

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 498 976**

51 Int. Cl.:

C12N 15/29 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2007 E 07797736 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.07.2014 EP 2021476**

54 Título: **Planta y semilla de maíz correspondiente al evento transgénico MON89034 y procedimientos para su detección y uso**

30 Prioridad:

26.05.2006 US 808834 P

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

26.09.2014

73 Titular/es:

**MONSANTO TECHNOLOGY, LLC (100.0%)
MAIL ZONE E2NA 800 NORTH LINDBERGH
BOULEVARD
ST LOUIS MO 63167, US**

72 Inventor/es:

**ANDERSON, HEATHER;
DOUGLAS, JENNIFER;
GROAT, JEANNA;
JOHNSON, SCOTT;
KELLY, REBECCA;
KORTE, JOHN y
RICE, JAMES**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 498 976 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

Planta y semilla de maíz correspondiente al evento transgénico MON89034 y procedimientos para su detección y uso

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a plantas de maíz transgénicas (evento de maíz MON89034) y a partes de plantas y semillas de las mismas que exhiben resistencia a la infestación por insectos con insectos del orden Lepidoptera. La invención también se refiere a procedimientos para usar plantas y semillas que comprenden ADN que son diagnósticos para la presencia del evento transgénico cuando sondan para la presencia de secuencias de nucleótidos que son únicas del evento transgénico, y a procedimientos para detectar la presencia de dicho evento de
10 maíz en una muestra biológica detectando secuencias de nucleótidos específicas que son únicas del evento transgénico. La invención proporciona secuencias de nucleótidos que son únicas del evento.

Antecedentes de la invención

15 La presente invención se refiere a la variedad transgénica resistente a lepidópteros de la planta de maíz (*Zea mays*) denominada en el presente documento evento MON89034 y a secuencias de AND únicas presentes que, cuando se detectan en cualquier muestra o variedad de maíz, es diagnóstica de la presencia del evento de la planta de maíz transgénico MON89034 en dicha muestra o variedad, y también se refiere a la detección de la región de inserción transgénica/genómica en MON89034 de maíz y a plantas y semillas de la progenie derivadas de los mismos.

20 El evento de la planta de maíz MON89034 es particularmente resistente a insectos de la familia de los lepidópteros, tales como cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*), taladro europeo del maíz (*Ostrinia nubilalis*), gusano elotero del maíz (*Helicoverpa zea*), talador del maíz del suroeste (*Diatraea grandiosella*), y gusano gris (*Agrotis ipsilon*) y similares, todos los cuales sin plagas de insectos agrónomicamente importantes.

25 El maíz es un cultivo importante y es una fuente de alimentación fundamental en muchas zonas del mundo. Se han aplicado al maíz procedimientos de biotecnología con objeto de mejorar los rasgos agronómicos y la calidad del producto. Uno de estos rasgos agronómicos es la resistencia a los insectos, por ejemplo la resistencia modificada genéticamente a especies de lepidópteros y de coleópteros que emerge en las plantas de maíz modificadas genéticamente para que contengan uno o más genes que codifican agentes insecticidas (véase, por ejemplo, el documento WO 2004/020636, la patente de EE.UU. 6.489.542 y la patente de EE.UU. 6.620.988). Es ventajoso detectar la presencia de un evento transgénico concreto en una muestra biológica para determinar su una o más
30 progenies de un cruce sexual contienen el material transgénico. Por ejemplo, la detección del evento en una muestra es importante con fines licenciatarios, para establecer y mantener las normas de pureza, importante para cumplir con las agencias reguladoras, para cumplir las normas relacionadas con los ingredientes alimentarios, para usar en procedimientos legales con el fin de establecer si uno o más individuos o entidades ha estado usando el evento concreto sin una licencia del propietario o licenciatario de cualquier patente dirigida al evento transgénico y para asegurar el cumplimiento de varios reglamentos y/o legislaciones gubernamentales.

35 Además, los procedimientos que permiten la detección de una planta concreta serían útiles para cumplir los reglamentos que requiere la preaprobación para el mercado y etiquetado de alimentos derivados de las plantas de cultivos recombinantes. Los individuos o entidades resistentes a la presencia de un evento transgénico en una muestra también desean procedimientos fiables para detectar la presencia del transgén en una muestra con el fin de poder capitalizar sus negocios, lo que se aprovecha de una ausencia de transgenes en sus productos.

40 A pesar de estas ventajas, es posible que los insectos puedan desarrollar resistencias a las plantas que solo expresen una endotoxina δ de *B. thuringiensis*. Dicha resistencia, si se extiende, limitaría claramente el valor comercial del germoplasma que contiene genes únicos de Bt.

45 Un posible modo de aumentar la eficacia de los agentes insecticidas proporcionados mediante plantas transgénicas y dirigidos al control de plagas de insectos diana y de reducir de forma contemporánea la probabilidad de emergencia de plagas de insectos resistentes a dichos agentes insecticidas sería asegurar que dichos cultivos transgénicos expresan niveles altos de estos agentes insecticidas, tales como endotoxinas delta de *Bacillus thuringiensis* (McGaughey y Whalon (1992), *Science* 258:1451-55; Roush (1994) *Biocontrol. Sci. Technol.* 4:501-516). Además, tener un depósito de genes insecticidas que son eficaces contra grupos de plagas de insectos y que manifiestan sus efectos a través de diferentes modos de acción puede proteger contra el desarrollo de resistencia. El inicio de la resistencia podría retrasarse sustancialmente como resultado de proporcionar un cultivo que exprese dos o más actividades insecticidas que exhiban toxicidad solapante con las mismas especies de insectos. Un medio para alcanzar dichos modos de acción duales podría proporcionar una planta que expresa un gen Bt tóxico para una especie de insecto concreto junto con un ARNs que se proporciona para los fines de dirigir la supresión de un gen
50 esencial de la misma especie de insecto dirigido por la toxina Bt, provocando el ARNs una respuesta de ARNi tras a ingestión por la plaga diana, lo que proporciona un medio para la redundancia del evento que el insecto desarrolle

resistencia al ARNds o al gen Bt. Como alternativa, la coexpresión en una planta de dos o más toxinas insecticidas tóxicas ambas a la misma especie de insecto pero cada una con un modo diferente de efectuar su actividad de destrucción, en particular cuando ambos se expresan a niveles altos, proporciona un medio para el control eficaz de la resistencia. Ejemplos de dichos insecticidas útiles en dichas combinaciones incluyen, entre otros, toxinas de Bt, proteínas insecticidas de *Xenorhabdus* sp. o *Photorhabdus* sp, proteínas y/o permutéinas de patatina desalegernizadas y desglucosiladas, lectinas vegetales y similares.

La expresión de genes extraños en plantas se sabe que está influida por su posición en el cromosoma, quizá a causa de la estructura de la cromatina (p. ej., heterocromatina) o la proximidad de elementos de regulación de la transcripción (p. ej, potenciadores) cercanos al sitio de integración (Weising et al.(19880 Ann. Rev. Genet 22:421-477). Por esta razón, a menudo es necesario realizar una detección selectiva de un gran número de eventos con el fin de identificar cualquier evento caracterizado por la expresión óptima de un gen de interés introducido. Incluso entonces, con docenas o incluso cientos de diferentes eventos transgénicos a mano, no existe certeza de éxito en la identificación de un único evento transgénico que proporcione los niveles óptimos de expresión de al menos dos toxinas o agentes insecticidas diferentes y carece de deficiencias agronómicas indeseables o de efectos fitotóxicos, bien como resultado de la inserción en alguna región esencial o parcialmente esencial del genoma vegetal o como resultado de efectos tóxicos producidos por los niveles de expresión de los transgenes. Por ejemplo, se ha observado en plantas y en otros organismos que puede haber una amplia variación en los niveles de expresión de un gen introducido entre los eventos. También puede haber diferencias en los patrones de expresión espaciales y temporales, por ejemplo diferencias en la expresión relativa de un transgén en varios tejidos vegetales, que pueden no corresponder con los patrones previstos a partir de elementos reguladores de la transcripción presentes en la construcción génica introducida. Por este motivo, es habitual producir varios cientos o varios miles de eventos diferentes y cribar los eventos para buscar un único evento que tenga los niveles de expresión del transgén deseado y los patrones para fines comerciales. Un evento que tiene los niveles o patrones deseados de la expresión del transgén es útil para la introgresión del transgén en otros fondos genéticos mediante cruzamiento sexual usando métodos de cultivo convencionales. La progenie de dichos cruces mantiene las características de la expresión del transgén del transformante original. Esta estrategia se usa para garantizar una expresión génica fiable en una serie de variedades que están adaptadas adecuadamente a las condiciones de crecimiento local específicas.

Es posible detectar la presencia de un transgén mediante cualquier procedimiento de detección de ácido nucleico conocido, tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o hibridación de ADN usando sondas de ácido nucleico. Estos procedimientos de detección generalmente se centran en elementos genéticos usados con frecuencia, tales como promotores, terminadores, genes marcadores o incluso la secuencia de codificación que codifica la proteína o ARNds de interés expresada a partir del o los transgenes etc. Como resultado, dichos procedimientos pueden no ser útiles para discriminar entre eventos diferentes, en particular los producidos usando la misma construcción de ADN, a menos que se conozca la secuencia del ADN cromosómico adyacente al ADN insertado ("ADN flanqueante"), Dependiendo del procedimiento usado para introducir el o los transgenes en un genoma vegetal, se pueden observar efectos aberrantes o inusuales, lo que a menudo complica mucho la identificación de las secuencias del genoma vegetal que flanquean el ADN transgénico que se quería introducir en la planta. A menudo, los reordenamientos del ADN insertado, reordenamientos del ADN del genoma flanqueante o reordenaciones del ADN insertado o del ADN del genoma flanqueante son prevalentes y complican el análisis del evento de inserción que se está evaluando. Por tanto, es una ventaja tener un medio para seleccionar, identificar y garantizar la pureza y las características de un evento transgénico concreto en una muestra y el único modo de conseguir esto es identificar una o más secuencias únicas asociadas únicamente con el evento transgénico deseado y la presencia de dichas secuencias en una muestra biológica que contiene el ADN de la especie vegetal en la que se insertó el ADN transgénico para dar lugar al evento son, por tanto, diagnósticos del evento en dicha muestra.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a una planta de maíz, o partes de la misma o semillas de la misma o progenie de la misma, resistente a insectos, que comprende una molécula de ADN que codifica Cry2Ab y Cry1A.105 en el genoma en las células de dicha planta de maíz, partes de la misma o progenie de la misma, en la que la molécula de ADN comprende los elementos siguientes: promotor e35S, líder sin traducir CAB de trigo, intrón de la actina del arroz, secuencia de codificación para Cry1A.105, secuencia de terminación y poliadenilación de HSP17 3' de trigo, promotor de FMV, intrón hsp70, secuencia de codificación del péptido dirigido a la subunidad pequeña en el cloroplasto de rubisco, secuencia de codificación de Cry2Ab, secuencia señal de poliadenilación y de terminación de nos en ', en la que los extremos colocados opuestos de dicha molécula de ADN son un ADN que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 1 y un ADN que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 2, y en la que dicha molécula de ADN está presente en el evento de maíz MON89034 depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) con nº de acceso PTA-7455. Las partes de la planta del evento de maíz MON89034 incluyen polen, óvulos, flores, brotes, raíces, tallos, barbas, panochas, mazorcas y hojas, siempre que estas partes contengan al menos los polinucleótidos tal como se ha indicado anteriormente. Un aspecto de la presente invención son nuevas composiciones genéticas contenidas en el genoma de las plantas de maíz mencionadas anteriormente y productos de la planta de maíz mencionada anteriormente, tales como harina, aceite, pulpa y biomasa que queda en un campo de dichas plantas de maíz.

De acuerdo con un aspecto de la invención se proporcionan composiciones y procedimientos para detectar la presencia de la región de inserción del transgén/genómica de una planta de maíz nueva designado MON89034. Se proporcionan secuencias de ADN que comprenden al menos una secuencia de unión de MON89034 seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID N° 1 (localizada en las posiciones 2051 a 2071 de la SEC ID N° 5) y la SEC ID N° 2 (localizada en las posiciones 11295 a 11314) y complementarias de las mismas; en las que una secuencia de unión abarca la unión entre el ADN heterólogo insertado en el genoma y el ADN de la célula de maíz que flanquea el sitio de inserción y es diagnóstica del evento (Figura 1). Un evento de maíz MON89034 y semilla que comprende moléculas de ADN es un aspecto de la presente invención.

Las secuencias de ADN que comprenden la nueva región de inserción del transgén/genómica, SEC ID N° 3 y SEC ID N° 4 (Figura 1) de un evento de maíz MON89034 se divulgan en el presente documento.

De acuerdo con otro aspecto de la invención se proporcionan dos moléculas de ADN para usar en un procedimiento de detección de ADN, en el que dicha primera molécula de ADN comprende al menos 18 nucleótidos contiguos de cualquier porción de la región del transgén de la SEC ID N° 3 o la SEC ID N° 5 o complementarias de las mismas, y dicha segunda molécula de ADN comprende una longitud similar de una región de ADN genómico de maíz flanqueante en 5' de la SEC ID N° 3 o complementaria de la misma para funcionar como cebadores de ADN o sondas diagnósticas para el ADN extraído de la planta de maíz MON89034 o progenie de la misma, en las que estas moléculas de ADN, cuando se usan juntas, son útiles como cebadores de ADN en un procedimiento de amplificación de ADN que produce un amplicón. El amplicón producido usando estos cebadores de ADN en el procedimiento de amplificación de ADN es diagnóstico del evento de maíz MON89034 cuando el amplicón contiene la SEC ID N° 1.

De acuerdo con otro aspecto de la invención se proporcionan dos moléculas de ADN para usar en un procedimiento de detección de ADN, en el que dicha primera molécula de ADN comprende al menos 18 nucleótidos contiguos de cualquier porción de la región del transgén de la SEC ID N° 4 o la SEC ID N° 5 o complementarias de las mismas, y dicha segunda molécula de ADN comprende una longitud similar de una región de ADN genómico de maíz flanqueante en 3' de la SEC ID N° 4 o complementaria de la misma para funcionar como cebadores de ADN o sondas diagnósticas para el ADN extraído de la planta de maíz MON89034 o progenie de la misma, en las que estas moléculas de ADN son útiles como cebadores de ADN en un procedimiento de amplificación de ADN. El amplicón producido usando estos cebadores de ADN en el procedimiento de amplificación de ADN es diagnóstico del evento de maíz MON89034 cuando el amplicón contiene la SEC ID N° 2.

De acuerdo con otro aspecto de la invención se proporcionan procedimientos de detección de la presencia de ADN que corresponde al evento de maíz MON89034 en una muestra. Dichos procedimientos comprenden: (a) poner en contacto la muestra que comprende ADN con un conjunto de cebadores que, cuando se usa en una reacción de amplificación de ácido nucleico con ADN genómico del evento de maíz MON89034, produce un amplicón que es diagnóstico para el evento de maíz MON89034, (b) realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico, de modo que se produce el amplicón; y (c) detectar el amplicón, en el que dicho amplicón comprende la SEC ID N° 1 o la SEC ID N° 2.

De acuerdo con otro aspecto de la invención se proporcionan procedimientos de detección de la presencia de ADN que corresponde al evento de maíz MON89034 en una muestra, comprendiendo dichos procedimientos: (a) poner en contacto la muestra que comprende ADN con una sonda que hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con ADN genómico del evento de maíz MON89034 y no hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con una planta de maíz control; (b) someter la muestra y la sonda a condiciones de hibridación rigurosas y (c) detectar la hibridación de la sonda con el ADN del evento de maíz MON89034, en el que dicha sonda comprende la SEC ID N° 1 y la SEC ID N° 2.

Otro aspecto de la invención es un procedimiento de determinar la cigosidad de la progenie del evento de maíz MON89034, que comprende: (a) poner en contacto la muestra que comprende ADN de maíz con un conjunto de cebadores que comprende SQ2842 (SEC ID N° 6), SQ2843 (SEC ID N° 7), SQ6523 (SEC ID N° 10), SQ6524 (SEC ID N° 11), PB880 (SEC ID N° : 14) y PB2931 (SEC ID N° 15) que cuando se usan en una reacción de amplificación de ácido nucleico con ADN genómico del evento de maíz MON89034, produce un primer amplicón que es diagnóstico para el evento de maíz MON89034 y (b) realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico, de modo que se produce el primer amplicón; y (c) detectar el primer amplicón; y (d) poner en contacto la muestra que comprende ADN de maíz con dicho conjunto de cebadores que, cuando se usa en una reacción de amplificación de ácido nucleico con ADN genómico de plantas de maíz produce un segundo amplicón que comprende el ADN genómico de maíz nativo homólogo de la región genómica de maíz de una inserción transgénica identificada como evento de maíz MON89034 y (e) realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico, de modo que se produce el segundo amplicón y (f) detectar el segundo amplicón; y (g) comparar los amplicones primero y segundo en una muestra, en la que la presencia de ambos amplicones indica que la muestra es heterocigota para la inserción del transgén.

