaat gtacatacta atcgtgaata gtgaatatga tgaaacattg tatcttattg
4920

tataaatatc cataaacaca tcatgaaaga cactttcttt cacggtctga attaattatg
4980

atacaattct aatagaaaac gaattaaatt acgttgaatt gtatgaaatc taattgaaca
5040

agccaaccac gacgacgact aacgttgctt ggattgactc ggtttaagtt aaccactaaa
5100

aaaacggagc tgtcatgtaa cacgcggatc gagcagggtc cagtcatgaa gccatcaaag
5160

caaaagaact aatccaaggg ctgagatgat taattagttt aaaaattagt taacacgagg
5220

gaaaaggctg tctgacagcc aggtcacgtt atctttacct gtggtcgaaa tgattcgtgt
5280

ctgtcgattt taattatttt tttgaaaggc cgaaaataaa gttgtaagag ataaaccgcg
5340

ctatataaat tcatatattt tctctctcgc tttgaattgt ctcgttgtcc tcttcacttt
5400

catcagccgt tttgaatctc cggcgacttg acagagaaga acaaggaaga agactaagag
5460

agaaagtaag agataatcca ggagattcat tctccgtttt gaatcttctt caatctcatc
5520

ttcttccgct ctttctttcc aaggtaatag gaactttctg gatctacttt atttgctgga
5580

tctcgatctt gttttctcaa tttccttgag atctggaatt cgtttaattt ggatctgtga
5640

acctccacta aatcttttgg ttttactaga atcgatctaa gttgaccgat cagttagctc
5700

gattatagct accagaattt ggcttgacct tgatggagag atccatgttc atgttacctg
5760

ggaaatgatt tgtatatgtg aattgaaatc tgaactgttg aagttagatt gaatctgaac
5820

actgtcaatg ttagattgaa tctgaacact gtttaagggt agatgaagtt tgtgtataga
5880

ttcttcgaaa ctttaggatt tgtagtgtcg tacgttgaac agaaagctat ttctgattca
5940

atcaggggtt atttgactgt attgaactct ttttgtgtgt ttgcagctca taaaaaggat
6000

ccaccatgaa caagaacaac accaagctga gcacccgcgc cctgccgagc ttcacgact
6060

acttcaacgg catctacggc ttgccaccg gcaccaagga catcatgaac atgatcttca
6120

agaccgacac cggcggcgac ctgaccctgg acgagatcct gaagaaccag cagctgctga
6180

acgacatcag cggcaagctg gacggcgtga acggcagcct gaacgacctg atcgcccagg
6240

gcaacctgaa caccgagctg agcaaggaga tccttaagat cgccaacgag cagaaccagg
6300

tgctgaacga cgtgaacaac aagctggacg ccatcaacac catgctgcgc gtgtacctgc
6360

cgaagatcac cagcatgctg agcgacgtga tgaagcagaa ctacgcctg agcctgcaga
6420

tcgagtacct gagcaagcag ctgcaggaga tcagcgacaa gctggacatc atcaacgtga
6480

acgtcctgat caacagcacc ctgaccgaga tcaccccggc ctaccagcgc atcaagtacg
6540

tgaacgagaa gttcgaagag ctgaccttcg ccaccgagac cagcagcaag gtgaagaagg
6600

acggcagccc ggccgacatc ctggacgagc tgaccgagct gaccgagctg gcgaagagcg
6660

tgaccaagaa cgacgtggac ggcttcgagt tctacctgaa caccttccac gacgtgatgg
6720

tgggcaacaa cctgttcggc cgcagcgcgc tgaagaccgc cagcgagctg atcaccaagg
6780

agaacgtgaa gaccagcggc agcgaggtgg gcaacgtgta caacttcctg atcgtgctga
6840

ccgccctgca ggcccaggcc ttectgaccc tgaccacctg tcgcaagctg ctgggcctgg
6900

ccgacatcga ctacaccagc atcatgaacg agcacttgaa caaggagaag gaggagtcc
6960

gcgtgaacat cctgccgacc ctgagcaaca ccttcagcaa cccgaactac gccaaaggta
7020

agggcagcga cgaggacgcc aagatgatcg tggaggctaa gccgggccac gcgttgatcg
7080

gcttcgagat cagcaacgac agcatcaccg tgctgaaggt gtacgaggcc aagctgaagc
7140

agaactacca ggtggacaag gacagcttga gcgaggtgat ctacggcgac atggacaagc
7200

tgctgtgtcc ggaccagagc gagcaaattc actacaccaa caacatcgtg ttcccgaacg
7260

agtacgtgat caccaagatc gacttcacca agaagatgaa gaccctgcgc tacgaggtga
7320

ccgccaaactt ctacgacagc agcaccggcg agatcgacct gaacaagaag aagggtggaga
7380

gcagcgaggc cgagtaccgc accctgagcg cgaacgacga cggcgtctac atgccactgg
7440

gcgtgatcag cgagaccttc ctgaccccgga tcaacggctt tggcctgcag gccgacgaga
7500

acagccgcct gatcacctg acctgtaaga gctacctgcg cgagctgctg ctagccaccg
7560

acctgagcaa caaggagacc aagctgatcg tgccaccgag cggcttcacg agcaacatcg
7620

tggagaacgg cagcatcgag gaggacaacc tggagccgtg gaaggccaac aacaagaacg
7680

cctacgtgga ccacaccggc ggcgtgaacg gcaccaaggc cctgtacgtg cacaaggacg
7740

gcggcatcag ccagttcatc ggcgacaagc tgaagccgaa gaccgagtac gtgatccagt
7800

acaccgtgaa gggcaagcca tcgattcacc tgaaggacga gaacaccggc tacatccact
7860

acgaggacac caacaacaac ctggaggact accagaccat caacaagcgc ttcaccaccg
7920

gcaccgacct gaagggcgtg tacctgatcc tgaagagcca gaacggcgac gaggcctggg
7980

