

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 980**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/10 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

C07K 14/325 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.10.2004 E 10015576 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015 EP 2333082**

54 Título: **Líneas de algodón transgénico Cry1F y Cry1Ac y su identificación específica de evento**

30 Prioridad:

26.03.2004 US 556586 P

27.09.2004 US 613851 P

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

23.03.2015

73 Titular/es:

DOW AGROSCIENCES LLC (100.0%)

9330 Zionsville Road

Indianapolis, IN 46268-1054, US

72 Inventor/es:

SONG, PING;

TAGLIANI, LAURA y

PELLOW, JOHN W.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 531 980 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

Líneas de algodón transgénico *Cry1F* y *Cry1Ac* y su identificación específica de evento

Antecedentes de la invención

5 El algodón es un importante cultivo para la obtención de fibras. Se ha aplicado el cruzamiento y la biotecnología al algodón para mejorar sus rasgos agronómicos y la calidad del producto. Uno de estos rasgos agronómicos es la resistencia a insectos, cuyas ventajas son claramente evidentes. Se han introducido genes que codifican proteínas insecticidas en plantas de algodón. Para mitigar la inquietud de que un tipo concreto de insecto pueda desarrollar resistencia a un único tipo de proteína insecticida, a menudo se desarrollan plantas que producen dos tipos diferentes de proteínas insecticidas. Así, la probabilidad de que un insecto sea capaz hipotéticamente de desarrollar resistencia a dos proteínas insecticidas diferentes es extremadamente baja.

10 En la técnica se conocen los genes y las proteínas insecticidas *Cry1Ac*. Véanse, por ejemplo, las patentes de EEUU n.ºs 6.114.138; 5.710.020; 6.251.656; y 6.229.004. En la técnica también se conocen los genes y las proteínas insecticidas *Cry1F*. Véanse, por ejemplo, las patentes de EEUU n.ºs 5.188.960; 5.691.308; 6.096.708; y 6.573.240.

15 La expresión de genes extraños en plantas se ve influida por el lugar en que se inserta el gen extraño en el cromosoma. Esto puede ser debido a la estructura de la cromatina (por ejemplo, heterocromatina) o a la proximidad de elementos de regulación transcripcional (por ejemplo, potenciadores) cercanos al sitio de integración (Weising *et al.*, *Ann. Rev. Genet.*, 22:421-477, 1988). Por ejemplo, el mismo gen en el mismo tipo de planta transgénica (u otro organismo) puede mostrar una amplia variación en el nivel de expresión entre diferentes eventos. También pueden existir diferencias en los patrones de expresión espacial o temporal. Por ejemplo, las diferencias en la expresión relativa de un transgén en diversos tejidos vegetales pueden no corresponderse con los patrones esperados a partir de los elementos reguladores transcripcionales presentes en la construcción del gen introducido.

20 Así, es necesario crear y seleccionar un gran número de eventos para identificar un evento que exprese óptimamente un gen de interés introducido. Para fines comerciales, es habitual producir de cientos a miles de eventos diferentes y seleccionar los eventos para un único evento que tenga los patrones y niveles de expresión del transgén deseados. Un evento que tenga los patrones y niveles de expresión del transgén deseados es útil para introducir el transgén en otros entornos genéticos mediante cruzamiento exogámico sexual empleando métodos de cruzamiento convencionales. La progenie de estos cruzamientos mantiene las características de expresión del transgén del transformante original. Esta estrategia se emplea para asegurar la expresión fiable de genes en una serie de variedades que están bien adaptadas a las condiciones de crecimiento locales.

25 Sería ventajoso poder detectar la presencia de un evento concreto para determinar si la progenie de un cruzamiento sexual contiene un transgén de interés. Además, un método para detectar un evento concreto sería útil para cumplir con las normas que requieren de una aprobación antes de la comercialización y el etiquetado de alimentos derivados de plantas de cultivos recombinantes, por ejemplo. Es posible detectar la presencia de un transgén mediante cualquier método de detección de ácidos nucleicos conocido, tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o la hibridación de ADN empleando sondas de ácidos nucleicos. Estos métodos de detección general se centran en elementos genéticos empleados con frecuencia, tales como promotores, terminadores, genes marcadores y similares. Como resultado, estos métodos pueden no ser útiles para discriminar entre diferentes eventos, en particular los producidos empleando la misma construcción de ADN, a menos que se conozca la secuencia del ADN cromosómico adyacente al ADN insertado ("ADN flanqueante"). Un ensayo de PCR específico de evento se analiza, por ejemplo, en Windels *et al.* (*Med. Fac. Landbouww, Univ. Gent.*, 64/5b:459462, 1999). Esto se relaciona con la identificación del evento de soja tolerante al glifosato 40-3-2 mediante PCR empleando un conjunto de cebadores que abarca la unión entre el inserto y el ADN flanqueante, más concretamente, un cebador incluye una secuencia del inserto y un segundo cebador incluye una secuencia del ADN flanqueante.

30 Las solicitudes de patente de EEUU 20020120964 A1 y 20040009504 A1 se refieren al evento del algodón PV-GHGT07(1445) y a composiciones y métodos para su detección. El documento WO 02/100163 se refiere al evento del algodón MONI5985 y a composiciones y métodos para su detección. El documento WO 2004/011601 se refiere a plantas con el evento del maíz MON863 y a composiciones y métodos para su detección. El documento WO 2004/072235 se refiere al evento del algodón MON 88913 y a composiciones y métodos para su detección. El documento WO 02/40677M se refiere al evento del algodón 531.

35 Sin embargo, hasta la fecha no se conocen específicamente procedimientos y materiales que puedan utilizarse para identificar específicamente el algodón apilado *Cry1F* y/o *Cry1Ac*, según se analiza a continuación.

Breve resumen de la invención

40 Esta invención se refiere al cruzamiento de plantas y a la protección de plantas frente a insectos. Más concretamente, esta invención incluye nuevos eventos de transformación de plantas de algodón que comprenden una o más secuencias polinucleotídicas, según se describen en la presente, insertadas en un sitio o sitios específicos dentro del genoma de una célula de algodón. En realizaciones muy preferidas, dichas secuencias polinucleotídicas codifican las proteínas inhibitoras de los insectos lepidópteros *Cry1F* y *Cry1Ac* "apiladas". Sin

embargo, la presente invención incluye plantas que presentan un único evento *Cry1Ac*, según se describe en la presente.

También se describen ensayos para detectar la presencia de uno o más de los presentes eventos en una muestra. La presente invención describe ADN y ensayos relacionados para detectar la presencia de ciertos eventos de resistencia a insectos en el algodón. Los ensayos se basan en las secuencias de ADN de construcciones recombinantes insertadas en el genoma del algodón y de las secuencias genómicas que flanquean los sitios de inserción. También se proporcionan kits y condiciones útiles para realizar los ensayos.