Otro aspecto de la presente invención es proporcionar una composición o muestra biológica en forma de un producto o alimento que deriva del evento de maíz MON89034, comprendiendo el producto o alimento mazorcas de maíz, cáscara de maíz, barbas de maíz, polen de maíz, maíz triturado, harina de maíz, maíz molido, harina de maíz, aceite de maíz, almidón de maíz, licor de maceración del maíz, malta de maíz, azúcar de maíz, jarabe de maíz,

margarina producida a partir de aceite de maíz, aceite de maíz insaturado, de maíz saturado, copos de maíz, palomitas de maíz, etanol y/o licor producidos a partir de maíz o productos de maíz que comprenden ADN diagnóstico para el evento de maíz MON89034, sólidos de productos secos de destilación (DDGS) producidos por la fermentación de dicho evento de maíz y piensos animales que comprenden dichos DDGS y/o maíz, alimentos procesados enteros, triturados o molidos, un cosmético y un agente formador de volumen en el que se encuentra una cantidad detectable de un polinucleótido que es diagnóstico de la presencia de un evento de maíz transgénico MON89034 en la muestra biológica. Un medio alternativo de proporcionar maíz como producto alimentario es proporcionar el maíz en varias formas de grano para alimentación, tales como maíz entero, maíz triturado, maíz molido y varias formas de los anteriores en una mezcla con sorgo, sebo, mijo, girasol, avenas, trigo, arroz, judías y similares. Cantidades detectables de una secuencia de nucleótidos en dicho producto o producto alimentario tal como se indica en la SE ID N° 1 o la SEC ID N° 2, o sus complementarias, son diagnósticas de la presencia de dicho ADN de evento transgénico MON89034 en la muestra y, por tanto, la presencia de las células del evento transgénico que han originado el ADN en la muestra,

Los anteriores y otros aspectos de la invención serán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada.

15 Figuras

Figura 1. Organización del inserto del transgén presente dentro del genoma del evento de maíz transgénico MON89034. La barra abierta o blanca central representa el ADN insertado. Debajo de la barra blanca hay un diagrama que representa los diversos elementos dentro del ADN insertado. Los extremos del ADN insertado se han designado de forma arbitraria como 5' (a la izquierda de la Figura) y 3' (a la derecha de la Figura). Las secuencias y segmentos del borde derecho y del borde izquierdo están etiquetados debajo de cada extremo del diagrama que ilustra los diversos elementos dentro del ADN insertado. Los elementos etiquetados en los casetes de expresión dentro del ADN insertado son, en orden consecutivo comenzando desde el borde derecho: Promotor e35S, líder sin traducir de CAB de trigo, intrón de la actina del arroz, secuencia de codificación para Cry1A.105, secuencia de poliadenilación y de terminación de HSP17 3', promotor del FMV, intrón del hsp70, secuencia de codificación de péptido dirigido a la subunidad pequeña de rubisco en cloroplastos, secuencia de codificación Cry2Ab, secuencia señal de poliadenilación y terminación nos 3' y, después, el borde izquierdo. Las barras tramadas verticalmente en cualquiera de los extremos de la barra blanca o abierta central corresponden a las secuencias flanqueantes del genoma de maíz en 5' y 3' marcadas arbitrariamente. La línea negra más larga encima de la barra tramada y abierta o blanca representa la SEC ID n° 5 (la secuencia de longitud completa representada por la figura que representa la secuencia flanqueante en 5', la secuencia de ADN insertada y la secuencia flanqueante en 3'). Las líneas negras más cortas encima y debajo de la línea negra marcada como SEC ID N° 5 representan las posiciones aproximadas dentro de la SEC ID N° 5, en la que se puede encontrar cada una de las secuencias marcadas específicamente (es decir, SEC ID N° 1, SEC ID N° 2, SEC ID N° 3 y SEC ID N° 4). La SEC ID N° 1 y la SEC ID N° 2 y cualquier secuencia derivada del evento de maíz MON89034 que contienen la SEC ID N° 1 y/o SEC ID N° 2 son diagnósticas del ADN del evento de maíz MON89034 en una muestra biológica.

Descripción detallada

Las siguientes definiciones y procedimientos se proporcionan para definir mejor la presente invención y guiar a los expertos en la materia en la práctica de la presente invención. A menos que se indique lo contrario, los términos deben entenderse de acuerdo con el uso convencional por los expertos en la materia. También se pueden encontrar definiciones de términos habituales en biología molecular en Rieger et al., Glossary of Genetics: Classical and Molecular, 5ª edición, Springer-Verlag: New York, 1991; y Lewin, Genes V, Oxford University Press: New York, 1994.

Como se usa en el presente documento, el término "maíz" significa Zea mays e incluye todas las variedades vegetales que se pueden cultivar con maíz, incluidas especies de maíz silvestre.

Como se usa en el presente documento, la expresión "que comprende" significa "que incluye, pero sin estar limitado a".

Un "evento" transgénico se produce mediante la transformación de células vegetales con ADN heterólogo, es decir una construcción de ácido nucleico que incluye un transgén de interés, regeneración de una población de plantas resultante de la inserción del transgén en el genoma de la planta y selección de una planta concreta caracterizada por la inserción en una localización genómica concreta. El término "evento" se refiere al transformante original y a la progenie del transformante, que incluyen el ADN heterólogo. El término "evento" también se refiere a la progenie producida por un cruzamiento sexual entre el transformante y otra variedad que incluya el ADN heterólogo. Incluso después de un retrocruzamiento repetido con un padre recurrente, el ADN insertado y el ADN flanqueante del padre transformado está presente en la progenie del cruce en la misma localización cromosómica. El término "evento" también se refiere a ADN del transformante original que comprende el ADN insertado y la secuencia genómica flanqueante inmediatamente adyacente con el ADN insertado que cabría esperar que se transfiriera a una progenie que reciba el ADN insertado que incluya el transgén de interés como resultado de un cruce sexual de una línea parental que incluye el ADN insertado (p. ej., el transformante original y la progenie resultante de la autofecundación)

y una línea parental que no contiene el ADN insertado. La presente descripción se refiere al ADN del evento MON89034, a células vegetales, tejidos, semillas y productos procesados derivados de MON89034.

También debe entenderse que también se pueden cruzar dos plantas transgénicas para producir descendencia que contenga dos genes exógenos añadidos de segregación independiente. La autofecundación de la progenie adecuada puede producir plantas que son homocigotas para ambos genes exógenos añadidos. El retrocruzamiento con una planta parental y la fertilización cruzada con una planta no transgénica también se contemplan, así como la propagación vegetativa. Se pueden encontrar descripciones de otros procedimientos de cultivo de uso habitual para diferentes rasgos y cultivos en una de varias referencias, por ejemplo, Fehr, en *Breeding Methods for Cultivar Development*, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison WI (1987).

Una "sonda" es un ácido nucleico aislado al que está unido un marcador detectable o molécula indicadora convencional, por ejemplo un isótopo, ligando, agente quimioluminiscente o enzima radioactivo. Dicha sonda es complementaria de una hebra de un ácido nucleico diana, en el caso de la presente invención, de una hebra de ADN genómico del evento de maíz MON89034, ya sea de una planta de maíz o de una muestra que incluya ADN del evento. Se describen sondas que no solo incluyan ácidos desoxirribonucleicos o ribonucleicos sino también poliamidas y otros materiales sonda que se unen específicamente a una secuencia de ADN diana y que se puedan usar para detectar la presencia de dicha secuencia de ADN diana.

Los "cebadores" son ácidos nucleicos aislados que se hibridan a una hebra de ADN diana complementaria mediante hibridación de ácido nucleico para formar un híbrido entre el cebador y la hebra de ADN diana, después se extienden a lo largo de la hebra de ADN diana mediante una polimerasa, por ejemplo una ADN polimerasa. Los pares de cebadores de la presente invención se refieren al uso de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico diana, por ejemplo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otros procedimientos de amplificación de ácido nucleico convencionales.

Las sondas y cebadores tienen, generalmente, una longitud de 11 nucleótidos o más, preferentemente 18 nucleótidos o más, más preferentemente 24 nucleótidos o más, y, lo más preferentemente, 30 nucleótidos o más. Dichas sondas y cebadores hibridan específicamente con una secuencia diana en condiciones de hibridación de alta rigurosidad. Preferentemente, las sondas y cebadores de acuerdo con la presente invención tienen una similitud de secuencia completa con la secuencia diana, aunque las sondas que difieren de la secuencia diana y que conservan la capacidad de hibridar con las secuencias diana se pueden diseñar mediante procedimientos convencionales.

Los procedimientos para preparar y usar sondas y cebadores se describen en, por ejemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., vol. 1-3, ed. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 (en lo sucesivo en el presente documento "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 en el presente documento, "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 derivar de una secuencia conocida, usando, por ejemplo, programas de ordenador destinados a tal fin, tales como Primer (Versión 0.5, © 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA).

Los cebadores y sondas basadas en el ADN flanqueante y secuencias de inserto divulgadas en el presente documento se pueden confirmar (y en caso necesario, corregir) las secuencias divulgadas mediante procedimientos convencionales, por ejemplo mediante reclonación y secuenciación de dichas secuencias.

Las sondas y cebadores de ácido nucleico descritos en el presente documento hibridan en condiciones rigurosas con una secuencia de ADN diana. Cualquier procedimiento convencional de hibridación o amplificación de ácido nucleico se puede usar para identificar la presencia de ADN a partir de un evento transgénico en una muestra. Las moléculas de ácido nucleico, o fragmentos de las mismas, son capaces de hibridar específicamente con otras moléculas de ácido nucleico en determinadas circunstancias. Como se usa en el presente documento, se dice que dos moléculas de ácido nucleico son capaces de hibridar específicamente con otra su las os moléculas son capaces de formar una estructura de ácido nucleico bicatenario antiparalelo. Se dice que una molécula de ácido nucleico es la "complementaria" de otra molécula de ácido nucleico si exhiben una complementariedad completa. Como se usa en el presente documento, se dice que las moléculas exhiben una "complementariedad completa" cuando cada nucleótido de una de las moléculas es complementario de un nucleótido de la otra. Se dice que dos moléculas son "mínimamente complementarias" si pueden hibridar entre sí con una estabilidad suficiente como para permitirles que permanezcan hibridadas entre sí en, al menos, condiciones de "rigurosidad baja". De un modo similar, se dice que dos moléculas son "complementarias" si pueden hibridar entre sí con una estabilidad suficiente como para permitirles que permanezcan hibridadas entre sí en condiciones convencionales de "rigurosidad alta". Las condiciones de rigurosidad convencionales se describen en Sambrook et al., 1989, y en Haymes et al., en: *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, DC (1985). Por tanto, se permiten desviaciones de la complementariedad completa, siempre que dichas desviaciones no impidan completamente la capacidad de las moléculas para formar una estructura bicatenaria. Con el fin de que una molécula de ácido nucleico sirva como cebador o sonda, solo tiene que ser suficientemente complementaria en su secuencia para poder formar una estructura bicatenaria estable en las concentraciones de disolvente y de sales concretas usadas.

Como se usa en el presente documento, una secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia de ácido nucleico que hibridará específicamente con la complementaria de la secuencia de ácido nucleico con la que se está comparando en condiciones de rigurosidad alta. Los expertos en la técnica conocen las condiciones de rigurosidad adecuadas que estimulan la hibridación de ADN, por ejemplo, 6,0 x cloruro sódico/citrato sódico (SSC) a aproximadamente 45°C, seguido de un lavado de 2,0 x SSV a 50 °C o se pueden encontrar en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Por ejemplo, la concentración de sal en la etapa de lavado se puede seleccionar desde una rigurosidad baja a aproximadamente 2,0 x SSC a 50°C a una rigurosidad alta de aproximadamente 0,2 x SSC. Además, la temperatura en la etapa de lavado se puede incrementar desde condiciones de baja rigurosidad a temperatura ambiente, aproximadamente 22°C, a condiciones de alta rigurosidad a aproximadamente 65°C. Tanto la temperatura como la sal se pueden variar o la temperatura o la concentración de sales se pueden mantener constantes mientras que se modifica la otra variable. En una realización preferida, un ácido nucleico de la presente invención hibridará específicamente con una o más de las moléculas de ácido nucleico establecidas en las SEC ID N° 1 y 2 o complementarias de las mismas o fragmentos de condiciones moderadamente rigurosas, por ejemplo a aproximadamente 2,0 x SSC y aproximadamente 65 °C. En una realización particularmente preferida, un ácido nucleico de la presente invención hibridará específicamente con una o más moléculas de ácido nucleico expuestas en las SEC ID N° 1 y la SEC ID N° 2 o complementarias o fragmentos en condiciones de alta rigurosidad. En un aspecto, una molécula de ácido nucleico marcadora tiene la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEC ID N° 1 y la SEC ID N° 2 o complementarias de las mismas o fragmentos de las mismas. En otro aspecto, una molécula de ácido nucleico marcadora preferida comparte entre el 80% y el 100% o e 90% y el 100% de identidad de la secuencia con la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEC ID N° 1 y la SEC ID N° 2 o complementarias de las mismas o fragmentos de las mismas. En un aspecto adicional, una molécula de ácido nucleico marcadora preferida comparte entre el 95% y el 100% de identidad de la secuencia con la secuencia expuesta en la SEC ID N° 1 y la SEC ID N° 2 o complementarias de las mismas o fragmentos de las mismas. La SEC ID N° 1 y la SEC ID N° 2 se pueden usar como marcadores en procedimientos de cultivos de plantas para identificar la progenie de los cruces genéticos similares a los procedimientos descritos para el simple análisis del marcador de DN de repetición de secuencia, en "DNA markers: Protocols, applications, and overviews: (1997) 173-185, Cregan, et al., eds., Wiley-Liss NY. La hibridación de la sonda con la molécula de ADN diana se puede detectar mediante cualquier número de procedimientos conocidos por un experto en la técnica, estos pueden incluir, entre otros, marcadores fluorescentes, marcadores radioactivos, marcadores basados en anticuerpos y marcadores quimioluminiscentes.

Con respecto a la amplificación de una secuencia de ácido nucleico diana (p. ej., mediante PCR) usando un par de cebadores de amplificación concreto, "condiciones rigurosas" son condiciones que permiten que el par de cebadores hibride únicamente con la secuencia de ácido nucleico diana a la que el cebador que tiene la correspondiente secuencia silvestre (o su complementaria) se uniría y, preferentemente, para producir un producto de amplificación único, el amplicón, en la reacción de amplificación térmica de ADN.

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

Como se usa en el presente documento, "ADN amplificado" o "amplicón" se refiere al producto de la 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 la planta de maíz resultante de un cruce sexual contiene ADN genómico del evento transgénico de la planta de maíz de la presente invención, el ADN extraído de una muestra de tejido de la planta de maíz se puede someter a un procedimiento de amplificación de ácido nucleico usando un par de cebadores que incluye un cebador derivado de la secuencia flanqueante en el genoma de la planta adyacente al sitio de inserción del ADN heterólogo insertado y un segundo cebador derivado del ADN heterólogo insertado para producir un amplicón que es diagnóstico de la presencia del ADN del evento. El amplicón tiene una longitud y una secuencia que también es diagnóstica del evento. El amplicón puede variar de longitud con respecto a la longitud combinada de los pares de cebadores más un par de bases nucleotídicas, preferentemente más aproximadamente cincuenta pares de bases nucleotídicas, más preferentemente más aproximadamente doscientos cincuenta pares de bases nucleotídicas, e incluso más preferentemente más aproximadamente cuatrocientos cincuenta pares de bases nucleotídicas. Como alternativa, un par de cebadores puede proceder de la secuencia flanqueante en ambos lados del ADN insertado para producir un amplicón que incluye la totalidad de la secuencia nucleotídica del inserto. Un miembro de un par de cebadores derivado de la secuencia genómica de la planta se puede localizar a una distancia de la molécula de ADN insertada, esta distancia puede variar desde un par de bases nucleotídicas a aproximadamente veinte mil pares de bases nucleotídicas. El uso del término "amplicón" excluye específicamente dímeros de cebadores que se pueden formar en la reacción de amplificación térmica del ADN.