gcgacaactt catcatcctg gagatcagcc cgagcgagaa gctgctgagc ccggagctga
8040

tcaacaccaa caactggacc agcaccggca gcaccaacat cagcggcaac accctgaccc
8100

tgtaccaggg cggccgcggc atcctgaagc agaacctgca gctggacagc ttcagcacct
8160

accgcgtgta cttcagcgtg agcggcgacg ccaacgtgcg catccgcaac tcccgcgagg
8220

tgctgttcga gaagaggtag atgagcggcg ccaaggacgt gagcgagatg ttcaccacca
8280

agttcgagaa ggacaacttc tacatcgagc tgagccaggg caacaacctg tacggcggcc
8340

cgatcgtgca cttctacgac gtgagcatca agtaggagct ctagatcccc gaatttcccc
8400

gatcgttcaa acatttggca ataaagtctt ttaagattga atcctgttgc cggctctgcg
8460

atgattatca tataatttct gttgaattac gttaagcatg taataattaa catgtaatgc
8520

atgacgttat ttatgagatg gggttttatg attagagtcc cgcaattata catttaatac
8580

gcgatagaaa acaaaatata gcgcgcaaac taggataaat tatcgcgcgc ggtgtcatct
8640

atgttactag atcgggaatt gggtagcgag ctcgaaattcg gcgcgcccaa ttgatttaaa
8700

tggccgctgc ggccaattcc tgcagcgttg cggttctgtc agttccaaac gtaaaacggc
8760

ttgtcccgcg tcatcggcgg gggtcataac gtgactccct taattctccg ctcgatgaca
8820

gattgtcgtt tccgccttc agtttaaact atcagtgttt aataaatatg ggcaatcttt
8880

ccctacaccg actgtactgt tactgtaata gactccggcc tagactgatt ctgaattctg
8940

tctgtttact gactgttact ctagtaaggg gattacacac tgagtttttag taaactcacc
9000

ccgtttatta actgtgcagg taatccccaa cattaggtgg atcggtgtca cagaaggact
9060

cggagacgac cacacaactg cacatgtttt tttatttcgt ttatttagtc aagcactttg
9120

gtttttgatt tgggttgat taaggcctct ttattttctt aaccttttat ttgggaaatt
9180

tatttagtat gcttaatata tgtagaagt agggcacggg ttccaaaac aacaattggc
9240

ttccaaaata tctcgtttcc gtaactgttt aaaagtatgc ttctgcagca aataaggttt
9300

taaggggaatt aacgtttcac aagttttaaa tggctagagg ttttgagtag taagaa
9356

<210> 22

<211> 20

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> motivo nucleotídico COT102

<400> 22

gatcgggggtc aggaaggtct
20

10 <210> 23

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> motivo nucleotídico COT102

<400> 23

cagcatcatg aacgagcact
20

<210> 24

<211> 20

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> motivo nucleotídico COT102

<400> 24

cagcgagagc ctgacctatt
20

5 <210> 25

<211 > 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> motivo nucleotídico COT102

<400> 25

caggacattg ttggagccga
20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un par de cebadores para detectar la presencia de ácidos nucleicos específicos para el suceso COT102 en una muestra biológica, comprendiendo el par de cebadores un primer cebador y un segundo cebador diseñados para unirse a un polinucleótido que comprende al menos 20 nucleótidos contiguos de SEC ID NO: 1 o SEC ID NO: 2 cuando dicho polinucleótido es monocatenario, en el que el primer cebador y el segundo cebador, cuando se usan juntos en una reacción de PCR, producen un amplicón que comprende al menos una secuencia de SEC ID NO: 1 o SEC ID NO: 2, y en el que la producción de un amplicón es indicativa de ácidos nucleicos específicos para el suceso COT102.
- 10 2. El par de cebadores según la reivindicación 1, en el que el primer cebador se diseña para unirse a una secuencia de ADN específica para el sitio de inserción de COT102, y el segundo cebador se diseña para unirse a una secuencia de ADN genómico flanqueante en dirección 3' del extremo 3' del sitio de inserción de COT102, o a una secuencia de ADN genómico flanqueante en dirección 5' del extremo 5' del sitio de inserción de COT102, en el que el sitio de inserción de COT102 comprende la secuencia de SEC ID NO: 1 o SEC ID NO: 2.
- 15 3. Un par de cebadores según la reivindicación 2, en el que el primer cebador tiene la secuencia de SEC ID NO: 3, y el segundo cebador tiene la secuencia de SEC ID NO: 4.
4. Un par de cebadores según la reivindicación 2, en el que el primer cebador tiene la secuencia de SEC ID NO: 19, y el segundo cebador tiene la secuencia de SEC ID NO: 18.