Así, la presente invención se refiere, en parte, a la clonación y el análisis de secuencias de ADN de insertos *cry1Ac* completos y sus regiones limítrofes (en líneas de algodón transgénico). Estas secuencias son exclusivas. Basándose en estas secuencias de insertos y limítrofes, se generaron cebadores específicos de evento. Un análisis de PCR demuestra que estos eventos pueden indentificarse mediante el análisis de los amplicones de PCR generados con estos conjuntos de cebadores específicos de evento. Así, pueden emplearse estos y otros procedimientos relacionados para identificar con exclusividad líneas de algodón que comprenden uno o más eventos de la presente invención.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 ilustra el transgén *cry1F* insertado y las secuencias flanqueantes para el evento del algodón 281-24-236. Esta figura también muestra los amplicones y los cebadores descritos en la presente.

La figura 2 ilustra el transgén *cry1Ac* insertado y las secuencias flanqueantes para el evento del algodón 3006-210-23. Esta figura también muestra los amplicones y los cebadores descritos en la presente.

Breve descripción de las secuencias

SEQ ID NO:1 es la secuencia de ADN para el inserto del evento *cry1F* de 281-24-236 y sus secuencias limítrofes.

SEQ ID NO:2 es la secuencia de ADN para el inserto del evento *cry1Ac* de 3006-210-23 y sus secuencias limítrofes.

SEQ ID NO:3 es la secuencia del cebador directo "281-14" empleado con el cebador inverso "281-15" para amplificar un amplicón de 603 pb que abarca la unión 5' entre las regiones flanqueantes y del inserto del evento *cry1F* de 281-24-236.

SEQ ID NO:4 es la secuencia del cebador inverso "281-15" empleado con el cebador directo "281-14" para amplificar un amplicón de 603 pb que abarca la unión 5' entre las regiones flanqueantes y del inserto del evento *cry1F* de 281-24-236.

SEQ ID NO:5 es la secuencia de 603 pb del amplicón producido empleando los cebadores de SEQ ID NO:3 y 4.

SEQ ID NO:6 es la secuencia del cebador directo "281-9" empleado con el cebador inverso "281-10" para amplificar un amplicón de 562 pb que abarca la unión 3' entre las regiones flanqueantes y del inserto del evento *cry1F* de 281-24-236.

SEQ ID NO:7 es la secuencia del cebador inverso "281-10" empleado con el cebador directo "281-9" para amplificar un amplicón de 562 pb que abarca la unión 3' entre las regiones flanqueantes y del inserto del evento *cry1F* de 281-24-236.

SEQ ID NO:8 es la secuencia de 562 pb del amplicón producido empleando los cebadores de SEQ ID NO:6 y 7.

SEQ ID NO:9 es la secuencia del cebador directo "3006-20" empleado con el cebador inverso "3006-22" para amplificar un amplicón de 614 pb que abarca la unión 5' entre las regiones flanqueantes y del inserto del evento *cry1Ac* de 3006-210-23.

SEQ ID NO:10 es la secuencia del cebador inverso "3006-22" empleado con el cebador directo "3006-20" para amplificar un amplicón de 614 pb que abarca la unión 5' entre las regiones flanqueantes y del inserto del evento *cry1Ac* de 3006-210-23.

SEQ ID NO:11 es la secuencia de 614 pb del amplicón producido empleando los cebadores de SEQ ID NO:9 y 10.

SEQ ID NO:12 es la secuencia del cebador directo "3006-9" empleado con el cebador inverso "3006-12" para amplificar un amplicón de 662 pb que abarca la unión 3' entre las regiones flanqueantes y del inserto del evento *cry1Ac* de 3006-210-23.

SEQ ID NO:13 es la secuencia del cebador inverso "3006-12" empleado con el cebador directo "3006-9" para amplificar un amplicón de 662 pb que abarca la unión 3' entre las regiones flanqueantes y del inserto del evento *cry1Ac* de 3006-210-23.

SEQ ID NO:14 es la secuencia de 662 pb del amplicón producido empleando los cebadores de SEQ ID NO:12 y 13.

SEQ ID NO:15 es un segmento de ADN genómico del algodón para el evento de 281-24-236 (faltan 53 bases).

SEQ ID NO:16 es un segmento de ADN genómico del algodón para el evento de 3006-210-23 (faltan 16 bases).

Descripción detallada de la invención

5 Esta invención se refiere al cruzamiento de plantas y la protección de plantas frente a insectos. Más concretamente, esta invención incluye nuevos eventos de transformación en plantas de algodón (por ejemplo, *Gossypium hirsutum* y *Gossypium barbadense*), que comprenden una o más secuencias polinucleotídicas, según se describen en la presente, insertadas en un sitio o sitios específicos dentro del genoma de una célula de algodón. En realizaciones muy preferidas, dichas secuencias polinucleotídicas codifican las proteínas inhibitoras de insectos lepidópteros Cry1F y Cry1Ac “apiladas”. Sin embargo, la presente invención incluye plantas que presentan un único evento
10 Cry1Ac, según se describe en la presente.

También se describen ensayos para detectar la presencia de uno o más de los presentes eventos en una muestra. Se describen métodos para diseñar y/o producir cualquiera de las moléculas de ácidos nucleicos de diagnóstico ejemplificadas o sugeridas en la presente, en particular las que se basan, total o parcialmente, en las presentes secuencias flanqueantes.

15 De modo más específico, la presente invención se refiere, en parte, a dos eventos del algodón transgénico (*cry1F* de 281-24-236 y *cry1Ac* de 3006-210-23), a líneas de plantas que comprenden estos eventos, y a la clonación y el análisis de las secuencias de ADN de estos insertos de *cry1Ac* y/o sus regiones limítrofes. Las líneas de plantas de la presente invención pueden detectarse empleando las secuencias descritas y sugeridas en la presente.

20 En realizaciones preferidas, esta invención se refiere a líneas de algodón resistentes a insectos y a su identificación, que produce dos proteínas insecticidas “apiladas” conocidas como *Cry1F* y *Cry1Ac*. En realizaciones preferidas, una línea de plantas de la presente invención comprende el evento *cry1F* de 281-24-236 y el evento *cry1Ac* de 3006-210-23. Sin embargo, las plantas de la presente invención pueden comprender el evento *Cry1Ac* o, preferiblemente, ambos eventos analizados en la presente.

25 Tal como se aludió anteriormente en la sección de antecedentes, la introducción y la integración de un transgén en el genoma de una planta implica algunos eventos aleatorios (de ahí el nombre “evento” para una inserción concreta que se expresa). Es decir, con muchas técnicas de transformación, tales como la transformación con *Agrobacterium*, la “pistola de genes”, y WHISKERS, es imposible predecir dónde se va a insertar el transgén en el genoma. Así, la identificación del ADN genómico vegetal flanqueante en ambos lados del inserto puede ser importante para identificar una planta que presenta un evento de inserción concreto. Por ejemplo, pueden diseñarse cebadores de
30 PCR que generen un amplicón de PCR que abarque la región de unión del inserto y el genoma del hospedante. Este amplicón de PCR puede emplearse para identificar un tipo exclusivo o diferenciado de evento de inserción.