La amplificación de ácido nucleico se puede conseguir mediante cualquiera de los procedimientos de amplificación de ácido nucleico conocidos en la materia, incluyendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En la materia se conocen varios procedimientos de amplificación y se describen en, entre otros, las patentes de EE.UU. N° 4.683.195 y 4.683.202 y en los protocolos de PCR: A Guide to Methods and Applications, ed. Innis et al., Academic Press, San Diego, 1990. Se han desarrollado procedimientos de amplificación por PCR para amplificar hasta 22 kb del ADN genómico y hasta 42 kb del ADN del bacteriófago (Cheng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5695-5699, 1994). Estos procedimientos, además de otros procedimientos conocidos en la técnica de amplificación del ADN, se pueden usar en la práctica de la presente invención. La secuencia del inserto de ADN heterólogo o la secuencia

flanqueante del evento de maíz MON89034 con muestras de semillas depositadas como los números de la ATCC se pueden verificar (y corregir en caso necesario) mediante amplificación de dichas secuencias desde el evento usando los cebadores derivados de las secuencias proporcionadas en el presente documento, seguidas de secuenciación de ADN estándar del amplicón de PCR o del ADN clonado.

5 El amplicón producido mediante estos procedimientos se puede detectar mediante una pluralidad de técnicas. Uno de estos procedimientos es en Análisis Genético de un bit (Nikiforov, et al. Nucleic Acid Res. 22:4167-4175, 1994), en el que se diseña un oligonucleótido de ADN que solapa tanto la secuencia de ADN genómica flanqueante adyacente como la secuencia de ADN insertada. El oligonucleótido se inmoviliza en pocillos de una placa de micropocillos. Tras la PCR de la región de interés (usando un cebador en la secuencia insertada y uno en la
10 secuencia genómica flanqueante adyacente), y producto de PCR monocatenario se puede hibridar con el oligonucleótido inmovilizado y servir como molde para una reacción de extensión de una base usando una ADN polimerasa y ddNTP marcados específicos de la siguiente base prevista. La lectura puede ser fluorescente o basarse en un ELISA. Una señal indica la presencia de la secuencia del inserto/flanqueante debido a un amplificación, hibridación y extensión de una base satisfactorios.

15 Otro procedimiento es la técnica de la pirosecuenciación como describen Winge (Innov. Pharma. Tech. 00:18-24, 2000). En este procedimiento se diseña un oligonucleótido que solapa el ADN genómico adyacente y la unión del ADN del inserto. El oligonucleótido hibrida con un producto de PCR monocatenario de la región de interés (un cebador en la secuencia insertada y uno en la secuencia genómica flanqueante) y se incuba en presencia de una
20 ADN polimerasa, ATO, sulfúridasa, luciferasa, apirasa, adenosín-5'-fosfosulfato y luciferina. Los dNTP se añaden individualmente y la incorporación tiene como resultado una señal lumínica que se mide. Una señal lumínica indica la presencia de la secuencia del inserto/flanqueante del transgén debido a un amplificación, hibridación y extensión de una o varias base satisfactorios.

La polarización por fluorescencia como describen Chen, et al., (Genome Res. 9:492-498, 1999) es un procedimiento que se puede usar para detectar el amplicón de la presente invención. Usando este procedimiento se diseña un
25 oligonucleótido que solapa la unión entre el ADN genómico flanqueante y el insertado. El oligonucleótido hibrida con un producto de PCR monocatenario de la región de interés (un cebador en el ADN insertado y uno en la secuencia de ADN genómico flanqueante)) y se incuba en presencia de una ADN polimerasa y un ddNTP marcado con fluorescencia . La extensión de una sola base tiene como resultado la incorporación del ddNTP. La incorporación se puede medir como un cambio en la polarización usando un fluorímetro. Un cambio en la polarización indica la
30 presencia de la secuencia del inserto/flanqueante del transgén debido a un amplificación, hibridación y extensión de una base satisfactorios.

Taqman® (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) se describe como un procedimiento de detección y cuantificación de la presencia de una secuencia de ADN y se entiende completamente en las instrucciones proporcionadas por el fabricante. En resumen, se diseña una sonda oligonucleotídica FRET que solapa la unión
35 entre el ADN genómico flanqueante y el insertado. La sonda FRET y los cebadores para PCR (un cebador en la secuencia de ADN insertada y uno en la secuencia genómica flanqueante) se ciclan en presencia de una polimerasa termoestable y dNTP. La hibridación de la sonda FRET tiene como resultado la escisión y liberación del resto fluorescente lejos del resto de inactivación en la sonda FRET. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia del inserto transgénico/flanqueante del transgén debido a un amplificación, hibridación satisfactorios.

40 Se han descrito balizas moleculares para su uso en la detección de secuencia, como se describe en Tyangi, et al. (Nature Biotech. 14:303-308, 1996). En resumen, se diseña una sonda oligonucleotídica FRET que solapa la unión entre el ADN genómico flanqueante y el insertado. La estructura única de la sonda FRET tiene como resultado que contiene una estructura secundaria que conserva los restos fluorescente y de inactivación muy cercanos. La sonda
45 FRET y los cebadores para PCR (un cebador en la secuencia de ADN insertada y uno en la secuencia genómica flanqueante) se ciclan en presencia de una polimerasa termoestable y Dntp. Tras la amplificación por PCR con éxito, la hibridación de la sonda FRET a la secuencia diana tiene como resultado la eliminación de la estructura secundaria de la sonda y la separación espacial de los restos fluorescentes y de inactivación que tiene como resultado la producción de una señal fluorescente. La señal fluorescente indica la presencia de la secuencia del inserto transgénico/flanqueante del transgén debido a un amplificación, hibridación satisfactorios.

50 Otros procedimientos descritos, tales como microfluidos (pub. de patente de EE.UU., 2006068398, patente de EE.UU. Nº 6,544,734) proporcionan procedimientos y dispositivos para separar y amplificar muestras de ADN. Los pigmento ópticos usados para detectar y cuantificar moléculas de ADN específicos (documento WO/05017181). Dispositivos de nanotubos (documento WO/06024023) que comprenden un sensor electrónico para la detección de moléculas de ADN o nanoesferas que se unen a moléculas de ADN específicas y, después, se pueden detectar.

55 Los kits de detección de ADN se proporcionan usando las composiciones divulgadas en el presente documento. Los kits son útiles para la identificación del ADN del evento de maíz MON89034 en una muestra y se puede aplicar al menos a los procedimientos para cultivar plantas de maíz que contienen el ADN del evento adecuado. Los kits contienen cebadores y/o sondas de ADN que son homólogas o complementarias de segmentos seleccionados de la secuencias como se exponen en las SEC ID Nº 1-7 o cebadores o sondas complementarias del ADN contenidas en
60 los elementos genéticos transgénicos de ADN como se expone en el listado de secuencias. Estas secuencias de

ADN se pueden usar en reacciones de amplificación de ADN o como sondas en un procedimiento de hibridación de ADN para detectar la presencia de polinucleótidos diagnósticos de la presencia del ADN diana en una muestra. La producción de un amplicón predefinido en una reacción de amplificación térmica es diagnóstica de la presencia de ADN correspondiente al ADN del genoma de PTA-7455 en la muestra. Si se selecciona la hibridación, la detección de la hibridación de la sonda con la muestra biológica es diagnóstica de la presencia del ADN del evento transgénico MON89034 en la muestra. Normalmente, la muestra s maíz, o productos de maíz o subproductos del uso de maíz.

La presente invención proporciona una planta de maíz transgénico designada como evento de maíz MON89034, progenie de la planta y células de la planta, así como semillas producidas por la planta. Semillas representativas para cultivar la planta para producir la progenie, para obtener células o para producir un cultivo de dichas semillas que comprendan el evento de maíz transgénico se han depositado el 28 de marzo de 2006 en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) y con el número de acceso PTA-7455.

La planta y las células y productos producidos por estas realizaciones y similares contienen ADN que es diagnóstico de la presencia de ADN derivado de cualquier célula derivada de evento de maíz transgénico MON89034 en cualquier muestra biológica. Esto es porque estas dos nuevas secuencias están contenidas dentro de las células del evento de maíz transgénico MON89034. El ADN diagnóstico comprende una secuencia de nucleótidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEC ID N° 1, SEC ID N° 2, SEC ID N° 3, SEC ID N° 4 y SEC ID N° 5. La relación de estas secuencias se describe, más particularmente en el presente documento y en la leyenda de la Figura 1 y con referencia a la Figura 1.

Las plantas de maíz cultivadas a partir de semillas que son homocigotas para el ADN diagnósticas del evento de maíz transgénico MON89034 también entran dentro del alcance de la presente invención. Las plantas de maíz cultivadas a partir de semillas que son heterocigotas para el ADN diagnósticas del evento de maíz transgénico MON89034 también entran dentro del alcance de la presente invención siempre que estas semillas también comprenden las secuencias de ADN diagnóstico. Las células, semillas y tejido producidos a partir de dichas plantas que comprenden el ADN diagnóstico también entran dentro del alcance de la presente invención.

Las plantas de maíz y las células de plantas de maíz y similares que comprenden ADN diagnóstico para el evento de maíz transgénico MON89034 exhiben resistencia a la infestación por insectos lepidópteros. Estas células y plantas contienen ADN que codifica la proteína insecticida (insecticida, agente tóxico) Cry2Ab y ADN que tiene las secuencias nucleotídicas de la SEC ID N° 1 y la SEC ID N° 2 que forman una parte del genoma de las células de la planta. Estas plantas y células vegetales también contienen un ADN que codifica la proteína insecticida (insecticida, agente tóxico) Cry1A.105. Estas proteínas se pueden denominar primera y segunda proteína insecticida, respectivamente o al contrario. La expresión de estas proteínas se consigue a partir de componentes reguladores/elementos genéticos que están incluidos dentro de los casetes de expresión que proporcionan la expresión de cada una de las secuencias de ADN que codifican estas toxinas y se describen completamente en el presente documento y en la leyenda de la Figura 1 y con referencia a la Figura 1, y la secuencia como se expone en la SEC ID N° 5. Las plantas de maíz y las células de plantas de maíz que comprenden estas secuencias son eficaces para proteger a las plantas de la infestación por plagas de lepidópteros, ya sean homocigotos u heterocigotos para los alelos en los que están presentes estas secuencias de codificación.

La presente invención también proporciona amplicones que se pueden producir a partir de las secuencias descritas en el presente documento que son diagnósticas de la presencia en una muestra biológica de ADN derivado de ADN del evento de maíz transgénico MON89034. Un amplicón diagnóstico de la presencia del ADN del evento de maíz transgénico MON89034 en una muestra diagnóstica contiene al menos un segmento polinucleotídico que consiste en la secuencia de nucleótidos como se expone en la SEC ID N° 1 o la SEC ID N° 2. Estos amplicones se pueden producir usando secuencias de cebadores como se describe en el presente documento más adelante a partir de cualquier muestra biológica que contiene al menos aproximadamente 05 femtomoles o aproximadamente 0,5 picogramos de ADN derivado del evento de maíz transgénico MOD89034. Dichas fuentes de ADN de la muestra biológica correspondiente al evento de maíz transgénico MOD89034 pueden ser harina de maíz, aceite de maíz, torta de maíz, semilla de maíz, germen de maíz, almidón de maíz y harina de maíz y similares derivados de dicho evento transgénico.

La descripción también proporciona moléculas de polinucleótidos aislados que exhiben secuencias de nucleótidos contiguas tales como las que se exponen en la SEC ID N° 5. Estas secuencias de nucleótidos contiguas comprenden: (1) de aproximadamente 11 a aproximadamente 12000 nucleótidos y cualquier longitud entremedias y comprenden adicionalmente los nucleótidos contiguos como se exponen en la posición nucleotídica 1-11 o 9-20 en la SEC ID N1 1 y 1-11 i 9-20 como se expone en la SEC ID N° 2; (2) cualquier secuencia de nucleótidos contiguos como se expone en la SEC ID N° 3 de aproximadamente 11 a aproximadamente 2000 nucleótidos y cualquier longitud entremedias y comprenden adicionalmente los nucleótidos contiguos como se exponen en la posición nucleotídica 1-11 y 9-20 como se expone en la SEC ID N° 1; cualquier secuencia de nucleótidos contiguos como se expone en la SEC ID N° 4 de aproximadamente 11 a aproximadamente 914 nucleótidos y cualquier longitud entremedias, y que además comprende los nucleótidos contiguos como se expone en la posición nucleotídica 1-11 y 9-20 contiguos como se expone en la SEC ID N° 2. Estas moléculas polinucleotídicas aisladas son útiles en los procedimientos de amplificación de ADN para producir uno o más amplicones de una muestra biológica que contiene ADN de maíz. La detección de dicho amplicón es diagnóstica de la presencia del ADN del evento de maíz

transgénico MON89034 en la muestra. Las moléculas polinucleotídicas aisladas también son útiles en varios procedimientos de detección de nucleótidos para detectar la presencia de ADN derivado del evento de maíz transgénico MON89034 en una muestra biológica. En particular, las sondas polinucleotídicas que comprenden al menos aproximadamente 11 nucleótidos contiguos como se expone en la SEC ID N° 1 o la SEC ID N° 2 son útiles como sondas en dichos procedimientos para detectar el ADN del evento transgénico MON89034 en una muestra. Las secuencias complementarias de estas moléculas polinucleotídicas aisladas también son útiles en los mismos procedimientos de detección y/o amplificación.

También se proporcionan kits para usar en la detección de la presencia de ADN derivado del evento de maíz transgénico MON89034 en una muestra biológica. Un kit usa una molécula polinucleotídica de sonda, conteniendo la molécula sonda al menos de aproximadamente 11 a aproximadamente 12000 nucleótidos contiguos que exhiben una homología sustancial o que exhiben una complementariedad sustancial con un segmento nucleotídico que comprende una secuencia como se expone en la SEC ID N° 5 sería útil para detectar la presencia de ADN de MON89034 en una muestra. La molécula sonda debería contener al menos una de las secuencias como se exponen en la SEC ID N° 1 y la SEC ID N° 2. Las secuencias expuestas en la SEC ID N° 1 y la SEC ID N° 2 también se pueden denominar secuencias de unión, es decir, las secuencias en cualquiera de los extremos del ADN transgénico insertado en la planta de maíz, para dar lugar al evento de maíz transgénico MON89034. Estas secuencias, denominadas arbitrariamente extremos 5' y 3' respectivamente, contienen parte de la secuencia de ADN insertada y parte de la secuencia del genoma de maíz flanqueante. Por ejemplo, la SEC ID N° 1 representa en su extremo 5' la mitad del extremo 3' de la secuencia genómica flanqueante del extremo 5' del ADN insertado, estando representado el extremo 5' del ADN insertado por la mitad del extremo 30 de la secuencia como se expone en la SEC ID N° 1. La SEC ID N° 2 representa en su extremo 5' la mitad del extremo 3' del ADN insertado y en su extremo 3' la mitad del extremo 5' de la secuencia del genoma de maíz flanqueante del extremo 3' del ADN insertado. En el genoma de maíz de origen natural en la posición de la secuencia insertada expuesta en la SEC ID N° 5, la secuencia flanqueante en el extremo 5' del ADN insertado y la secuencia flanqueante en el extremo 3' del ADN insertado están unidas y una primera molécula cebador que hibrida con la secuencia complementaria de la secuencia expuesta en la SEC ID N° 3 (aparte de los 21 nucleótidos del extremo 3' de la SEC ID N° 3) y una segunda molécula cebador que hibrida con la secuencia como se expone en la SEC ID N° 4 (parte de los 20 nucleótidos del extremo 5' de SEC ID N° 4) producirá un amplicón en una reacción de amplificación térmica con el molde que es ADN distinto al ADN de MON89034 que es diagnóstico de la ausencia del ADN insertado en MON89034 y los mismos cebadores producirán un amplicón que es ligeramente más largo de 12000 nucleótidos (dependiendo de la posición de los cebadores en las secuencias flanqueantes expuestas en la SEC ID N° 3 y la SEC ID N° 4) cuando se usa ADN de MON89034 como molde. También se proporcionan otras realizaciones.

Se proporciona un kit para detectar la secuencia de unión SEC ID N° 1 o SEC ID N° 2 del evento de maíz MON89034 en una muestra biológica. El kit contiene una sonda polinucleotídica que está o es completamente complementaria de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID N° 1 o SEC ID N° 2 o complementarias de las mismas, y también contiene un par de cebadores para usar en una reacción de amplificación de ácido nucleico. El par de cebadores se puede denominar primer cebador que consiste en al menos aproximadamente 15 a aproximadamente 50 nucleótidos contiguos de la porción del genoma de maíz de la SEC ID N° 3 y un segundo cebador que consiste en al menos aproximadamente 15 a aproximadamente 50 nucleótidos contiguos complementarios de la porción de ADN heterólogo insertado de la SEC ID N° 5. El primer cebador del par de cebadores polinucleotídicos hibrida específicamente con la secuencia complementaria inversa correspondiente a la expuesta en la SEC ID N° 3 de aproximadamente la posición nucleotídica 1 a aproximadamente la posición 2050 y el segundo cebador de dicho par de cebadores polinucleotídicos hibrida específicamente con la secuencia como se expone en la SEC ID N° 5 de aproximadamente la posición 2060 a aproximadamente la posición 12208 y se extienden uno hacia otro para formar un amplicón que comprende la SEC ID N° 1, siendo dicho amplicón diagnóstico de la presencia de ADN del evento MON89034 en la muestra. Un par de cebadores diferente se puede denominar primer cebador que consiste en al menos aproximadamente 15 a aproximadamente 50 nucleótidos contiguos complementarios de la porción del genoma de maíz de la SEC ID N° 4 y un segundo cebador que consiste en al menos aproximadamente 15 a aproximadamente 50 nucleótidos contiguos de la porción de ADN heterólogo insertado de la SEC ID N° 5. El segundo cebador del par de cebadores polinucleotídicos hibrida específicamente con la secuencia complementaria inversa correspondiente a la expuesta en la SEC ID N° 5 de aproximadamente la posición nucleotídica 1 a aproximadamente la posición 11305 y el primer cebador del par de cebadores polinucleotídicos hibrida específicamente con la secuencia como se expone en la SEC ID N° 4 de aproximadamente la posición 21 a aproximadamente la posición 914 y se extienden uno hacia otro para formar un amplicón que comprende la SEC ID N° 2, siendo dicho amplicón diagnóstico de la presencia de ADN del evento MON89034 en dicha muestra.

Estos pares de cebadores son útiles en la producción de amplicones que comprenden la SEC ID N° 1 o la SEC ID N° 2, según sea el caso, y son, por tanto, diagnósticos de la presencia de ADN de MON89034 en una muestra biológica. Estos amplicones permiten la detección de la presencia de una secuencia de unión diagnóstica del evento de maíz MON89034 en una muestra biológica.

También se proporciona un procedimiento para producir y detectar un amplicón que es diagnóstico de un ADN de evento de maíz transgénico MON89034 en una muestra biológica que comprende ADN de maíz. El procedimiento comprende poner en contacto la muestra biológica junto con dos o más cebadores en una reacción de amplificación

de ácido nucleico, realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico, después detectar el amplicón. La presencia del amplicón es diagnóstica de dicho ADN del evento en la muestra siempre que el amplicón contenga al menos una de las secuencias contiguas como se expone en la SEC ID N° 1 y la SEC ID N° 2, de aproximadamente la posición nucleotídica 1-11 o 9-20, o las secuencias complementarias correspondientes a estas posiciones.

5 Las secuencias nucleotídicas diagnósticas de la presencia del evento de maíz transgénico MON89034 en una muestra biológica también se pueden detectar usando otros procedimientos. Por ejemplo, poner en contacto una muestra biológica que se sospecha que contiene ADN de MON89034 con una sonda que hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con una o más secuencias de nucleótidos como se exponen en la SEC ID N° 1 o la SEC ID N° 2, someter la muestra y la sonda a condiciones de hibridación rigurosas y, después, detectar la hibridación de la sonda con la secuencia nucleotídica. La detección de la hibridación es diagnóstica de la presencia del ADN de MON89034 en la muestra.

15 Los polinucleótidos cebadores para usar en la producción, en una reacción de amplificación térmica, la presente invención también proporciona un amplicón que es diagnóstico de la presencia de ADN del evento de maíz MON89034 en una muestra biológica. Normalmente, los cebadores se proporcionan en pares, denominándose los miembros del par de cebadores por comodidad primer cebador y segundo cebador. Un primer cebador puede consistir en al menos aproximadamente 15 nucleótidos contiguos de la porción de genoma del maíz como se expone en la SEC ID N° 3 y un segundo cebador puede consistir en al menos aproximadamente 15 nucleótidos contiguos complementarios de la porción de ADN insertado heterólogo como se expone en la SEC ID N° 5. Estos dos cebadores producirían un amplicón en una reacción de amplificación térmica con el ADN molde obtenido del ADN del evento de maíz MON89034 que contiene una secuencia de polinucleótidos como se expone en la SEC ID N° 1. Como alternativa, un primer cebador puede consistir en al menos aproximadamente 15 nucleótidos contiguos de la porción del genoma de maíz de SEC ID N° 4 y un segundo cebador puede consistir en al menos aproximadamente 15 nucleótidos contiguos complementarios de la porción de ADN insertado heterólogo de SEC ID N° 5. Estos dos cebadores producirían un amplicón en una reacción de amplificación térmica con un ADN molde obtenido del ADN de evento de maíz MON89034 que contiene una secuencia de polinucleótidos como se expone en la SEC ID N° 2.

20 Un procedimiento alternativo para detectar una secuencia de unión del evento de maíz MON89034 en una muestra biológica que comprende ADN de maíz, tal como la SEC ID N° 1 o la SEC ID N° 2, consiste en poner en contacto la muestra con una sonda polinucleotídica que hibrida en condiciones rigurosas con una de las secuencias de unión, someter la muestra y la sonda a condiciones de hibridación rigurosas y detectar la hibridación de la sonda con la secuencia de unión. La detección de la unión/hibridación de la sonda a la secuencia de unión es indicativa de la presencia del ADN de MON89034 en la muestra biológica. Una planta de maíz transformado de forma estable, el ADN que produce un amplicón de ADN que comprende la SEC ID N° 1 o la SEC ID N° 2 cuando se somete a procedimiento expuesto en el presente documento, está dentro del alcance de la presente invención. Ejemplos de secuencias de cebadores, en particular, un par de secuencias de cebadores, se exponen en el presente documento en los ejemplos y en las SEC ID N° 6 y la SEC ID N° 7.

35 Un procedimiento alternativo de detectar la presencia del ADN del evento MON89034 en una muestra biológica puede consistir en las etapas de poner en contacto la muestra con una sonda que hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con ADN de MON89034 y no hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con ADN genómico de la planta de la planta de maíz que no es ADN de MON89034, someter la muestra y la sonda a condiciones de hibridación rigurosas y, después, detectar la hibridación de la sonda con el ADN de MON89034. Una sonda consistente con esta realización es o es complementaria de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID N° 1 y la SEC ID N° 2. La detección de la hibridación de la sonda a la muestra es diagnóstica de la presencia del polinucleótido del evento de maíz MON89034 en la muestra. La muestra biológica puede ser cualquier muestra que contiene ADN de MON89034, incluyendo, entre otros, aceite de maíz, harina de maíz, harina de maíz, gluten de maíz, tortas de maíz, almidón de maíz, licor de maceración de maíz, tejido de maíz, células de maíz, grano de maíz, polen de maíz, tejido de raíz de maíz, DDGS e incluso etanol producido como un subproducto de la fermentación de dicho maíz transgénico siempre que la muestra contenga al menos una cantidad detectable de un polinucleótido diagnóstica de la presencia del evento MON89034 en la muestra. Una sonda polinucleotídica puede ser cualquier nucleótido seleccionado del grupo que consiste en un ácido desoxirribonucleico, un ácido ribonucleico y un análogo nucleotídico y puede estar marcado con al menos un fluoróforo, molécula que contiene un isótopo radioemisor, o una molécula de tipo hapteno que se puede detectar específicamente con un anticuerpo u otra reacción de tipo unión.

40 Una variedad de maíz que comprende un ADN diagnóstico de la presencia de un ADN del evento transgénico MON89034 se puede obtener cultivando una planta de maíz que comprende ADN del evento de maíz transgénico MON89034 junto con una planta de maíz que no sea el evento MON89034 para producir una planta de maíz híbrida que comprende ADN diagnóstico de dicho evento. Dicha planta de maíz híbrida que comprende ADN diagnóstico del evento de maíz transgénico MON89034 está dentro del alcance de la presente invención, como las semillas producidas a partir del híbrido (siempre que comprenda ADN diagnóstico del evento de maíz transgénico MON89034) y polen, óvulos, semillas, raíces u hojas de la planta de maíz híbrida MON89034, también en la medida en que contienen las secuencias de ADN diagnóstico y la progenie producida a partir de dichas realizaciones.

La presente invención proporciona un procedimiento para proteger una planta de maíz frente a la infestación por insectos lepidópteros que comprende proporcionar en la diana de una plaga de insectos lepidópteros diana una o más células de la planta de maíz transgénica, comprendiendo cada célula de la planta de maíz en su genoma un polinucleótido correspondiente a la secuencia como se expone en la SEC ID N° 1 y la SEC ID N° 2 y la secuencia de nucleótidos contiguos como se expone en la SEC ID N° 5 entre la SEC ID N° 1 y la SEC ID N° 2. Se inhibe la alimentación adicional el insecto lepidóptero diana que se alimenta de dichas células de plantas vegetales transgénicas de la planta de maíz de la que deriva las células de la planta de maíz.

La presente invención también proporciona composiciones que son tóxicas para plagas de lepidópteros diana de plantas de maíz. Una composición de células vegetales transgénicas proporcionada en la dieta de una plaga de insectos lepidópteros diana, en la que cada célula de la planta de maíz transgénico comprende en su genoma un polinucleótido correspondiente a la secuencia como se expone en la SEC ID N° 1 y la SEC ID N° 2 junto con la secuencia de nucleótidos contiguos como se expone en la SEC ID N° 5 entre la SEC ID N° 1 y la SEC ID N° 2, es eficaz para proporcionar protección contra la infestación por insectos lepidópteros a una planta de maíz o célula de la planta de maíz, siempre que la planta de maíz o la célula exprese Cry1A.105 y/o Cry2Ab2 de los casetes de expresión contenidos dentro de la secuencia de nucleótidos contiguos.. Dichas composiciones, en forma de semillas de maíz transgénico, se han depositado en el Cultivo Americano de Cultivos Tipo con el número de acceso PTA-7455. Dichas plantas de maíz resistentes a insectos, o partes de las mismas, contendrán ADN en el genoma de las células de dicha planta que tienen al menos una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N° 1, SEC ID N° 2, SEC ID N° 3, SEC ID N° 4 y SEC ID N° 5. La progenie y las semillas de la planta de maíz resistente a insectos, en las que la progenie y las semillas tienen las secuencias diagnósticas a las que se hace referencia en el presente documento, también se incluyen dentro del alcance de la presente invención. Dichas plantas de maíz resistentes a insectos se pueden producir en un procedimiento que comprende cruzar un evento de planta de maíz transgénico MON89034 con una planta de maíz diferente y seleccionar la progenie resistente al insecto analizando al menos una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N° 1, SEC ID N° 2, SEC ID N° 3, SEC ID N° 4 y SEC ID N° 5.

El evento de maíz transgénico MON89034 resistente a insectos se puede combinar con otras variedades transgénicas de maíz, tal como maíz resistente a herbicidas, tales como glifosato, glifosinato y diacamba, y similares, o maíz resistente a insectos devoradores de raíces como resultado de la inserción de secuencias que codifican proteínas tales como PS149B1 y Cry3Bb modificada, u otras variedades de maíz transgénico resistente a la infestación por insectos lepidópteros como resultado de la inserción de secuencias que codifican otras proteínas tóxicas, tales como VIP3A, Cry1Ab, y CryIFa y similares. Varias combinaciones de todos estos eventos transgénicos diferentes se cultivan junto con las plantas de maíz de la presente invención, es decir el evento MON89034, para proporcionar variedades mejoradas de maíz transgénico híbrido resistente a la infestación por coleópteros y lepidópteros y resistentes a herbicidas selectivos. Dichas variedades exhiben un rendimiento mejorado y tolerancia a la sequía en comparación con las variedades transgénicas de rasgo individual y no transgénicas.

Se proporciona un procedimiento de producir una planta de maíz resistente a la infestación por insectos, en el que la planta de maíz comprende una cantidad insecticidamente eficaz de las secuencias de codificación de la toxina como se expone en la SEC ID N° 5. El procedimiento comprende extraer las secuencias de codificación de la toxina del evento de maíz transgénico MON89034 e introducir estas secuencias de codificación, solas o juntas, en una o más células de maíz, para producir células de maíz transgénico que comprenden estas una o más secuencias de codificación de la toxina. Las células de maíz transgénico se cultivan después (regeneran) en plantas de maíz transgénico que comprenden la una o más secuencias de codificación y las plantas transgénicas exhiben después resistencia a la infestación por insectos.

Por la presente invención se proporciona un procedimiento para determinar la cigosidad del ADN de una planta de maíz transgénico que comprende el ADN del evento de maíz MON89034 con respecto al ADN que es diagnóstico de la presencia de dicho ADN de MON89034 en una muestra biológica. El procedimiento consiste en, como primera etapa, poner en contacto la muestra con tres cebadores diferentes que comprenden las SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, and SEQ ID NO:10, que cuando se usan juntas en una reacción de amplificación de ácido nucleico que comprende ADN del evento de maíz MON89034, produce un primer amplicón que es diagnóstico del evento de maíz MON89034 y cuando se usa en una reacción de amplificación de ácido nucleico que comprende ADN genómico distinto al ADN de MON89034 produce un segundo amplicón que es diagnóstico del ADN genómico de maíz distinto al ADN de MON89034. Las siguientes etapas consisten en realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico y comparar los amplicones producidos durante la reacción de amplificación térmica. La detección de la presencia de ambos amplicones es diagnóstica de la cigosidad de la muestra. La detección de únicamente el primer amplicón es indicativa de la muestra que solo contiene ADN de MON89034, es decir una muestra homocigota. La detección de únicamente el segundo amplicón es indicativa de la muestra que no contiene ADN de MON89034. La detección del primer y el segundo amplicón juntos en una muestra es indicativa de una muestra que contiene (1) ADN heterocigoto con referencia a una muestra pura que solo contiene material de partida heterocigota o (2) una muestra que contiene el ADN de la muestra de partida homocigota y heterocigota o (3) una muestra que contiene alguna combinación de muestras homocigotas, heterocigotas y/o distintas al ADN de MON89034.

La invención también proporciona cultivar las plantas de maíz que comprenden ADN diagnóstico de un segmento de ADN transgénico insertado en el genoma de las células de las plantas de maíz. El ADN en el genoma de las células de maíz comprende una cualquiera o todas las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en:

1. (a) la secuencia de nucleótidos como se expone en la SEC ID N° 5,
- 5 2. (b) las dos secuencias de nucleótidos como se expone en la SEC ID N° 1 y la SEC ID N° 2;
3. (c) la secuencia de nucleótidos como se expone en la SEC ID N° 3; y
4. (d) la secuencia de nucleótidos como se expone en la SEC ID N° 4.

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

10 Ejemplos

Ejemplo 1

Este ejemplo ilustra la construcción y caracterización molecular del evento de maíz transgénico MON89034.

15 La planta de maíz MON89034 se produjo mediante un proceso de transformación mediada por *Agrobacterium* de una línea de maíz endogámica con la construcción plasmídica pMON38850 (el casete de expresión se muestra en la Figura 1). El procedimiento de transformación usado es similar al descrito en la patente de EE.UU. N° 6,603,061. La construcción plasmídica pMON38850 contiene los casetes de expresión vegetal unidos con los elementos genéticos reguladores necesarios para la expresión de la proteína insecticida Cry1A.105 en células de planta de maíz. Las células de maíz se regeneraron en plantas de maíz intactas que consisten en al menos aproximadamente 23.000 eventos transgénicos diferentes. Los eventos transgénicos individuales (plantas) se seleccionaron de la población de eventos que mostraron integridad de los casetes de expresión de la planta y resistencia al daño por la alimentación de larvas de insectos lepidópteros. Una planta de maíz que contiene en su genoma los casetes de expresión vegetal unidos de pMON38850 es un aspecto de la presente invención. Tras el análisis sustancial de estos eventos transgénicos, el evento transgénico MON89034 se seleccionó en base a su caracterización molecular y la ausencia de cualquier efecto de deficiencia fenotípica o agronómica indeseable.