Puesto que los “eventos” son eventos aleatorios y, en general, no pueden duplicarse, como parte de esta descripción se han depositado al menos 2500 semillas de una línea de algodón, que comprende el evento *cry1F* de
35 281-24-236 y el evento *cry1Ac* de 3006-210-23, y están disponibles al público sin restricciones (pero sometidas a derechos de patente), en the American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Md. 20852. El depósito se ha denominado ATCC n.º de depósito PTA-6233. El depósito se mantendrá sin restricciones en el depósito del ATCC, que es un depósito público, durante un periodo de 30 años, o cinco años después de la petición más reciente, o durante la vida efectiva de la patente, lo que abarque más tiempo, y será reemplazado si se convierte en no viable durante ese periodo.

40 Evidentemente, pueden cultivarse plantas de algodón a partir de estas semillas, y estas plantas son parte de la presente invención. La presente invención también se refiere a secuencias de ADN contenidas en estas plantas de algodón que son útiles para detectar estas plantas y su progenie. Los métodos de detección y kits de la presente invención pueden estar dirigidos a identificar cualquiera de uno, dos o incluso los tres eventos, dependiendo del objetivo final del ensayo.

45 En la presente se proporcionan definiciones y ejemplos para ayudar a describir la presente invención y para guiar a los expertos en la técnica para practicar la invención. A menos que se indique lo contrario, los términos y las expresiones deben entenderse según su utilización convencional por los expertos en la técnica pertinente. Se emplea la nomenclatura para las bases de ADN indicada en 37 CFR §1.822.

50 Un “evento” transgénico se produce por medio de la transformación de células vegetales con ADN heterólogo, es decir, una construcción de ácido nucleico que incluye un transgén de interés, la regeneración de una población de plantas que resultan de la inserción del transgén en el genoma de la planta, y la selección de una planta concreta que se caracteriza 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 el cruzamiento exogámico sexual entre el transformante y otra variedad que incluya el ADN genómico/del transgén. Incluso después de retrocruzamientos repetidos hasta un progenitor recurrente, el ADN del
55 transgén insertado y el ADN genómico flanqueante (ADN genómico/del transgén) del progenitor transformado sigue estando presente en la progenie del cruzamiento en la misma localización cromosómica. El término “evento” también

se refiere a ADN del transformante original y su progenie que comprende el ADN insertado y la secuencia genómica flanqueante inmediatamente adyacente al ADN insertado que se espera que va a transferirse a una progenie que recibe el ADN insertado que incluye el transgén de interés como resultado de un cruce sexual de una línea parental que incluye el ADN insertado (por ejemplo, el transformante original y la progenie que resulta de la autofertilización) y una línea parental que no contiene el ADN insertado.

Una "secuencia de unión" abarca el punto en que el ADN insertado en el genoma está unido al ADN del genoma nativo del algodón que flanquea el sitio de inserción, siendo suficiente la identificación o la detección de una u otra de las secuencias de unión en el material genético de una planta para diagnosticar el evento. Se incluyen las secuencias de ADN que abarcan las inserciones en los eventos del algodón descritos en la presente y longitudes similares del ADN flanqueante. En la presente se proporcionan ejemplos específicos de estas secuencias de diagnóstico; sin embargo, otras secuencias que se solapan con las uniones de las inserciones, o las uniones de las inserciones y la secuencia genómica, también son diagnósticas y pueden utilizarse según la presente invención.

La presente invención se refiere a la identificación de estas secuencias flanqueantes, de unión y del inserto. Según la presente invención, pueden emplearse métodos de análisis de PCR que emplean amplicones que abarcan el ADN insertado y sus límites (de *cry1F* de 281-24-236 y/o *cry1Ac* de 3006-210-23) para detectar o identificar líneas o variedades de algodón transgénico comercializadas derivadas de las presentes líneas de algodón transgénico patentadas.

Las secuencias completas de cada uno de estos insertos, junto con las respectivas secuencias flanqueantes, se proporcionan en la presente como SEQ ID NO:1 (*cry1F* de 281-24-236) y SEQ ID NO:2 (*cry1Ac* de 3006-210-23). La tabla I proporciona las coordenadas de las secuencias del inserto y flanqueantes para estos eventos.

Tabla I

Evento	Para la SEQ ID NO: indicada, localización del resto de:		
	5' flanqueante	Inserto	3' flanqueante
<i>cry1F</i> de 281-24-236 (SEQ ID NO:1)	1-2074	2.075-12.748	12.749-15.490
<i>cry1Ac</i> de 3006-210-23 (SEQ ID NO:2)	1-527	528-8.900	8.901-9.382

Estos eventos de inserción, y otros componentes de estos, se ilustran más a fondo en las figuras 1 y 2. Estas secuencias (en particular, las secuencias flanqueantes) son exclusivas. Basándose en estas secuencias del inserto y limítrofes, se generaron cebadores específicos de evento. Un análisis de PCR demostró que estas líneas de algodón pueden identificarse en diferentes genotipos de algodón mediante el análisis de los amplicones de PCR generados con estos conjuntos de cebadores específicos de evento. Por tanto, estos y otros procedimientos relacionados pueden utilizarse para identificar estas líneas de algodón. Las secuencias identificadas en la presente son exclusivas. Por ejemplo, las selecciones con BLAST en las bases de datos de GENBANK no revelaron ninguna homología significativa entre las secuencias limítrofes clonadas y las secuencias en la base de datos.

Las técnicas de detección son especialmente útiles junto con el cruzamiento de plantas, para determinar cuáles son las plantas de la progenie que comprenden un evento concreto, después de que una planta progenitora que comprende un evento de interés se cruce con otra línea de plantas para intentar impartir uno o más rasgos de interés adicionales a la progenie. Estos métodos de análisis de PCR aprovechan los programas de cruzamiento del algodón, así como el control de calidad, en especial para semillas de algodón transgénicas comercializadas. Ahora también se pueden fabricar y utilizar kits de detección de PCR para estas líneas de algodón transgénico. Esto también puede beneficiar el registro del producto y la gestión ambiental del producto.

Además, las secuencias de algodón flanqueantes pueden utilizarse para identificar específicamente la localización genómica de cada inserto. Esta información puede emplearse para fabricar sistemas de marcadores moleculares específicos para cada evento. Estos pueden utilizarse para acelerar estrategias de cruzamiento y para establecer datos de vinculaciones.

Además, la información de las secuencias flanqueantes puede emplearse para estudiar y caracterizar procesos de integración de transgenes, características del sitio de integración genómico, clasificaciones de eventos, estabilidad de los transgenes y sus secuencias flanqueantes, y expresión de genes (en especial relacionados con el silenciamiento de genes, patrones de metilación de transgenes, efectos de posición, y elementos relacionados con la expresión potenciales, tales como MARS (regiones de unión a la matriz) y similares).