25 Las secuencias de los elementos genéticos transgénicos contenidas en el genoma de maíz MON89034 como se ilustra en la Figura 1 consiste en los elementos siguientes, cada uno en unión operable entre sí. Primero, en el extremo 5' definido de forma arbitraria de la secuencia (es decir, cerca de la porción central izquierda del segmento representado en la Figura 1) hay una porción marcada en la región del lado derecho (RB) de *Agrobacterium tumefaciens*. A esto le sigue en términos de la secuencia un casete de expresión que consiste en un elemento promotor CaMV 35S potenciado (en lo sucesivo denominado P-CaMV35Sen, localizado en las posiciones 2350 a 2651 en la SEC ID N° 5); una secuencia líder no traducida de la proteína de unión A/B de la clorofila de trigo (en lo sucesivo denominado L-Ta.lhcb1, localizado en las posiciones 2678 a 2738 en la SEC ID N° 5); una secuencia intrónica de la actina de arroz (en lo sucesivo denominado I-Os.Act1, localizado en las posiciones 2755 a 3234 en la SEC ID N° 5); una secuencia de origen no natural que codifica el gen quimérico Cry1A.105 (localizado en las posiciones 3244 a 6777 en la SEC ID N° 5) y una región de terminación en 3' del trigo (en lo sucesivo denominado T-Ta.Hsp17-1:1:1, localizado en las posiciones 6809 a 7018 en la SEC ID N° 5). La combinación de los elementos citados con anterioridad, aparte de la secuencia del borde, funcionan juntos cuando están en una planta de maíz para producir la expresión de la proteína insecticida Cry1A.105. Estos elementos se unen después en la secuencia a otro casete de expresión que consiste en los elementos siguientes: un promotor del mosaico de la escrofularia (localizado en las posiciones 7086 a 7649 en la SEC ID N° 5), una líder de Hsp70 de *Zea mays* (en el presente documento denominada HSP70 o I-Hsp70, localizada en las posiciones 7672 a 8475 en la SEC ID N° 5), y una secuencia de codificación del péptido tránsito al cloroplasto de *Zea mays* (en el presente documento denominado CTP2 o TS-SSU-CTP, localizado en las posiciones 8492 a 8892 en la SEC ID N° 5). Estos segmentos unidos de forma operable se unen después a una secuencia de nucleótidos que codifican la proteína insecticida Cry2Ab (localizada en las posiciones 8893 a 10800 en la SEC ID N° 5), que está unida en su extremo 3' a una región no traducida en 3' del gen de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens* (en el presente documento denominado T-AGRtu.nos-1:1:13, localizado en las posiciones 10827 a 11377 en la SEC ID N° 5). Estos elementos que flanquean la secuencia de codificación Cry2Ab funcionan en conjunto para dirigir la expresión de Cry2Ab cuando están presentes en una planta de maíz. Al casete de expresión de Cry2Ab le sigue en secuencia una secuencia de nucleótidos que consiste en una porción suficiente de la región del borde izquierdo (LB) de *Agrobacterium tumefaciens*.

55 Las moléculas de ADN útiles como cebadores en los procedimientos de amplificación de ADN pueden derivar de las secuencias de los elementos genéticos del inserto transgénico contenido en el evento MON89034. Estas moléculas cebadoras se pueden usar como parte de un conjunto de cebadores que también incluye una molécula cebadora de ADN derivada del genoma del evento flanqueante del inserto transgénico.

La porción del ADN plasmídico pMON38850 insertado en el genoma del maíz, que da lugar al evento de la planta de maíz transgénico MON89034, que consiste en los segmentos de los bordes derecho e izquierdo y los dos casetes de expresión vegetal unidos (un primer casete de expresión que codifica Cry1A.105 y un segundo casete de expresión que codifica Cry2Ab, en el que cada casete puede ser intercambiable en lo que respecta a su uno se designa como un casete primero o segundo) entre los segmentos del borde se caracterizó mediante análisis molecular detallado. Estos análisis se realizaron para identificar eventos que contenían únicamente un único segmento insertado intacto que consiste en los bordes y los dos casetes de expresión deseados entre los bordes (número de sitios de integración dentro del genoma de maíz), el número de copias (el número de copias del ADN de transformación (T) dentro de un locus y la integridad de los casetes génicos insertados (es decir, ausencia de reordenamientos o variación de secuencia con respecto a la secuencia que se sabe que está presente en el plásmido pMON38850). Se usaron sondas moleculares de ADN que incluían la región codificadora de Cry1A.105 intacta y sus respectivos elementos reguladores, los promotores, intrones y secuencias de poliadenilación de los casetes de expresión vegetales y la región de ADN de la estructura del plásmido pMON38850. Los datos obtenidos de los análisis de todos los eventos demostraron que MON89034 contiene una única inserción de ADN de transformación (T) con una copia del casete de expresión Cry1A.105. No se detectaron en el genoma de MON89034 segmentos adicionales del vector de transformación pMON38850, unidos o no unidos a casetes génicos intactos. Por último, se realizaron análisis de PCR y de la secuencia de ADN para determinar las uniones en 5' y 3' del genoma del inserto en la planta, se confirma la organización de los elementos dentro del inserto (véase, por ejemplo, la Figura 1), y para determinar la secuencia completa del ADN insertado en el genoma de la planta de maíz que dio lugar al evento de maíz transgénico MON89034. La secuencia insertada completa, junto con una porción de las secuencias flanqueantes del genoma de maíz en cualquiera de los extremos del ADN insertado, se representa en la secuencia como se expone en la SEC ID N° 5.

EL ADN genómico de MON89034 y no se extrajo ADN no transgénico del maíz aparte de MON89034 (ADN control) de la semilla de maíz procesando primero la semilla (hasta 200 semillas) en un polvo fino en un agitador de pintura Harbil 5G-HD (Harbil Inc, Cincinnati, Ohio). En resumen, la semilla en polvo se extrajo en el tampón de extracción (EM Science N° de Cat., EM Science, Gibbstown, New Jersey, EE.UU.) y el ADN precipitó en una solución con isopropanol (Sigma N° de Cat. I-0398, Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.). El ADN precipitado se desenrolló en un tubo de microcentrífuga que contenía 70% de etanol. El ADN se sedimentó en una microcentrífuga a velocidad máxima (aprox. 14,000 rpm) durante ~ 5 minutos, se secó al vacío y se volvió a disolver en tampón ET (pH 8,0). Después, el ADN se almacenó en un refrigerador a 4°C. Un experto en la técnica puede modificar este procedimiento para extraer ADN de una única semilla de maíz.

Ejemplos de procedimientos usados para identificar el evento MON89034 en una muestra se describen en un criterio de valoración específico del evento TAQMAN[®] PCR del que se describen ejemplos de condiciones en la Tabla 1 y la Tabla 2. Los cebadores de ADN usados en los ensayos son los cebadores SQ2842 (SEC ID N° 6), SQ2843 (SEC ID N° 7), cebador PB880 marcado con 6FAM[™] (SEC ID N° 14) y el cebador PB2931 marcado con VIC[™] (SEC ID N° 15), 6FAM y VIC son productos colorantes fluorescentes de Applied Biosystems (Foster City, CA) unidos a los cebadores de ADN. Para las sondas TAQMAN[®] MGB, la actividad 5'-exonucleasa de la ADN polimerasa Taq escinde la sonda desde el extremo 5' entre el fluoróforo y el inactivador. Cuando se hibrida con la hebra de ADN diana, el inactivador y el fluoróforo se separan lo suficiente en el espacio tridimensional para producir una señal fluorescente (longitud de onda de excitación del fluoróforo).

SQ2842 (SEQ ID NO:6) y SQ2843 (SEC ID N° 7), cuando se usan en estos procedimientos de reacción con PB880 (SEC ID N° 14) producen un amplicón de ADN que es diagnóstico del ADN del evento MON89034. Los controles para este análisis deberían incluir un control positivo del evento que contiene maíz MON89034, un control negativo de maíz no transgénico o de maíz transgénico distinto a MON89034 y un control negativo que no contiene ADN molde.

SQ1564 (SEQ ID NO:17) y SQ1565 (SEC ID N° 18), cuando se usan en estos procedimientos de reacción con PB351 (SEC ID N° 21) producen un amplicón que es diagnóstico de Cry1A.105 en MON89034.

Estos ensayos se optimizan para su uso con un sistema Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700 o Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700 o Eppendorf Mastercycler Gradient thermocycler Otros procedimientos y aparatos conocidos por los expertos en la técnica que producen amplicones que identifican el ADN del evento MON89034 están dentro de la experiencia en la materia.

Cualquier sonda que se une específicamente a la SEC ID N° 1 o a su secuencia complementaria perfecta en una muestra biológica y contiene al menos 11 nucleótidos contiguos como se expone en la SEC ID N° 1, o según sea el caso, la complementaria inversa de la secuencia en la SEC ID N° 1, siempre que la unión se pueda detectar, es diagnóstica de la presencia de ADN del evento de maíz MON89034 en dicha muestra. Cualquier sonda que se une específicamente a la SEC ID N° 2 o a su secuencia complementaria perfecta en una muestra biológica y contiene al menos 11 nucleótidos contiguos como se expone en la SEC ID N° 2, o según sea el caso, la complementaria inversa de la secuencia en la SEC ID N° 2, siempre que la unión se pueda detectar, es diagnóstica de la presencia de ADN del evento de maíz MON89034 en dicha muestra.

5 Cualquier par de cebadores que se use o designe para usar en la producción de un amplicón de una muestra biológica que comprende ADN de maíz y el amplicón comprende la SEC ID N° 1 o la SEC ID N° 2, o según sea el caso, comprende ambas secuencias, se considera dentro del alcance de la presente invención. Cualquiera de estos amplicones que comprende la SEC ID N° 1 o SEC ID N° 2, o ambas, se consideran para los fines de la invención divulgadas en el presente documento, que son diagnósticos de la presencia de ADN del evento de maíz MON89034 en dicha muestra biológica. Los siguientes son ejemplos meramente ilustrativos.

Tabla 1. Criterio de valoración TAQMAN® PCR específico del evento de maíz MON89034

Etapa	Reactivo	Cantidad	Comentarios
1	Agua sin nucleasa	Añadir hasta un volumen final de 10 µl	-
2	2x Mezcla maestro universal (Applied Biosystems n° de cat. # 4304437)	5 µl	1 X concentración final
3	Cebadores SQ2842 (SEC ID N° 6) y SQ2843 (SEC ID N° 7) resuspendidos en agua sin nucleasa hasta una concentración de µM cada uno)	0,5 µl	Concentración final 1,0 µM
4	Cebador 6F AM™ PB880 (SEC ID N° 14) (resuspendido en agua sin nucleasa hasta una concentración de 10 µM)	0,2 µl	Concentración final 0,2 µM
5	Cebador control interno SQ2842 y cebador control interno SQ2843	0,2 µl	Concentración final 0,2 µM
6	ADN extraído (molde):	3,0 µl	Diluido en agua
	Muestras a analizar (hojas individuales)	• 4-80 ng de ADN genómico	
	• Control negativo	• 4 ng de ADN genómico de maíz no transgénico	
	• Control negativo	• Sin molde de ADN (solución en la cual se resuspendió el ADN)	
	• Control positivo		
		• 4 ng de ADN genómico de maíz heterocigoto del evento	
	• Control positivo		
		• 4 ng de ADN genómico de maíz homocigoto del evento conocido	
7	Mezclar lentamente, añadir 1-2 gotas de aceite mineral en cada reacción.		

5 La amplificación del ADN se puede establecer y realizar usando cualquier medio para termociclado, incluyendo manipulaciones manuales o manipulaciones controladas electrónicamente de las etapas y ciclos de temperatura. Se han usado con éxito cicladotes térmicos Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700, o Eppendorf Mastercycler Gradient thermocycler o Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700 o MJ Research DNA Engine PTC-225 para realizar los siguientes parámetros de ciclado. Cuando se realiza la PCR en el Eppendorf Mastercycler Gradient o MJ Engine, el termociclador se cicló en el modo calculado. Al usar el Perkin-Elmer 9700, las condiciones de ciclado se realizaron con la velocidad de pendiente fijada al máximo.

Tabla 2. Condiciones de termociclador del ensayo de cigosidad

Nº de ciclo	Parámetros: Sistema GeneAmp PCR System 9700 de Applied Biosystems
1	50 °C 2 minutos
1	95 °C 10 minutos
10	95 °C 15 segundos
	64 °C 1 minuto (-1°C/ciclo)
30	95 °C 15 segundos
	54 °C 1 minuto
1	10 °C por siempre

10 Ejemplo 2

Este ejemplo ilustra la identificación de una planta de maíz que comprende ADN diagnóstico para el evento de maíz transgénico MON89034 en su genoma y la determinación de la cigosidad de dicha planta de maíz.

15 Los procedimientos usados para identificar la progenie heterocigota de homocigota que contiene el ADN del evento MON89034 en su genoma se describen en un ensayo de cigosidad para el cual se ilustran las condiciones en la Tabla 3 y la Tabla 4. Los cebadores de ADN ilustrativos usados en el ensayo de cigosidad son cebadores SQ2842 (SEC ID N° 6), SQ2843 (SEC ID N°:7), SQ6523 (SEC ID N° 10), SQ6524 (SEC ID N° 11), cebador PB880 marcado con 6FAM™ (SEC ID N° 14) y cebador PB2931 marcado con VIC™ (SEC ID N° 15). Como se ha indicado anteriormente, 6FAM y VIC son productos colorantes fluorescentes de Applied Biosystems (Foster City, CA) unidos al cebador de ADN.

20 SQ2842 (SEC ID N° 6), SQ2843 (SEC ID N° 7), SQ6523 (SEC ID N° 10), SQ6524 (SEC ID N° 11), cuando se usan juntos en una reacción de amplificación térmica en la que una muestra biológica que contiene ADN molde contiene ADN que es diagnóstico de la presencia del evento de maíz MON89034 en la muestra, produce un amplicón de ADN diagnóstico de ADN de maíz distinto al ADN del evento de maíz MON89034 (independiente de su el ADN de maíz deriva de no transgénico de alguna otra muestra transgénica). Como alternativa, a reacción producirá dos amplicones de ADN diferentes de una muestra biológica que contiene ADN derivado de un genoma de maíz que es heterocigoto para el alelo correspondiente al ADN insertado presente en el evento de maíz transgénico MON89034. Estos dos amplicones diferentes corresponderán a un primer amplicón que deriva del locus del genoma de maíz de tipo silvestre y un segundo amplicón que es diagnóstico de la presencia del ADN del evento de maíz MON89034. Una muestra de ADN de maíz que da lugar únicamente a un único amplicón correspondiente al segundo amplicón descrito para el genoma heterocigoto es diagnóstico de la presencia del evento de maíz MON89034 en la muestra y es diagnóstico para determinar que el ADN de maíz usado como molde surge de una semilla de maíz que es homocigota para el alelo correspondiente al ADN insertado del evento de maíz transgénico MON890364. Los controles para este análisis deberían incluir un control positivo del maíz homocigoto y heterocigoto que contiene ADN de maíz MON89034, un control negativo de maíz no transgénico o de cualquier otra variedad de maíz y un control negativo que no contiene ADN molde. Este ensayo se optimiza para su uso con un termociclador Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700, o Eppendorf Mastercycler Gradient. Otros procedimientos y aparatos conocidos por los expertos en la técnica que producen amplicones que identifican la cigosidad de la progenie de cruces realizados con plantas de MON89034 están dentro de la experiencia en la materia.

40

Tabla 3. Condiciones de reacción del ensayo de cigosidad

Etapa	Reactivo	Cantidad	Comentarios
1	Agua sin nucleasa	Añadir hasta un volumen final de 5 µl	-
2	2x Mezcla maestro universal (Applied Biosystems nº de cat. # 4304437)	2,5 µl	1 X concentración final
3	Cebadores de SEC ID Nº 6) y de SEC ID Nº 7 (resuspendidos en agua sin nucleasa hasta una concentración de 20 µM)	0,05 µl	Concentración final 0,25 µM
4	Cebador PB880 de SEC ID Nº 14 6FAM™(resuspendido en agua sin nucleasa hasta una concentración de 10 µM)	0,01 µl	Concentración final 0,4 µM
5	Cebador PB2931 de SEC ID Nº 15 VIC™(resuspendido en agua sin nucleasa hasta una concentración de 10 µM)	0,01 µl	Concentración final 0,15 µM
6	ADN polimerasa <i>REDTaq</i> (1 unidad/µl)	1,0 µl (recomendado para cambiar las pipetas antes de la siguiente etapa)	1 unidad/reacción
7	ADN extraído (molde):	2,0 µl	Diluido en agua
	• Muestras a analizar (hojas individuales)	• 4-80 ng de ADN genómico	
	• Control negativo	• 4 ng de ADN genómico de maíz no transgénico	
	• Control negativo	• Sin molde de ADN (solución en la cual se resuspendió el ADN)	
	• Control positivo		
		• 4 ng de ADN genómico de maíz heterocigoto del evento	
	• Control positivo		
		• 4 ng de ADN genómico de maíz homocigoto del evento conocido	
8	Mezclar lentamente, añadir 1-2 gotas de aceite mineral en cada reacción.		

5 La amplificación del ADN en un termociclador Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700, o Eppendorf Mastercycler Gradient o Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700 o MJ Research DNA Engine PTC-225 se

han usado con éxito para realizar los siguientes parámetros de ciclado. Cuando se usa Eppendorf Mastercycler Gradient o MJ Engine, los ciclos se realizaron en el modo calculado. Al usar el Perkin-Elmer 9700, los ciclos se realizaron con la velocidad de pendiente fijada al máximo.

Tabla 4. Condiciones de termociclador del ensayo de cigosidad

Nº de ciclos en orden consecutivo	Temperatura y duración
1	50 °C 2 minutos
1	95 °C 10 minutos
10	95 °C 15 segundos
	64 °C 1 minuto (-1°C/ciclo)
30	95 °C 15 segundos
	54 °C 1 minuto
1	10 °C de empapado
a: Usando Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700	

5

La semilla correspondiente al evento transgénico MON89034 se han depositado el 28 de marzo de 2006 según el Tratado de Budapest con la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110. El número de acceso en la ATCC o designación de depósito de patentes es PTA-7455. El depósito se mantendrá en el depositario durante un periodo de 30 años o 5 años después de la última consulta o para la vida eficaz del patente, lo que sea más largo, y se reemplazará según sea necesario durante dicho periodo.

10

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> MONSANTO TECHNOLOGY LLC Anderson, HEATHER Douglas, Jennifer GROAT, JEANNA JOHNSON, SCOTT KELLY, REBECCA KORTE, JOHN RICE, JAMES

<120> PLANTA Y SEMILLA DE MAÍZ CORRESPONDIENTE AL EVENTO TRANSGÉNICO MON89034 Y SUS PROCEDIMIENTOS DE DETECCIÓN<130> 38-21(53618)0001

15

<150> 60/808,834

<151> 2006-05-26

<160> 22

<170> PatentIn versión 3.3

20

<210> 1

<211> 21

<212> ADN

<213> ARTIFICIAL

<220>

ES 2 498 976 T3

<223> 5' SECUENCIA DE UNIÓN; correspondiente a la SEC ID N° 5 en 2051-2071

<400> 1

aatgagtatg atggatcagc a 21

<210> 2

5 <211> 20

<212> ADN

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> 3' SECUENCIA DE UNIÓN; correspondiente a la SEC ID N° 5 en 11369-11388

10 <400> 2

actcattgca tccccggaaa 20

<210> 3

<211> 2071

<212> DNA

15 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> 5' SECUENCIA FLANQUEANTE MÁS UNIÓN; correspondiente a la SEQ ID NO:5 en 1-2071

<400> 3

```
aatatttaaa aatggaagta atactatatt aaaatgattc atgtggaact cctgcgcttc      60
tttttgaagt ttcaaaaggg agctttcagg gtcgcttaga gtttgtttgg ttggaaatac      120
aagcgaaaag agagctaatag agggggacat ccatattttc tatggtgttt gaataagagt      180
cacgcgggaa taagatgaac accgaaacaa tttttttgta gctacgtggt tccaaaaaat      240
cgagtagacg gtgtcgcttc cacctcatac tacttcaacc tcaaaccaca catccttacg      300
cgcccgccgg tgtctccgtc gtctcaagtt ctcaacatac ctacacatgt aaccactacc      360
ggtctttgtc atgtttcgaa agaagattac aggtcctcta gaagagagga cgcggggtgg      420
cgagaaagct ggggaagaaa aaggctagta catatgattg gtctgtgaac ctgtgaggtg      480
```

ES 2 498 976 T3

ggtaggtagg taggtggaga tttttgtaa ctggtgttgt tgacggactc gaacggggcc 540
 gggcgtgtgg tgtggctagc tgtggtggtt tgctcgccag ccagccagcc acacatcagc 600
 gagcatgcag agcttaagca tgtatgtacg gatcggcttg cttagcggtt aagggtgtgt 660
 ttggtttggc ttttgctttt ggcttttgcc ccctaaaagc caaaagccaa ccaaggggtgt 720
 atttggtttg acttttggct tttggctttt gtcccctaaa agccaaaagc caaacaagc 780
 gttagatcta ggaagcagct ttttctaaaa gctggctttc tcacagtgc aatctgaaag 840
 caccctgaa cctgctttta gtggcttttc gaatggaact gtgaaaacat atatcgaaga 900
 acttttaacg acttttagtg gtttccacca aacagtttag ctttttaacg gcttacagcc 960
 tacaacagct ttttccacag ctcacagccc acagcaactt ttttcacagc cacagcccaa 1020
 ccaaacagac cccaaagggc tgaatccagg aagcagcttt ttctaaaagc cgactttctc 1080
 gtagtgtaaa actgaaaaca cccctggacc tgcttttagt ggcttttggg tggaaactgtg 1140
 aaaacatata tcgaagaact ttttaacgact ttttagtggtt tccaccaaac gatttctagc 1200
 tttttaacag cacacagcct acaacagctt ttttcacagc tcacagccca caacaacttt 1260
 ttctacagcc acaaccacac caaacggacc ctaaggcggc cgagcgagcg caaagcgctc 1320
 tcagctttga ttgccatgcc atctcctgct ccacttgtct ctctggccgt cgtcagccac 1380
 catccaaca ggccggtgct actggcggct cctaggtaga cgacgacgac gacgacacct 1440
 ccaccgttcg ccgccgtcca ctcaccaatc aacacggaac gcccaaaaaca cacacacagc 1500
 cacgctgggg agggaaaaaa aggcagagac atatgcgtgc gtcgctgcat tattgtacgc 1560
 gatcgaatgg catctctctc actctctctc ctccctttat taatctggta ctggctagct 1620
 ggtccggcga caccgacgtg tcagctccgt cgcgcgcgtc cgtccgtccg ctggagcgga 1680
 cacggaccgc ggcgtctgtc gatcgccggc tcgccgcagc gcagctacct agcacgctca 1740
 cgcagcttac actgcctaca cgcacacggc cggcccaaaa gcgttccctg ccgcctgccc 1800
 gccggctttt ttattattat tggaaatga ggctatttct cctcccacac gggctacgac 1860
 gtgagcacga gtactgggat ccccgatcc gccctctctg tccctgctgc tactccagcc 1920
 actgaaatgt tgtcagatga aacagcagag ccgatctccg cacggaacc catgcacggc 1980
 cattcaaatt caggtgccca cgtacgtcag ggtgctgctg ctactactat caagccaata 2040
 aaaggatggt aatgagtatg atggatcagc a 2071

<210> 4

<211> 914

<212> DNA

5 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> 3' SECUENCIA FLANQUEANTE MÁS UNIÓN; correspondiente a la SEC ID N° 5 en 11369-12282

<400> 4

ES 2 498 976 T3

actcattgca tccccgaaa ttatgttttt ttaaaaacca cggattata gataccgtgt 60
tattttttga gtattggaaa tttcatttca acccaaagt tcttcatggc acatctagct 120
tttgctaata accatgtagg gctacatctt aaaaatctat actactatat taaagctgca 180
gggtagcct gtctccacct ggttctgcct cgagccaatc taaaccgtcc atctatatcc 240
atcaaatcag caccgtccgg tccgtgcgca cctcctctcc cgctattcag ttgcatactt 300
gcagcagggt ctcctcctc accatttcct ctgcctcctc tctcgctcac tggtcagatt 360
catcctgcct ctcccgatg cgctccctcc ccatgccccg tctcgacta tcgccacacc 420
tcaccgcggg gagacgaaga cggtaggacgc atcctcacct cctccgctag ttgtcgctct 480
tccatcctct tcaacaactt ctacataggg agaggcgggt cggcgtcccg acgccgccgc 540
ttctcccctc cccatggagg acgagaacat cgacctcggc ggcgggggcg atgcctccgc 600
tctgcataga ggagggttgt agtggaagc agcaatgcc aacccgaggc gggccaagac 660
taggcaaca taggacggca cggcgggttg tcagcgaggt ggcggcatcg tgtgccgcta 720
ccgaacaaca tctccggcgc tggagtcggt gagttactgc gccaccgga cgccctcaat 780
gcactgatat ctaccgggc tccatcgccg cccttctctc cttccctctc cctgtgcctc 840
cctctcttgc cctctcctt ccaactgctc ccgccccagc cctagcccaa ccacctccc 900
cgcagggtca cca 914

<210> 5

<211> 12208

5 <212> DNA

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> SECUENCIA DE ADN INSERTADO

<400> 5

ES 2 498 976 T3

aatatttaaa	aatggaagta	atactatatt	aaaatgattc	atgtggaact	cctgcgcttc	60
tttttgaagt	ttcaaaaggg	agctttcagg	gtcgcttaga	gtttgtttgg	ttggaaatac	120
aagcgaaaag	agagctaag	agggggacat	ccatattttc	tatggtgttt	gaataagagt	180
cacgcgggaa	taagatgaac	accgaaacaa	tttttttgta	gctacgtggt	tccaaaaaat	240
cgagtagacg	gtgtcgcttc	cacctcatac	tacttcaacc	tcaaaccaca	catccttacg	300
cgcccgccgg	tgtctccgtc	gtctcaagtt	ctcaacatac	ctacacatgt	aaccactacc	360
ggtctttgtc	atgtttcgaa	agaagattac	aggtcctcta	gaagagagga	cgcggggtgg	420
cgagaaaagct	ggggaagaaa	aaggctagta	catatgattg	gtctgtgaac	ctgtgagggtg	480
ggtaggtagg	taggtggaga	tttttgtaa	ctggtgttgt	tgacggactc	gaacggggcc	540
gggcgtgtgg	tgtggctagc	tgtggtggtt	tgctcgccag	ccagccagcc	acacatcagc	600
gagcatgcag	agcttaagca	tgtatgtacg	gatcggcttg	cttagcggtt	aagggtgtgt	660
ttggtttggc	ttttggcttt	ggcttttgcc	ccctaaaagc	caaaagccaa	ccaagggtgt	720
atgtgtttg	acttttgct	tttggtttt	gtcccctaaa	agccaaaagc	caaacaaagg	780
gtagatcta	ggaagcagct	ttttctaaaa	gctggctttc	tcacagtgca	aatctgaaag	840
caccctgaa	cctgctttta	gtggcttttc	gaatggaact	gtgaaaacat	atatcgaaga	900
acttttaacg	acttttagtg	gtttccacca	aacagttag	ctttttaacg	gcttacagcc	960
tacaacagct	ttttccacag	ctcacagccc	acagcaactt	ttttcacagc	cacagcccaa	1020
ccaaacagac	cccaaagggc	tgaatccagg	aagcagcttt	ttctaaaagc	cgactttctc	1080
gtagtgtaaa	actgaaaaca	cccctggacc	tgcttttagt	ggcttttggg	tggaactgtg	1140
aaaacatata	tcgaagaact	tttaacgact	tttagtggtt	tccaccaaac	gatttctagc	1200
tttttaacag	cacacagcct	acaacagctt	ttttcacagc	tcacagccca	caacaacttt	1260

ES 2 498 976 T3

ttctacagcc acaacccaac caaacggacc ctaaggcggc cgagcgagcg caaagcgctc 1320
 tcagctttga ttgccatgcc atctcctgct ccacttgtct ctctggccgt cgtcagccac 1380
 catccaacaa ggccgggtgct actggcggct cctaggtaga cgacgacgac gacgacacct 1440
 ccaccgttcg ccgccgtcca ctcaccaatc aacacggaac gcccaaaaca cacacacacg 1500
 cacgctgggg agggaaaaaa aggcagagac atatgctgct gtcgctgcat tattgtacgc 1560
 gatcgaatgg catctctctc actctctctc ctccctttat taatctggta ctggctagct 1620
 ggtccggcga caccgacgtg tcagctccgt cgcgccgctc cgtccgtccg ctggagcgga 1680
 cacggaccgc ggcgtctgtc gatcgccggc tcgccgcagc gcagctacct agcacgctca 1740
 cgcatgctac actgcctaca cgcacacggc cggcccaaaa gcgttcctg ccgcctgccg 1800
 gccggctttt ttattattat tggaacatga ggctatctt cctcccacac gggctacgac 1860
 gtgagcacga gtaactgggat ccccggtacc gccctctctg tccctgctgc tactccagcc 1920
 actgaaatgt tgtcagatga aacagcagag ccgatctccg cacggaaacc catgcacggc 1980
 cattcaaat caggtgccca cgtacgtcag ggtgctgctg ctactactat caagccaata 2040
 aaaggatggt aatgagatg atggatcagc aatgagatg atggtcaata tggagaaaaa 2100
 gaaagagtaa ttaccaatth tttttcaatt caaaaatgta gatgtccgca gcgttattat 2160
 aaaatgaaag tacattttga taaaacgaca aattacgatc cgtcgtatth ataggcgaaa 2220
 gcaataaaca aattattcta attcggaaat ctttatttcg acgtgtctac attcacgtcc 2280
 aaatgggggc ttagatgaga aacttcacga tttggcggc caaagcttg ttagtgga 2340
 gctagctttc cgatcctacc tgtcacttca tcaaaaggac agtagaaaag gaaggtggct 2400
 cctacaaatg ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc tctgccgaca 2460
 gtgttcccaa agatggacc ccaccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa gacgttccaa 2520
 ccacgtcttc aaagcaagtg gattgatgtg atatctccac tgacgtaagg gatgacgcac 2580
 aatcccacta tccttcgcaa gacccttct ctatataagg aagttcattt catttgaga 2640
 ggacacgctg acaagctgac tctagcagat cctctagaac catcttccac aactcaagc 2700
 cacactattg gagaacacac agggacaaca caccataaga tccaagggag gcctccgccg 2760
 ccgccggtaa ccacccgcc cctctctctt ttctttctcc gttttttttt ccgtctcggc 2820
 ctcgatcttt ggcttggtg gtttggtgg gcgagaggcg gcttcgtgcg cgcccagatc 2880
 ggtgcgcggg aggggcggga tctcgcggct ggggctctcg ccggcgtgga tccggcccgg 2940
 atctcgcggg gaatggggct ctcggatgta gatctcgcgat ccgccgttgt tgggggagat 3000
 gatggggggt ttaaaattc cgccgtgcta aacaagatca ggaagagggg aaaagggcac 3060
 tatggtttat atttttatat atttctgctg cttcgtcagg cttagatgtg ctatgcttt 3120
 ctttcttctt tttgtgggta gaatttgaat ccctcagcat tgttcatcgg tagttttct 3180
 tttcatgatt tgtgacaaat gcagcctcgt gcggagcttt tttgtaggta gaagtgatca 3240
 accatggaca acaacccaaa catcaacgag tgcattcccgt acaactgcct cagcaaccct 3300
 gaggtcgagg tgcctggcgg tgagcgcac gagaccggtt acaccccat cgacatctcc 3360
 ctctccctca cgcagttcct gctcagcgag ttcgtgccag gcgctggctt cgtcctgggc 3420
 ctctgggaca tcatctgggg catctttggc ccctcccagt gggacgcctt cctggtgcaa 3480