Tal como se emplea en la presente, el término "algodón" significa *Gossypium hirsutum*, e incluye todas las variedades de plantas que pueden cruzarse con el algodón, que incluyen *Gossypium barbadense*.

Esta invención describe también procesos para realizar cruzamientos empleando una planta de la presente invención como al menos un progenitor. Por ejemplo, la presente invención incluyen una planta híbrida F₁ que tiene, como uno o ambos progenitores, cualquiera de las plantas ejemplificadas en la presente. También se incluyen en la invención las semillas producidas por dichos híbridos F₁ de la presente invención. Esta invención describe un método para producir una semilla híbrida F₁ mediante el cruzamiento de una planta ejemplificada con una planta diferente (por ejemplo, un progenitor endogámico), y la recolección de la semilla híbrida resultante. La presente invención incluye una planta ejemplificada que es un progenitor femenino o un progenitor masculino. Las características de las plantas resultantes pueden mejorarse estudiando cuidadosamente las plantas progenitoras.

Una planta de algodón resistente a insectos puede cruzarse realizando, en primer lugar, el cruzamiento sexual de una primera planta de algodón progenitora, que consiste en una planta de algodón cultivada a partir de una semilla de una cualquiera de las líneas indicadas en la presente, y una segunda planta de algodón progenitora, produciendo con ello una pluralidad de plantas de la primera progenie; y después seleccionando una planta de la primera progenie que sea resistente a insectos (o que posea al menos uno de los eventos de la presente invención); y realizando un cruzamiento endogámico con las plantas de la primera progenie, produciendo con ello una pluralidad de plantas de la segunda progenie; y después seleccionando de las plantas de la segunda progenie una planta que sea resistente a insectos (o que posea al menos uno de los eventos de la presente invención). Estas etapas pueden incluir también el retrocruzamiento de las plantas de la primera progenie o las plantas de la segunda progenie hasta la segunda planta de algodón progenitora o una tercera planta de algodón progenitora. Después puede plantarse un cultivo de algodón que comprenda las semillas de algodón de la presente invención, o su progenie.

También debe entenderse que dos plantas transgénicas diferentes también pueden cruzarse para producir una descendencia que contenga dos genes exógenos añadidos que se segregan de modo independiente. El cruzamiento endogámico de la progenie apropiada puede producir plantas que sean homocigóticas para ambos genes exógenos añadidos. También se contempla el retrocruzamiento hasta una planta parental y el cruzamiento exogámico con una planta no transgénica, así como la propagación vegetativa. Otros métodos de cruzamiento que habitualmente se emplean para diferentes rasgos y cultivos son conocidos en la técnica. La retrocruzamiento se ha empleado para transferir genes para un rasgo simplemente heredado y altamente heredable a una línea endogámica o cultivar homocigótico deseable, que es el progenitor recurrente. La fuente del rasgo que se va a transferir se denomina el progenitor donante. Se espera que la planta resultante tenga los atributos del progenitor recurrente (por ejemplo, cultivar) y el rasgo deseable transferido del progenitor donante. Después del cruzamiento inicial, los individuos que poseen el fenotipo del progenitor donante se seleccionan y se cruzan repetidamente (retrocruzamiento) hasta el progenitor recurrente. Se espera que el progenitor recurrente tenga los atributos del progenitor recurrente (por ejemplo, cultivar) y el rasgo deseable transferido del progenitor donante.

Las moléculas de ADN pueden emplearse como marcadores moleculares en un método de cruzamiento asistido por marcadores (MAB). Las moléculas de ADN pueden utilizarse en métodos (tales como marcadores AFLP, marcadores RFLP, marcadores RAPD, SNP, y SSR) que identifican rasgos útiles desde el punto de vista agronómico que estén genéticamente conectados, tal como se conoce en la técnica. El rasgo de resistencia a insectos puede ser rastreado en la progenie de un cruzamiento con una planta de algodón de la presente invención (o su progenie y cualquier otra variedad o cultivar de algodón) empleando los métodos MAB. Las moléculas de ADN son marcadores para este rasgo, y pueden emplearse los métodos MAB, que son muy conocidos en la técnica, para rastrear el rasgo o rasgos de resistencia a insectos en plantas de algodón, para las cuales al menos una línea de algodón de la presente invención, o su progenie, ha sido un progenitor o ancestro. Los métodos descritos pueden emplearse para identificar cualquier variedad de algodón que presente el evento de resistencia a insectos de la línea de algodón 281-24-236 (*cry1F*) y/o 3006-210-23 (*cry1Ac*).

Los métodos descritos incluyen un método para producir una planta de algodón resistente a insectos, en el que dicho método comprende un cruzamiento con una planta de la presente invención. Más concretamente, dichos métodos pueden comprender cruzar dos plantas de la presente invención, o una planta de la presente invención y cualquier otra planta. Los métodos preferidos comprenden también seleccionar la progenie de dicho cruzamiento analizando dicha progenie para un evento detectable según la presente invención.

Una planta preferida, o una semilla, de la presente invención comprende en su genoma al menos las secuencias del inserto del evento *cry1Ac* del algodón 3006-210-23, según se identifica en la tabla I, junto con al menos 20-500 o más nucleótidos flanqueantes contiguos en ambos lados del inserto, según se identifica en la tabla I. A menos que se indique lo contrario, "el evento *cry1Ac* del algodón 3006-210-23" se refiere a un ADN de SEQ ID NO:1 que incluye el ADN heterólogo insertado en el transformante original (nucleótidos 2075-12.748 de SEQ ID NO:1) y todas o parte de ambas secuencias genómicas flanqueantes de SEQ ID NO:1 (restos nucleótidos 1-2074 y 12.749-15.490) inmediatamente adyacentes al ADN insertado que se espera que se transfiera a la progenie, que recibe el ADN insertado como resultado de un cruzamiento sexual de una línea parental que incluye el evento. De modo similar, a menos que se indique lo contrario, "el evento *cry1Ac* del algodón 3006-210-23" se refiere a un ADN de SEQ ID NO:2 que incluye el ADN heterólogo insertado en el transformante original (nucleótidos 528-8900 de SEQ ID NO:2) y todas o parte de ambas secuencias genómicas flanqueantes de SEQ ID NO:2 (restos nucleótidos 1-527 y 8901-93821) inmediatamente adyacentes al ADN insertado que se espera que se transfiera a la progenie, que recibe el ADN insertado como resultado de un cruzamiento sexual de una línea parental que incluye el evento.

También se describen cultivos de tejidos de células regenerables de una planta de la presente invención. También se incluye una planta regenerada a partir de dicho cultivo de tejidos, en particular cuando dicha planta es capaz de expresar todas las propiedades morfológicas y fisiológicas de una variedad ejemplificada. Las plantas preferidas de la presente invención tienen todas las características fisiológicas y morfológicas de una planta cultivada a partir de la semilla depositada. Esta invención comprende también la progenie de dicha semilla y las semillas que poseen los rasgos de calidad de interés.