ES 2 498 976 T3

atcgagcagc tcatcaacca gaggatcgag gagttcgcca ggaaccaggc catcagccgc 3540
 ctggagggcc tcagcaacct ctaccaaadc tacgctgaga gcttccgcga gtgggaggcc 3600
 gaccccacta acccagctct ccgcgaggag atgcgcatcc agttcaacga catgaacagc 3660
 gccctgacca ccgccatccc actcttcgcc gtccagaact accaagtccc gctcctgtcc 3720
 gtgtactgcc aggccgccaa cctgcacctc agcgtgctga gggacgtcag cgtgtttggc 3780
 cagaggtggg gcttcgacgc cgccaccatc aacagccgct acaacgacct caccaggctg 3840
 atcggcaact acaccgacca cgctgtccgc tggtaacaaca ctggccgtcc tggacattgt 3900
 gtccctcttc ccgaactacg actcccgcac ctaccggatc cgcaccgtgt cccaactgac 3960
 ccgcgaaatc tacaccaacc ccgtcctgga gaacttcgac ggtagcttca ggggcagcgc 4020
 ccagggcatac gagggtcca tcaggagccc acacctgatg gacatcctca acagatcac 4080
 tatctacacc gatgccacc gcggcgagta ctactggtcc ggccaccaga tcatggcctc 4140
 cccggtcggc ttcagcggcc ccgagtttac cttcctctc tacggcacga tgggcaacgc 4200
 cgctccacaa caacgcatcg tcgctcagct gggccagggc gtctaccgca ccctgagctc 4260
 caccctgtac cgcaggccct tcaacatcgg tatcaacaac cagcagctgt ccgtcctgga 4320
 tggcactgag ttcgctacg gcacctcctc caacctgccc tccgctgtct accgcaagag 4380
 cggcacggtg gattccctgg acgagatccc accacagaac aacaatgtgc cccccaggca 4440
 gggtttttcc cacaggtcga gccacgtgtc catgttccgc tccggcttca gcaactcgtc 4500
 cgtagacatc atcagagctc ctatgttctc ttggatacac cgtagtgtg agttcaacaa 4560
 catcattgca tccgacagca ttactcaaat acccttggtg aaagcacata cacttcagtc 4620
 aggtactact gttgtcagag gtccagggtt tacaggagga gacattcttc gtcgcacaag 4680
 tggaggacc tttgcttaca ctattgtaa catcaatggc caattgcccc aaaggtatcg 4740
 tgcaagaatc cgctatgcct ctactacaaa ttcaggatc tacgtgactg ttgcaggtga 4800
 aaggatcttt gctggtcagt tcaacaagac tatggatacc ggtgaccctt tgacattcca 4860
 atcttttagc tacgcaacta tcaacacagc ttttacatc ccaatgagcc agagtagctt 4920
 cacagtaggt gctgacactt tcagctcagg gaatgaagt tacatcgaca ggtttgaatt 4980
 gattccagtt actgcaacc tcgaggctga gtacaacct gagagagccc agaaggctgt 5040
 gaacgccctc tttacctca ccaatcagct tggcttgaaa actaacgtta ctgactatca 5100
 cattgaccaa gtgtccaact tggtcaccta ccttagcgat gagttctgcc tcgacgagaa 5160
 gcgtgaactc tccgagaaag ttaaacacgc caagcgtctc agcgcagaga ggaatctctt 5220
 gcaagactcc aacttcaaag acatcaacag gcagccagaa cgtggttggg gtggaagcac 5280
 cgggatcacc atccaaggag gcgacgatgt gttcaaggag aactacgtca ccctctccgg 5340
 aactttcgac gagtgcctacc ctacctact gtaccagaag atcgatgagt ccaaactcaa 5400
 agccttcacc aggtatcaac ttagaggcta catcgaagac agccaagacc ttgaaatcta 5460
 ctcgatcagg tacaatgcca agcagagac cgtgaatgtc ccaggctact gttccctctg 5520
 gccactttct gcccaatctc ccattgggaa gtgtggagag cctaacagat gcgctccaca 5580
 ccttgagtgg aatcctgact tggactgctc ctgcagggat ggcgagaagt gtgccacca 5640
 ttctcatcac ttctccttgg acatcgatgt gggatgtact gacctgaatg aggacctcgg 5700

ES 2 498 976 T3

agtctgggtc atcttcaaga tcaagacca agacggacac gcaagacttg gcaaccttga 5760
 gtttctcgaa gagaaccat tggtcggtga agctctcgct cgtgtgaaga gagcagagaa 5820
 gaagtggagg gacaaactg agaaactcga atgggaaact aacatcgttt acaaggaggc 5880
 caaagagtcc gtggatgctt tgttcgtgaa ctccaatat gatcagttgc aagccgacac 5940
 caacatcgcc atgatccacg ccgcagacaa acgtgtgcac agcattcgtg aggcttactt 6000
 gcctgagttg tccgtgatcc ctggtgtgaa cgctgccatc ttcgaggaaac ttgagggacg 6060
 tatctttacc gcattctcct tgtacgatgc cagaaacgtc atcaagaacg gtgacttcaa 6120
 caatggcctc agctgctgga atgtgaaagg tcatgtggac gtggaggaaac agaacaatca 6180
 gcgttccgtc ctggttgtgc ctgagtggga agctgaagtg tcccaagagg ttagagtctg 6240
 tccaggtaga ggctacattc tccgtgtgac cgcttacaag gagggatacg gtgagggttg 6300
 cgtgaccatc cacgagatcg agaacaacac cgacgagctt aagttctcca actgcgtcga 6360
 ggaagaaatc tatcccaaca acaccgttac ttgcaacgac tacctgtga atcaggaaga 6420
 gtacggaggt gcctacacta gccgtaacag aggttacaac gaagctcctt ccgttctcgc 6480
 tgactatgcc tccgtgtacg aggagaaatc ctacacagat ggcagacgtg agaacccttg 6540
 cgagtccaac agaggttaca gggactacac accacttcca gttggctatg ttaccaagga 6600
 gcttgagtac tttcctgaga ccgacaaagt gtggatcgag atcggtgaaa ccgagggaaac 6660
 cttcatcgtg gacagcgtgg agcttctctt gatggaggaa taatgagatc tatcgattct 6720
 agaaggcctg aattctgcat gcgtttggac gtatgctcat tcaggttga gccaatttgg 6780
 ttgatgtgtg tgcgagttct tgcgagtctg atgagacatc tctgtattgt gtttctttcc 6840
 ccagtgtttt ctgtacttgt gtaatcggct aatcgccaac agattcggcg atgaataaat 6900
 gagaataaaa ttgttctgat tttgagtga aaaaaaagg aattagatct gtgtgtgttt 6960
 tttggatccc cggggcggcc gcgttaacaa gcttgagctc aggatttagc agcattccag 7020
 attgggttca atcaacaagg tacgagccat atcactttat tcaaattggg atcgccaaaa 7080
 ccaagaagga actccccatc tcaaaggttt gtaaggaaga attctcagtc caaagcctca 7140
 acaaggctag ggtacagagt ctccaaacca ttagccaaaa gctacaggag atcaatgaag 7200
 aatcttcaat caaagtaaac tactgttcca gcacatgcat catggtcagt aagtttcaga 7260
 aaaagacatc caccgaagac ttaaagttag tgggcatctt tgaaagtaat cttgtcaaca 7320
 tcgagcagct ggcttgtggg gaccagacaa aaaaggaatg gtgcagaatt gttaggcgca 7380
 cctaccaaaa gcatctttgc ctttattgca aagataaagc agattcctct agtacaagtg 7440
 gggacaacaaa taacgtggaa aagagctgtc ctgacagccc actcactaat gcgtatgacg 7500
 aacgcagtga cgaccacaaa agaattccct ctatataaga aggattcat tcccatttga 7560
 aggatcatca gatactcaac caatccttct aggatctacc gtcttcggta cgcgctcact 7620
 ccgccctctg cttttgttac tgccacgttt ctctgaaatg tctcttgtgt ggtgattgct 7680
 gagagtgtt tagctggatc tagaaatāca ctctgaaatc gtgttctgcc tgtgctgatt 7740
 acttgccgtc cttttagtag gcaaaatata gggacatggt agtacgaaac gaagatagaa 7800
 cctacacagc aatacgagaa atgtgtaatt tgggtcttag cggtatattat ttaagcacat 7860
 gttggtgtta tagggcactt ggattcagaa gtttctgtt aatttaggca caggcttcat 7920

ES 2 498 976 T3

actacatggg tcaatagtat agggattcat attataggcg atactataat aatttgttcg 7980
tctgcagagc ttattatttg ccaaaattag atattcctat tctgtttttg tttgtgtgct 8040
gttaaattgt taacgcctga aggaataaat ataaatgacg aaattttgat gtttatctct 8100
gctcctttat tgtgaccata agtcaagatc agatgcactt gttttaaata ttgttgtctg 8160
aagaaataag tactgacagt attttgatgc attgatctgc ttgtttgttg taacaaaatt 8220
taaaaataaa gagtttcctt tttgttgctc tccttacctc ctgatgggat ctagtatcta 8280
ccaactgaca ctatattgct tctctttaca tacgtatctt gctcgatgcc ttctccctag 8340
tgttgaccag tgttactcac atagtctttg ctcatcttcat tgtaatgcag ataccaagcg 8400
gcctctagag gatcagcatg gcgcccaccg tgatgatggc ctcgctcggc accgccgtcg 8460
ctccgttcca ggggctcaag tccaccgcca gcctccccgt cgcccgcgcg tcctccagaa 8520
gcctcggcaa cgtcagcaac ggcggaagga tccgggtgat gcaggttaaca aatgcatcct 8580
agctagtagt tctttgcatt gcagcagctg cagctagcga gttagtaata ggaagggaac 8640
tgatgatcca tgcattgact gatgtgtgtt gcccatccca tcccatttcc caaccccaaa 8700
cgaacaaaa cacacgtact acgtgcaggt gtggccggcc tacggcaaca agaagtctga 8760
gacgctgtcg tacctgccgc cgctgtcgac cggcgggccc atccgctgca tgcaggccat 8820
ggacaactcc gtcctgaact ctggctgcac caccatctgc gacgcctaca acgtcgcggc 8880
gcatgatcca ttcagcttcc agcacaagag cctcgacact gttcagaagg agtggacgga 8940
gtggaagaag aacaaccaca gcctgtacct ggaccccatc gtcggcacgg tggccagctt 9000
ccttctcaag aaggctggct ctctcgtcgg gaagcgcac cctctggaac tccgcaacct 9060
gatctttcca tctggctcca ccaacctcat gcaagacatc ctcagggaga ccgagaagtt 9120
tctcaaccag cgcctcaaca ctgataccct tgctcgcgtc aacgctgagc tgacgggtct 9180
gcaagcaaac gtggaggagt tcaaccgcca agtggaaca ttcctcaacc ccaaccgcaa 9240
tgcggtgcct ctgtccatca cttcttccgt gaacaccatg caacaactgt tcctcaaccg 9300
cttgctcag ttcagatgc aaggctacca gctgctcctg ctgccactct ttgctcaggc 9360
tgccaacctg cacctctcct tcattcgtga cgtgatcctc aacgctgacg agtggggcat 9420
ctctgcagcc acgctgagga cctaccgca ctacctgaag aactacacca gggactactc 9480
caactattgc atcaaacctt accagtcggc cttcaagggc ctcaatacga ggcttcacga 9540
catgctggag ttcaggacct acatgttctt gaacgtgttc gactacgtca gcatctggtc 9600
gctcttcaag taccagagcc tgcgtgtgtc cagcggcggc aacctctacg ccagcggctc 9660
tggccccaa caaactcaga gcttcaccag ccaggactgg ccattcctgt attcgttgtt 9720
ccaagtcaac tccaactacg tcctcaacgg cttctctggt gctcgcctct ccaacacctt 9780
ccccaacatt gttggcctcc ccggctccac cacaactcat gctctgcttg ctgccagagt 9840
gaactactcc ggcggcatct cgagcggcga cattggtgca tcgccgttca accagaactt 9900
caactgctcc accttcctgc cggcggctgt caccctgttc gtgaggtcct ggctcgacag 9960
cggctccgac cgcgagggcg tggccaccgt caccaactgg caaaccgagt ccttcgagac 10020
cacccttggc ctccggagcg gcgccttcac ggcgcgtgga aattctaact acttccccga 10080
ctacttcatc aggaacatct ctgggtgttc tctcgtcgtc cgcaacgagg acctccgccg 10140

ES 2 498 976 T3

tccactgcac tacaacgaga tcaggaacat cgcctctccg tccgggacgc cgggaggtgc 10200
aagggcgtag atggtgagcg tccataacag gaagaacaac atccacgctg tgcatgagaa 10260
cggctccatg atccacctgg cgccaatga ttacaccggc ttcacatct ctccaatcca 10320
cgccacccaa gtgaacaacc agacacgcac cttcatctcc gagaagttcg gcaaccaggg 10380
cgactccctg aggttcgagc agaacaacac caccgccagg tacaccctgc gcggcaacgg 10440
caacagctac aacctgtacc tgcgctcag ctccattggc aactccacca tcagggtcac 10500
catcaacggg aggggtgaca cagccaccaa tgtgaacacg acgaccaaca atgatggcgt 10560
caacgacaac ggcgcccgtc tcagcgacat caacattggc aacgtggtgg ccagcagcaa 10620
ctccgacgtc ccgctggaca tcaacgtgac cctgaactct ggcacccagt tcgacctcat 10680
gaacatcatg ctggtgcaa ctaacatctc gccgctgtac tgataggagc tctgatcccc 10740
atgggaattc ccgatcgttc aacatttgg caataaagt tcttaagatt gaatcctggt 10800
gccggtcttg cgatgattat catataattt ctgttgaatt acgttaagca tgtaataatt 10860
aacatgtaat gcatgacgtt atttatgaga tgggttttta tgattagagt cccgcaatta 10920
tacatttaat acgcataga aaacaaaata tagcgcgcaa actaggataa attatcgcgc 10980
gcggtgtcat ctatgttact agatcgggga tatccccggg gcggccgcgg ggaattcggg 11040
accaagcttt ggcgcgcaa atcgtgaagt ttctcatcta agccccatt tggacgtgaa 11100
tgtagacacg tcgaaataaa gatttccgaa ttagaataat ttgtttattg ctttcgcta 11160
taaatacgac ggatcgtaat ttgtcgtttt atcaaaatgt actttcattt tataataacg 11220
ctgcggacat ctacattttt gaattgaaaa aaaattggta attactcttt ctttttctcc 11280
atattgacca tcatactcat tgcacccccg gaaattatgt ttttttaaaa accacgggat 11340
tatagatacc gtgttatttt ttgagtattg gaaatttcat ttcaaccaa agtttcttca 11400
tggcacatct agcttttgcc taataccatg tagggctaca tcttaaaaat ctatactact 11460
atattaaagc tgcaggggta gcctgtctcc acctgttct gcctcgagcc aatctaaacc 11520
gtccatctat atccatcaaa tcagcaccgt ccggtccgtg cgcacctcct ctcccgtat 11580
tcagttgcat acttgacgca ggttctccct cctcaccatt tcctctgcct cctctctcgc 11640
tacttggtca gattcatcct gcctctcccg catgcgctcc ctccccatgc cccgtctcgc 11700
actatcgcca cacctcaccg cggggagacg aagacggtgg acgcatctc acctcctccg 11760
ctagttgtcg ctcttccatc ctcttcaaca acttctacat agggagaggc ggttcggcgt 11820
cccgacgccg ccgcttctcc cctccccatg gaggacgaga acatcgacct cggcggcggg 11880
ggcgatgcct ccgctctgca tagaggaggg ttgtagtggc aagcagcaat gccaacaccg 11940
aggcgggcca agactaggca acaataggac ggcacgcccg gttgtcagcg aggtggcggc 12000
atcgtgtgcc gctaccgaac aacatctccg gcgctggagt cggtagtga ctgcgccacc 12060
cggacgccct caatgcactg atatctacc ggtctccatc gccgcccttc ctcccttccc 12120
tctccctgtg cctccctctc ttgcccctctc ccttccaact gctcccgcc cagccctagc 12180
ccaaccacct cccgcgcagg gtcaccaa 12208

<210> 6

<211> 22

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> SECUENCIA SINTÉTICA; correspondiente a la SEC ID N° 5 a 2034-2055

<400> 6

gccataaaa ggatggaat ga 22

5 <210> 7

<211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> SECUENCIA SINTÉTICA; correspondiente a la SEC ID N° 5 en 11345-11367