Las manipulaciones (tales como mutaciones, transfecciones posteriores, y cruzamientos posteriores) de plantas o semillas, o sus partes, pueden conducir a la creación de lo que se puede denominar variedades "fundamentalmente derivadas". The International Union for the Protection of New Varieties of Plants (UPOV) ha proporcionado las siguientes directrices para determinar si una variedad se ha derivado fundamentalmente de una variedad protegida:

[A] Se considera que una variedad se deriva fundamentalmente de otra variedad ("la variedad inicial") cuando:

(i) se deriva predominantemente de la variedad inicial, o de una variedad que, en sí misma, se deriva predominantemente de la variedad inicial, pero mantiene la expresión de las características esenciales que surgen del genotipo o combinación de genotipos de la variedad inicial;

(ii) es claramente distinguible de la variedad inicial; y

(iii) excepto por las diferencias que resultan del acto de la derivación, se ajusta a la variedad inicial en la expresión de las características esenciales que surgen del genotipo o combinación de genotipos de la variedad inicial.

UPOV, 6ª reunión con organizaciones internacionales, Ginebra, 30 de octubre, 1992, documento preparado por la Oficina de la Unión.

Tal como se emplea en la presente, una "línea" es un grupo de plantas que muestran poca o ninguna variación genética entre individuos para al menos un rasgo. Estas líneas pueden crearse mediante varias generaciones de autopolinización y selección, o mediante propagación vegetativa a partir de un único progenitor empleando técnicas de cultivos de tejidos o células.

Tal como se emplea en la presente, los términos "cultivar" y "variedad" son sinónimos y se refieren a una línea que se emplea para la producción comercial.

"Estabilidad" o "estable" significa que, con respecto a un componente dado, el componente se mantiene de generación en generación y, preferiblemente, al menos tres generaciones sustancialmente al mismo nivel, por ejemplo, preferiblemente $\pm 15\%$, más preferiblemente $\pm 10\%$, lo más preferiblemente $\pm 5\%$. La estabilidad puede verse afectada por la temperatura, la localización, el estrés y el momento de la plantación. La comparación de las posteriores generaciones en condiciones de campo debería producir el componente de una manera similar.

La "utilidad comercial" se define como que la planta tiene buen vigor y alta fertilidad, de modo que el cultivo puede ser producido por agricultores empleando un equipo agrícola convencional, y el aceite puede extraerse de las semillas con los compuestos descritos empleando un equipo de prensado y extracción convencional. Para que sea comercialmente útil, el rendimiento, según se mide mediante el peso de la semilla, el contenido en aceite, y el aceite total producido por hacer, estará dentro del 15% del rendimiento medio de una variedad de canola comercial comparable sin los rasgos de valor de calidad superior, que se cultive en la misma región.

"Agronómicamente elite" significa que una línea tiene características agronómicas deseables, tales como rendimiento, madurez, resistencia a enfermedades, y similares, además de la resistencia a insectos debida al evento o eventos de la presente.

Tal como reconocerán los expertos en la técnica a la luz de esta descripción, las realizaciones preferidas de kits de detección, por ejemplo, pueden incluir sondas y/o cebadores dirigidos a y/o que comprenden "secuencias de unión" o "secuencias de transición" (en las que la secuencia flanqueante genómica del algodón se une con la secuencia del inserto). Por ejemplo, esto incluye una sonda, un cebador o un amplicón polinucleotídico que comprende una secuencia que incluye los restos 2074-2075 o 12.748-12.749 de SEQ ID NO:1, o los restos 527-528 o 8.900-8.901 de SEQ ID NO:2, según se indica en la tabla I. Para que sean diagnósticos para estos eventos concretos, los "cebadores de unión" preferidos deben incluir al menos aproximadamente 15 restos e la secuencia flanqueante adyacente y al menos aproximadamente 15 restos de la secuencia del inserto adyacente. Con esta disposición, puede emplearse otro cebador en la región flanqueante o en la región del inserto para generar un amplicón detectable que indique la presencia de un evento de la presente invención. Sin embargo, en realizaciones preferidas, un cebador se une a la región flanqueante y otro se une en el inserto, y estos cebadores pueden emplearse para generar un amplicón que abarque (e incluya) una secuencia de unión, según se indicó anteriormente.

Los expertos en la técnica también reconocerán que pueden diseñarse cebadores y sondas para hibridarse, bajo una serie de condiciones de hibridación y/o PCR convencionales, con un segmento de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 y sus complementos, en los que el cebador y la sonda no son perfectamente complementarios con la secuencia ejemplificada. Es decir, puede tolerarse algún grado de despareamiento. Para un cebador de aproximadamente 20

nucleótidos, por ejemplo, generalmente no es necesario que uno o dos o unos cuantos nucleótidos se unan a la hebra opuesta si la base desapareada es interna o está en el extremo del cebador opuesto al amplicón. A continuación se proporcionan diversas condiciones de hibridación apropiadas. También pueden utilizarse análogos de nucleótidos sintéticos, tales como inosina, en las sondas. También pueden emplearse sondas de ácidos nucleicos peptídicos (PNA), así como sondas de ADN y ARN. Lo importante es que dichas sondas y cebadores sean diagnósticas (sean capaces de identificar y distinguir de forma exclusiva) de la presencia de un evento de la presente invención.

También debe advertirse que pueden producirse errores en la amplificación con PCR que pueden producir pequeños errores de secuenciación, por ejemplo. Es decir, a menos que se indique lo contrario, las secuencias listadas en la presente se determinaron generando amplicones largos a partir de ADN genómicos de algodón, y después clonando y secuenciando los amplicones. No es raro encontrar ligeras diferencias y pequeñas discrepancias en las secuencias generadas y determinadas de esta manera, debido a las muchas rondas de amplificación que son necesarias para generar los amplicones suficientes para la secuenciación a partir de ADN genómico. Por ejemplo, se indican las siguientes diferencias entre las secuencias determinadas de los ADN flanqueantes del evento y los correspondientes ADN conocidos/de tipo salvaje/genómicos. En el flanco 50 para el presente evento cry1F, se determinó que el resto 2037 de SEQ ID NO: 1 se lista como "G", mientras que el correspondiente resto del locus de 281-24-236 de la secuencia genómica conocida es "A" (R puede emplearse en una secuencia consenso, según las convenciones de la IUPAC-IUB convencionales). En el flanco 3' de este evento, el resto 12.781 de SEQ ID NO:1 se lista en la presente como T, mientras que en la secuencia genómica publicada se proporciona C en la correspondiente localización (Y es el código consenso). La posición 12.811 de SEQ ID NO:1 es C, mientras que se proporciona T para el genoma (Y sería el consenso). La posición 12.866 se lista como C en SEQ ID NO:1, mientras que aparece T en el genoma (Y es el consenso). La posición 12.882 se lista como G en SEQ ID NO:1, mientras que aparece A en el genoma (R es el consenso). La posición 12.918 se lista como A en SEQ ID NO:1, mientras que aparece G en el genoma (R es el consenso). El resto 13.129 se lista como G en SEQ ID NO:1, mientras que aparece A en el genoma (R es el consenso). El resto 13.222 se lista como C en SEQ ID NO:1, mientras que aparece T en la secuencia genómica (Y es el consenso). En la posición 13.441 en SEQ ID NO:1 aparece T, mientras que no existe un resto correspondiente en el listado genómico. Así, esta aparente inserción desplazaría cadena abajo la numeración de SEQ ID NO:1 en consecuencia, comparado con la secuencia genómica. Los expertos en la técnica deberían reconocer y advertir que cualquier ajuste necesario debido a este tipo de errores de secuenciación o discrepancias comunes está dentro del alcance de la presente invención.