<400> 7

cttttctcc atattgacca tca 23

<210> 8

<211> 20

15 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> SECUENCIA SINTÉTICA

<400> 8

20 ggatcccctc cagaccagca 20

<210> 9

<211> 24

<212> ADN

<213> Artificial

25 <220>

<223> SECUENCIA SINTÉTICA

<400> 9

gtgactcct tctggatgtt gtaa 24

<210> 10

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

5 <220>

<223> SECUENCIA SINTÉTICA

<400> 10

gtcagggtgc tgctgctgct a 21

<210> 11

10 <211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> SECUENCIA SINTÉTICA

15 <400> 11

ggtttaagaa ccattttgct ccc 23

<210> 12

<211> 24

<212> ADN

20 <213> Artificial

<220>

<223> SECUENCIA SINTÉTICA; correspondiente a la SEC ID N° 5 en 2003-2026

<400> 12

tacgtcaggg tgctgctgct acta 24

25 <210> 13

<211> 24

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> SECUENCIA SINTÉTICA

<400> 13

atratttycg gggatgcaac caac 24

5 <210> 14

<211> 16

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> SECUENCIA SINTÉTICA; correspondiente a la SEC ID N° 5 en 2061-2076

<400> 14

atggatcagc aatgag 16

<210> 15

<211> 26

15 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> SECUENCIA SINTÉTICA

<400> 15

20 ctgtcaagcc aataaaaggg ttgttt 26

<210> 16

<211> 26

<212> ADN

<213> Artificial

25 <220>

<223> SECUENCIA SINTÉTICA

<400> 16

ctgtcaagcc aataaaaggg ttgttt 26

<210> 17

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

5 <220>

<223> SECUENCIA SINTÉTICA

<400> 17

caactcgtcc gtgagcatca 20

<210> 18

10 <211> 24

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> SECUENCIA SINTÉTICA; complementaria inversa de la secuencia correspondiente a la SEC ID N° 5 en 4605-4628

<400> 18

aactcagcac tacggtgat ccaa 24

<210> 19

<211> 16

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> SECUENCIA SINTÉTICA

<400> 19

25 gcctgccgca gaccaa 16

<210> 20

<211> 22

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> SECUENCIA SINTÉTICA

<400> 20

caatgcagag ctcagctca tc 22

5 <210> 21

<211> 17

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> SECUENCIA SINTÉTICA; correspondiente a la SEC ID N° 5 en 4587-4603

<400> 21

cagagctcct atgttct 17

<210> 22

<211> 26

15 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> SECUENCIA SINTÉTICA

<400> 22

20 tccagtacgt gcagtcctc ctcct 26

REIVINDICACIONES

1. Una planta de maíz resistente a insectos, o partes de la misma o semillas de la misma o progenie de la misma, que comprende una molécula de ADN que codifica Cry2Ab and Cry1A.105 en el genoma en las células de dicha planta de maíz, partes de la misma o progenie de la misma, en la que la molécula de ADN comprende los elementos siguientes: promotor e35S, líder sin traducir CAB de trigo, intrón de la actina del arroz, secuencia de codificación para Cry1A.105, secuencia de terminación y poliadenilación de HSP17 3' de trigo, promotor de FMV, intrón hsp70, secuencia de codificación del péptido dirigido a la subunidad pequeña en el cloroplasto de rubisco, secuencia de codificación de Cry2Ab, secuencia señal de poliadenilación y de terminación de nos en 3', en la que los extremos colocados opuestos de dicha molécula de ADN son un ADN que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 1 y un ADN que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 2, y en la que dicha molécula de ADN está presente en el evento de maíz MON89034 depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) con n° de acceso PTA-7455.
2. La planta de maíz resistente a insectos, o partes de la misma o semillas de la misma o progenie de la misma de la reivindicación 1, que comprende la secuencia de nucleótidos de SEC ID N° 5.
3. Una composición derivada de la planta de maíz o partes de la misma como se define en la reivindicación 1 o 2, en la que dicha composición comprende una cantidad detectable de una molécula de ADN que codifica Cry2Ab y Cry1A.105 y ADN que tiene las secuencias de nucleótidos de SEC ID N° 1 y 2, como se define en las reivindicaciones 1 o 2, y en la que dicha composición es un producto seleccionado de harina de maíz, aceite de maíz, torta de maíz, semilla de maíz, germen de maíz, almidón de maíz, harina de maíz, polen de maíz, barbas de maíz, licor de maceración de maíz, malta de maíz, azúcar de maíz, jarabe de maíz, margarina producida de aceite de maíz, sólidos de productos secos de destilación (DDGS), agente cosmético o formador de volumen.
4. Un procedimiento para producir una planta de maíz resistente a insectos, que comprende
- (a) transformar una célula de planta de maíz con una secuencia de nucleótidos que comprende la SEC ID N° 5; Y
- (b) regenerar una planta de maíz a partir de dicha célula transformada, en la que dicha planta de maíz comprende dicha molécula de ADN y es resistente a insectos.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, que además comprende:
- (c) seleccionar progenie que comprende secuencias de nucleótidos de SEC ID N° 1 y SEC ID N° 2, en la que dicha progenie seleccionada es una planta de maíz resistente a insectos, preferentemente dicha etapa de selección (c) incluye someter dicha planta obtenida en (b) a una reacción de amplificación de ácido nucleico, en la que se selecciona la progenie que produce un amplicón que comprende al menos una secuencia de nucleótidos de SEC ID N° 1 o SEC ID N° 2, o someter dicha al menos una planta progenie obtenida de (b) a una reacción de hibridación de ácido nucleico, en la que se selecciona la progenie híbrida con una sonda que hibrida en condiciones rigurosas con una o más secuencias de ADN seleccionadas de la SEC ID N° 1 y SEC ID N° 2.
6. Un procedimiento de protección de una planta de maíz de la infestación de insectos, que comprende proporcionar en la dieta de una plaga de lepidópteros del maíz una cantidad insecticidamente eficaz de célula(s) o tejido(s) de la planta de maíz, o partes de la misma, de la reivindicación 1 o 2.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que dicha plaga de lepidópteros se selecciona del cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*), taladro europeo del maíz (*Ostrinia nubilalis*), gusano elotero del maíz (*Helicoverpa zea*), taladro del maíz del suroeste (*Diatraea grandiosella*) y gusano gris (*Agrotis ipsilon*).
8. Un par de moléculas de ADN que comprenden: una primera molécula de ADN y una segunda molécula de ADN, en el que dicha molécula de ADN comprende al menos 18 nucleótidos contiguos de cualquier porción de la región de ADN de la SEC ID N° 3 o la SEC ID N° 5, o complementarias de las mismas, y dicha segunda molécula de ADN comprende una longitud similar de un ADN genómico de maíz flanqueante en 5' de SEC ID N° 3 o complementaria de la misma para funcionar como cebadores de ADN o sondas diagnósticas para el ADN extraído de la planta de maíz MON89034 o progenie de la misma.
9. El par de moléculas de ADN de la reivindicación 8, en el que:
- (i) dicha primera molécula de ADN comprende al menos 18 nucleótidos contiguos complementarios de la porción de ADN insertada heterólogo de SEC ID N° 5 y en la que dicha segunda molécula de ADN comprende al menos 18 nucleótidos contiguos de la porción del genoma de maíz de SEC ID N° 3; o
- (ii) dicha molécula de ADN híbrida específicamente con la SEC ID N° 5 de aproximadamente la posición nucleotídica 2060 hasta aproximadamente la posición nucleotídica 12.208 y en la que dicha segunda molécula de ADN híbrida

específicamente con la secuencia complementaria inversa correspondiente a la SEC ID N° 3 de aproximadamente la posición nucleotídica 1 a aproximadamente la posición nucleotídica 2.050.

5 10. Un par de moléculas de ADN que comprenden: una primera molécula de ADN y una segunda molécula de ADN, en el que dicha molécula de ADN comprende al menos 18 nucleótidos contiguos de cualquier porción de la región de ADN de la SEC ID N° 4 o la SEC ID N° 5, o complementarias de las mismas, y dicha segunda molécula de ADN comprende una longitud similar de un ADN genómico de maíz flanqueante en 3' de SEC ID N° 4 o complementaria de la misma para funcionar como cebadores de ADN o sondas diagnósticas para el ADN extraído de la planta de maíz MON89034 o progenie de la misma.

11. El par de moléculas de ADN de la reivindicación 10, en el que:

10 (i) dicha primera molécula de ADN comprende al menos 18 nucleótidos contiguos de la porción de ADN insertada heterólogo de SEC ID N° 5 y en la que dicha segunda molécula de ADN comprende al menos 18 nucleótidos contiguos de la porción del genoma de maíz de SEC ID N° 4; o

15 (ii) dicha molécula de ADN hibrida específicamente con la secuencia complementaria inversa correspondiente a la SEC ID N° 5 desde aproximadamente la posición nucleotídica 1 hasta aproximadamente la posición nucleotídica 11.305 y en la que dicha segunda molécula de ADN hibrida específicamente con la SEC ID N° 4 desde aproximadamente la posición nucleotídica 21 a aproximadamente la posición nucleotídica 914.

12. El par de moléculas de ADN de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que:

(i) dicha primera molécula de ADN comprende la SEC ID N° 6 y dicha segunda molécula de ADN comprende la SEC ID N° 7; o

20 (ii) dicha primera y segunda molécula de ADN comprende al menos 30 nucleótidos contiguos de SEC ID N° 3, SEC ID N° 4 o SEC ID N° 5.

13. Un procedimiento de detección de la presencia de una molécula de ADN seleccionada de las SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, and SEC ID N° 5 en una muestra biológica, comprendiendo el procedimiento:

25 (a) poner en contacto dicha muestra biológica con un par de cebadores de ADN que comprende moléculas de ADN de al menos 18 nucleótidos contiguos de la SEC ID N° 3 o su complementaria, la SEC ID N° 4 o su complementaria, la SEC ID N° 5 o su complementaria, para funcionar como cebadores de ADN o sondas diagnósticos del ADN extraído de la planta de maíz MON89034 o progenie de la misma;

(b) proporcionar una condición de reacción de amplificación de ácido nucleico;

30 (c) realizar dicha reacción de amplificación de ácido nucleico, produciendo de este modo una molécula amplicón de ADN; y

(d) detectar dicha molécula amplicón de ADN en la que la detección de un amplicón que comprende al menos una de la SEC ID N° 1, SEC ID N° 2 y complementarias de las mismas es indicativo de dicha molécula de ADN en dicha muestra biológica.

35 14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que dicha muestra biológica es una muestra de ADN extraída de una planta de maíz.

15. Un procedimiento de detección de la presencia de una molécula de ADN seleccionada de las SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, and SEC ID N° 5 en una muestra biológica, comprendiendo el procedimiento:

40 (a) poner en contacto dicha muestra biológica con una sonda de ADN que hibrida en condiciones rigurosas con dicha molécula de ADN y no hibrida en las condiciones rigurosas con una muestra biológica que no contiene dicha molécula de ADN:

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

(c) detectar la hibridación de dicha sonda de ADN a dicha muestra biológica, en la que la detección de hibridación es indicativa de la presencia de dicha molécula de ADN en dicha muestra biológica.

16. El procedimiento de la reivindicación 15, en el que:

(i) dicha muestra biológica es una muestra de ADN extraída de una planta de maíz; y/o

(ii) dicha sonda de ADN comprende la SEC ID N° 1 o la SEC ID N° 2, o complementaria de las mismas; y/o

(iii) dicha sonda de ADN está marcada con al menos un fluoróforo.

5 17. El procedimiento de la reivindicación 13 o 15, en la que dicha muestra biológica se selecciona de harina de maíz, aceite de maíz, torta de maíz, semilla de maíz, germen de maíz, almidón de maíz, harina de maíz, polen de maíz, barbas de maíz, licor de maceración de maíz, malta de maíz, azúcar de maíz, jarabe de maíz, margarina producida de aceite de maíz, sólidos de productos secos de destilación (DDGS), agente cosmético o formador de volumen.

10 18. Un kit de detección de ADN que comprenden: al menos una molécula de ADN que comprende al menos 18 nucleótidos contiguos homólogos o complementarios a las SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, o SEC ID N° 5, para funcionar como cebador o sonda de ADN específico del evento de maíz MON89034 y/o su progenie.

19. El kit de detección de ADN de la reivindicación 18, en el que (i) dicha al menos una molécula de ADN comprende las SEC ID N° 1, SEC ID N° 2, o complementarias de las mismas, preferentemente dicha al menos una molécula de ADN es la SEC ID N° 1, SEC ID N° 2, o complementarias de las mismas; o (ii) dicho kit comprende un par de moléculas de ADN de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14.

15 20. Un procedimiento de determinar la cigosidad del ADN de una planta de maíz que comprende el evento de maíz MON89034 en una muestra biológica que comprende:

20 (a) poner en contacto dicha muestra con un conjunto de cebadores que comprenden las SEC ID N° 6, SEC ID N° 7, y SEC ID N° 10, que (1) cuando se usan juntas en una reacción de amplificación de ácido nucleico que comprende ADN del evento de maíz MON89034, produce un primer amplicón que es diagnóstico del evento de maíz MON89034 y (2) cuando se usa en una reacción de amplificación de ácido nucleico que comprende ADN genómico distinto al ADN de MON89034 produce un segundo amplicón que es diagnóstico del ADN genómico de maíz distinto al ADN de MON89034.

(b) realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico; y

25 (c) detectar los amplicones producidos de este modo, en los que la detección de la presencia de ambos amplicones indica que dicha muestra es heterocigota del ADN del evento de maíz MON89034, en el que la detección de sólo el primer amplicón indica que dicha muestra es homocigota para el ADN del evento de maíz MON89034.

21. El procedimiento de la reivindicación 20, en el que dicho conjunto de cebadores se usa adicionalmente con las SEC ID N° 14 y la SEC ID N° 15.

30 22. Un procedimiento de detectar la presencia del ADN correspondiente al ADN de planta de maíz MON89034 en una muestra, comprendiendo el procedimiento:

(a) poner en contacto la muestra que comprende ADN con un par de cebadores que cuando se usan en una reacción de amplificación de ácido nucleico con ADN genómico de la planta de maíz MON89034, produce un amplicón que comprende las SEC ID N° 1 y la SEC ID N° 2; y

(b) realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico, de modo se produce el amplicón; y

35 (c) detectar al amplicón.

23. Un procedimiento de detectar la presencia del ADN correspondiente al ADN de planta de maíz MON89034 en una muestra, comprendiendo el procedimiento:

40 (a) poner en contacto la muestra que comprende ADN con una sonda que hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con ADN genómico de la planta de maíz MON89034 y no hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con una planta de maíz control, en el que dicha sonda es homóloga o complementaria de la SEC ID N° 1 o la SEC ID N° 2; y

(b) someter la muestra biológica y la sonda de de las condiciones de hibridación rigurosas; y

(c) detectar la hibridación de la sonda al ADN.

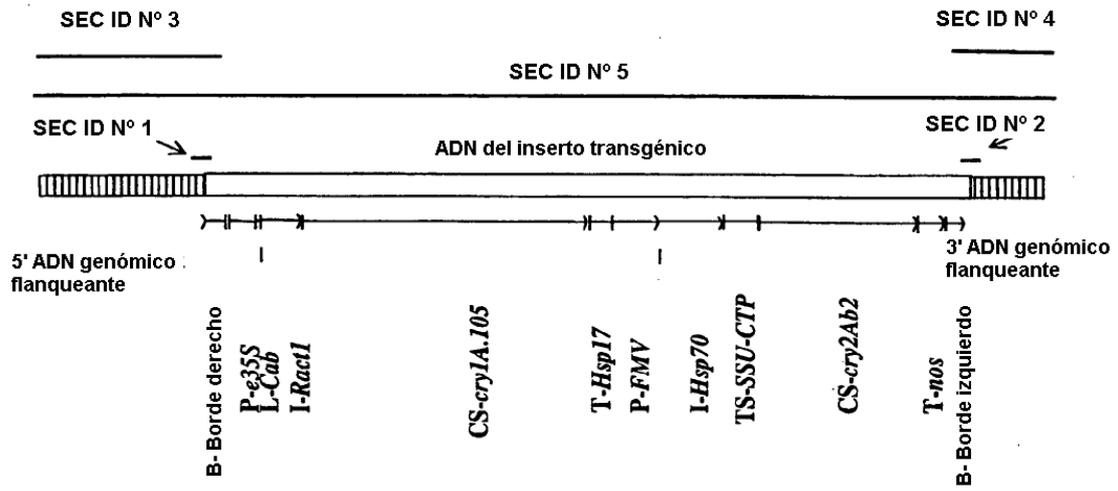


Figura 1