También aparecen diferencias similares en el flanco 5' para el presente evento cry1A. En las posiciones 149, 153, 159, 165 y 244 de SEQ ID NO:2 se listan los siguientes restos, respectivamente: C, G, C, C, y C. En la secuencia genómica en el locus de 3006-210-23 aparecen los siguientes restos, respectivamente, en las correspondientes localizaciones: A, A, A, A, y A. Los códigos consenso para estas sustituciones son, respectivamente: M, R, M, M, y M. Pueden realizarse ajustes en consecuencia en las sondas y los cebadores, y las correspondientes diferencias pueden notarse en los amplicones que abarcan o incluyen cualquiera de los restos anteriores.

También debe advertirse que no es raro que una parte de la secuencia genómica se deleccione cuando una secuencia se inserta durante la creación de un evento. Este es el caso para ambos eventos de la presente invención. Es decir, SEQ ID NO:1 proporciona un segmento de 53 bases de ADN genómico del algodón para el evento de 281-24-236 que se deleciona durante la inserción. Este "segmento interior" aparece entre los restos 2074 y 12.749 de SEQ ID NO:1 en el genoma del algodón no transformado. De modo similar, SEQ ID NO:2 proporciona un segmento de 16 bases del ADN genómico del algodón para el evento de 3006-210-23 que se deleciona durante la inserción. Este "segmento interior" aparece entre los restos 527 y 8.901 de SEQ ID NO:2 en el genoma del algodón no transformado.

Tal como se ilustra en las figuras 1 y 2, los componentes de cada uno de los "insertos" son los siguientes. Las moléculas de ADN del elemento genético del transgén contenidas en el presente evento Cry1F de 281-24-236 consisten en el promotor 1 de ubiquitina de maíz, conectado operablemente con fosfinotricina N-acetiltransferasa (PAT) de *Streptomyces viridochromogenes*, conectado operablemente con las secuencias de poliadenilación ORF25 (Baker *et al.*, *Plant Molecular Biology*, 2:335-350, 1983); el promotor quimérico [(4OCS) δ MAS] que contiene un promotor de manopina sintasa parcialmente delecionado con 4 elementos potenciadores del promotor de octopina sintasa, conectado operablemente con el *Cry1F*(synpro) de *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai*, conectado operablemente con las secuencias de poliadenilación ORF25 (Baker *et al.*, *Plant Molecular Biology*, 2:335-350, 1983); y el promotor 1 de ubiquitina de maíz no conectado operablemente con una secuencia *pat* parcial. Las secuencias polinucleotídicas del ADN, o fragmentos de estos componentes, pueden emplearse como cebadores o sondas de ADN en los métodos de la presente invención.

Las moléculas de ADN del elemento genético del transgén contenidas en el presente evento *Cry1Ac* de 3006-210-23 consisten en el promotor (4OCS) δ MAS conectado operablemente con PAT (según se describió anteriormente), conectado operablemente con ORF25; y el promotor 1 de ubiquitina de maíz conectado operablemente con *Cry1Ac* (synpro) de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, conectado operablemente con las secuencias de poliadenilación ORF25. Las secuencias polinucleotídicas del ADN de estos componentes, o sus fragmentos, pueden emplearse como cebadores o sondas de ADN en los métodos de la presente invención.

También se describen composiciones y métodos para detectar la presencia de la región de inserción del transgén/genómica en plantas y semillas y similares, en una planta de algodón diseñada con WIDESTRIKE que comprende el evento *Cry1F* del algodón 281-24-236 y el evento *Cry1Ac* del algodón 3006-210-23. Se proporcionan secuencias de ADN que comprenden al menos una secuencia de unión de la región de inserción del transgén/genómica proporcionada en la presente en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, sus segmentos y complementos de las secuencias ejemplificadas y cualquiera de sus segmentos. La secuencia de unión de la región de inserción abarca la unión entre el ADN heterólogo insertado en el genoma y el ADN de la célula de algodón que flanquea el sitio de inserción. Esta secuencia es diagnóstica para uno o más de los eventos indicados.

Basándose en estas secuencias del inserto y límites, se generaron cebadores específicos de evento. Un análisis de PCR demostró que estas líneas de algodón (*Cry1F* de 281-24-236 y *Cry1Ac* de 3006-210-23) pueden identificarse en diferentes genotipos de algodón mediante el análisis de los amplicones de PCR generados con estos conjuntos de cebadores específicos de evento. Estos y otros procedimientos relacionados pueden emplearse para identificar exclusivamente estas líneas de algodón. Por tanto, los amplicones de PCR derivados de estas parejas de cebadores son exclusivos y pueden emplearse para identificar estas líneas de algodón.

Se describen secuencias de ADN que comprenden al menos una de las nuevas regiones de inserción genómica/del transgén. Se incluyen secuencias de ADN que comprenden una longitud suficiente de polinucleótidos de la secuencia del inserto del transgén y una longitud suficiente de polinucleótidos de la secuencia genómica del algodón procedente de una o más de las tres plantas de algodón mencionadas anteriormente y/o secuencias que son útiles como secuencias de cebadores para la producción de un producto de amplicón diagnóstico para una o más de estas plantas de algodón.

Se describen secuencias de ADN que comprenden al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, o más nucleótidos contiguos de una porción del transgén de una secuencia de ADN seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2, o sus complementos, y una longitud similar de una secuencia de ADN de algodón flanqueante de estas secuencias, o sus complementos. Estas secuencias son útiles como cebadores de ADN en métodos de amplificación del ADN. Los amplicones producidos empleando estos cebadores son diagnósticos para cualquiera de los eventos del algodón indicados en la presente. También se describen los amplicones producidos por estos cebadores de ADN y cebadores homólogos.

A continuación aparece una tabla que resume algunas realizaciones específicas de la presente invención.

Tabla II. Lista de cebadores y sus secuencias empleados en la amplificación por PCR específica de evento

Evento	Secuencia directa (5'-3')	Secuencia inversa (3'-5')	Tamaño del amplicón (pb)	Región diana
281-24-236	tgtcggctgaaggtaggagg (281-14) (SEQ ID NO:3)	cggacatgaagcatttac (281-15) (SEQ ID NO:4)	603 (SEQ ID NO:5)	unión del inserto 5'
	tctctagagagggcagacc (281-9) (SEQ ID NO:6)	cgagctggagagaccggtgac (281-10) (SEQ ID NO:7)	562 (SEQ ID NO:8)	unión del inserto 3'
3006-210-23	ttcaaccttaactattatcctgc (3006-20) (SEQ ID NO:9)	gctgaggacatctacattt (3006-22) (SEQ ID NO:10)	614 (SEQ ID NO:11)	unión del inserto 5'
	gacatgcaatgctcattatctcta (3006-9) (SEQ ID NO:12)	aagtctctgccttaccctgg (3006-12) (SEQ ID NO:13)	662 (SEQ ID NO:14)	unión del inserto 3'

Esta invención también describe métodos para detectar la presencia de ADN en una muestra, que se corresponde con al menos uno de los eventos del algodón indicados en la presente. Estos métodos pueden comprender: (a) poner en contacto la muestra que comprende ADN con un conjunto de cebadores que, cuando se emplea en una reacción de amplificación de ácidos nucleicos con un ADN procedente de al menos uno de estos eventos del algodón, produce un amplicón que es diagnóstico para dicho evento o eventos; (b) realizar una reacción de amplificación de ácidos nucleicos, produciendo con ello el amplicón; y (c) detectar el amplicón.

Otros métodos de detección descritos incluyen un método para detectar la presencia de un ADN en una muestra, que se corresponde con al menos uno de dichos eventos, en el que dicho método comprende: (a) poner en contacto la muestra que comprende ADN con una sonda que se hibrida bajo condiciones de hibridación rigurosas con el ADN procedente de al menos uno de dichos acontecimientos del algodón, y que no se hibrida bajo condiciones de hibridación rigurosas con una planta de algodón control (ADN sin el evento de interés); (b) someter la muestra y la sonda a condiciones de hibridación rigurosas; y (c) detectar la hibridación de la sonda con el ADN.

También se describen métodos para producir una planta de algodón que comprende un evento *cry1F* y/o *cry1Ac* de la presente invención, en el que dicho método comprende las etapas de: (a) cruzar sexualmente una primera línea

de algodón progenitora (que comprende un módulo de expresión de la presente invención, que confiere dicho rasgo de resistencia a insectos a las plantas de dicha línea) y una segunda línea de algodón progenitora (que carece de este rasgo de tolerancia a los insectos), produciendo con ello una pluralidad de plantas de la progenie; y (b) seleccionar una planta de la progenie mediante el uso de marcadores moleculares. Estos métodos pueden comprender opcionalmente otra etapa de retrocruzamiento de la planta de la progenie hasta la segunda línea de algodón progenitora para producir una planta de algodón de cruzamiento verdadero que comprende dicho rasgo de tolerancia a los insectos.

También se describen métodos para determinar la cigosidad de la progenie de un cruzamiento con uno cualquiera (o más) de dichos tres eventos. Dichos métodos pueden comprender poner en contacto una muestra, que comprende ADN de algodón, con un conjunto de cebadores de la presente invención. Dichos cebadores, cuando se emplean en una reacción de amplificación de ácidos nucleicos con el ADN genómico procedente de al menos uno de dichos eventos del algodón, produce un primer amplicón que es diagnóstico para al menos uno de dichos eventos del algodón. Estos métodos comprenden también realizar una reacción de amplificación de ácidos nucleicos, produciendo con ello el primer amplicón; detectar el primer amplicón; y poner en contacto la muestra que comprende ADN de algodón con dicho conjunto de cebadores (dicho conjunto de cebadores, cuando se emplea en una reacción de amplificación de ácidos nucleicos con ADN genómico procedente de plantas de algodón, produce un segundo amplicón que comprende el ADN genómico del algodón nativo homólogo con la región genómica del algodón de una inserción del transgén identificada como uno de dichos eventos del algodón); y realizar una reacción de amplificación de ácidos nucleicos, produciendo con ello el segundo amplicón. Los métodos comprenden también detectar el segundo amplicón, y comparar el primer y el segundo amplicón en una muestra, en la que la presencia de ambos amplicones indica que la muestra es heterocigótica para la inserción del transgén.

Pueden desarrollarse kits de detección de ADN empleando las composiciones descritas en la presente y métodos bien conocidos en la técnica de la detección de ADN. Los kits son útiles para la identificación del ADN del presente evento del algodón en una muestra, y pueden aplicarse a métodos para el cruzamiento de plantas de algodón que contienen este ADN. Los kits contienen secuencias de ADN homólogas o complementarias con los amplicones, por ejemplo, los descritos en la presente, o con secuencias de ADN homólogas o complementarias con el ADN contenido en los elementos genéticos del transgén de los presentes eventos. Estas secuencias de ADN pueden utilizarse en reacciones de amplificación de ADN o como sondas en un método de hibridación de ADN. Los kits también pueden contener los reactivos y los materiales necesarios para realizar el método de detección.

Una "sonda" es una molécula de ácido nucleico aislada a la cual está unido un marcador detectable o una molécula indicadora convencional (tal como un isótopo radiactivo, ligando, agente quimioluminiscente, o enzima). Esta sonda es complementaria con una hebra de un ácido nucleico diana, en el caso de la presente invención con una hebra del ADN genómico procedente de uno de dichos eventos del algodón, tanto de una planta de algodón como de una muestra que incluye ADN del evento. Las sondas incluyen no solo ácidos desoxirribonucleicos o ribonucleicos, sino también poliamidas y otros materiales de sondas que se unen específicamente a una secuencia de ADN diana y que pueden utilizarse para detectar la presencia de esa secuencia de ADN diana.

Los "cebadores" son ácidos nucleicos aislados que se asocian a una hebra del ADN diana complementaria mediante hibridación de ácidos nucleicos para formar un híbrido entre el cebador y la hebra de ADN diana, y después se extienden a lo largo de la hebra del ADN diana por medio de una polimerasa, por ejemplo, una ADN polimerasa. Las parejas de cebadores se remiten a su uso para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico diana, por ejemplo, mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otros métodos de amplificación de ácidos nucleicos convencionales.

Las sondas y los cebadores generalmente tienen una longitud de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476,

477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, o 500 polinucleótidos o más. Estas sondas y cebadores se hibridan específicamente con una secuencia diana bajo condiciones de hibridación de alta rigurosidad. Preferiblemente, las sondas y los cebadores según la presente invención tienen una similitud de secuencia completa con la secuencia diana, aunque pueden diseñarse sondas que se diferencian de la secuencia diana y que conservan la capacidad para hibridarse con las secuencias diana mediante métodos convencionales.

Los métodos para preparar y emplear sondas y cebadores se describen, por ejemplo, en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., vol. 1-3, ed. Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989. Las parejas de PCR-cebador pueden derivarse de una secuencia conocida, por ejemplo, empleando programas informáticos previstos para este fin.

Los cebadores y las sondas basadas en las secuencias del inserto y el ADN flanquente descritas en la presente pueden emplearse para confirmar (y si es necesario, para corregir) las secuencias descritas mediante métodos convencionales, por ejemplo, mediante reclonación y secuenciación de dichas secuencias.

Las sondas y los cebadores de ácidos nucleicos descritos en la presente se hibridan bajo condiciones rigurosas con una secuencia de ADN diana. Puede emplearse cualquier método de amplificación o hibridación de ácidos nucleicos convencional para identificar la presencia de ADN de un evento transgénico en una muestra. Las moléculas de ácidos nucleicos, o sus fragmentos, son capaces de hibridarse específicamente con otras moléculas de ácidos nucleicos bajo ciertas circunstancias. Tal como se emplea en la presente, se dice que dos moléculas de ácidos nucleicos son capaces de hibridarse específicamente entre sí si las dos moléculas son capaces de formar una estructura de ácido nucleico bicatenario antiparalela. Se dice que una molécula de ácido nucleico es el "complemento" de otra molécula de ácido nucleico si muestra una complementariedad completa. Tal como se emplea en la presente, se dice que las moléculas muestran "complementariedad completa" cuando cada nucleótido de una de las moléculas es complementario con un nucleótido de la otra. Se dice que dos moléculas son "mínimamente complementarias" si pueden hibridarse entre sí con una estabilidad suficiente como para que puedan permanecer asociadas entre sí al menos bajo condiciones de "baja rigurosidad" convencionales. De modo similar, se dice que las moléculas son "complementarias" si pueden hibridarse entre sí con una estabilidad suficiente como para que puedan seguir asociadas entre sí bajo condiciones de "alta rigurosidad" convencionales. Las condiciones de rigurosidad convencionales se describen en Sambrook *et al.*, 1989. Por tanto, son lícitas las desviaciones de la complementariedad completa, con la condición de que dichas desviaciones no impidan completamente la capacidad de las moléculas para formar una estructura bicatenaria. Para que una molécula de ácido nucleico actúe como cebador o sonda, solo debe ser suficientemente complementaria en su secuencia para ser capaz de formar una estructura bicatenaria estable con el disolvente y las concentraciones salinas concretos empleados.

Tal como se emplea en la presente, una secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia de un ácido nucleico que se hibridará específicamente con el complemento de la secuencia del ácido nucleico con el cual se está comparando bajo condiciones de alta rigurosidad. La expresión "condiciones rigurosas" se define desde el punto de vista funcional con respecto a la hibridación de una sonda de ácido nucleico con un ácido nucleico diana (es decir, con una secuencia de ácido nucleico concreta de interés) mediante el procedimiento de hibridación específico analizado en Sambrook *et al.*, 1989, en 9.52-9.55. Véase también, Sambrook *et al.*, 1989, en 9.47-9.52 y 9.56-9.58. Por consiguiente, las secuencias de nucleótidos de la invención pueden emplearse por su capacidad para formar selectivamente moléculas dúplex con tramos complementarios de fragmentos de ADN.

Dependiendo de la aplicación prevista, se pueden emplear diversas condiciones de hibridación para lograr diversos grados de selectividad de la sonda hacia la secuencia diana. Para aplicaciones que requieren una alta selectividad, se emplearán generalmente condiciones relativamente rigurosas para formar los híbridos, por ejemplo, se seleccionarán unas condiciones de concentraciones salinas relativamente bajas y/o temperatura relativamente alta, tales como las proporcionadas por NaCl de aproximadamente 0,02 M a aproximadamente 0,15 M a unas temperaturas de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 70 °C. Las condiciones rigurosas implican, por ejemplo, lavar el filtro de hibridación al menos dos veces con tampón de lavado de alta rigurosidad (0,2x SSC, SDS al 0,1%, 65 °C). Las condiciones de rigurosidad apropiadas que favorecen la hibridación del ADN, por ejemplo, 6,0x cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45 °C, seguido de un lavado con 2,0x SSC a 50 °C, son conocidas por los expertos en la técnica, 6.3.1-6.3.6. Por ejemplo, la concentración salina en la etapa de lavado puede seleccionarse desde una baja rigurosidad de aproximadamente 2,0x SSC a 50 °C, hasta una alta rigurosidad de aproximadamente 0,2x SSC a 50 °C. Además, la temperatura en la etapa de lavado puede aumentar desde unas condiciones de baja rigurosidad a la temperatura ambiente, aproximadamente 22 °C, hasta unas condiciones de alta rigurosidad a aproximadamente 65 °C. La temperatura y las sales pueden variar, o la temperatura o la concentración salina puede mantenerse constante mientras que se cambia la otra variable. Estas condiciones selectivas toleran poco o ningún desapeamiento entre la sonda y el molde o hebra diana. La detección de las secuencias de ADN mediante hibridación es muy conocida por los expertos en la técnica, y las indicaciones de las patentes de EEUU n.ºs 4.965.188 y 5.176.995 son ejemplos de los métodos de análisis de hibridación.

En una realización particularmente preferida, un ácido nucleico descrito se hibrida específicamente con uno o más de los cebadores (o amplicones u otras secuencias) ejemplificados o sugeridos en la presente, que incluyen sus complementos y fragmentos, bajo condiciones de alta rigurosidad. En un aspecto de la presente invención, una

molécula de ácido nucleico marcadora de la presente invención tiene la secuencia de ácido nucleico indicada en SEQ ID NO:3-14, o sus complementos y/o fragmentos.

- 5 En otro aspecto, una molécula de ácido nucleico marcadora comparte entre 80% y 100% o 90% y 100% de identidad de secuencia con dichas secuencias de ácidos nucleicos. En otro aspecto, una molécula de ácido nucleico marcadora comparte entre 95% y 100% de identidad de secuencia con dicha secuencia. Estas secuencias pueden utilizarse como marcadores en métodos de cruzamiento de plantas para identificar la progenie de los cruzamientos genéticos. La hibridación de la sonda con la molécula de ADN diana puede detectarse mediante cualquiera de una serie de métodos conocidos por los expertos en la técnica, y estos incluyen, pero no se limitan a marcadores fluorescentes, marcadores radiactivos, marcadores basados en anticuerpos, y marcadores quimioluminiscentes.
- 10 Con respecto a la amplificación de una secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, mediante PCR) empleando una pareja de cebadores de la amplificación concreta, las "condiciones rigurosas" son condiciones que permiten que la pareja de cebadores se hibride solo con la secuencia del ácido nucleico diana con la que un cebador que tenga la correspondiente secuencia de tipo salvaje (o su complemento) se uniría, y preferiblemente se produce un producto de la amplificación exclusivo, el amplicón.
- 15 La expresión "específico para (una secuencia diana)" indica que una sonda o un cebador se hibrida bajo condiciones de hibridación rigurosas solo con la secuencia diana en una muestra que comprende la secuencia diana.

Tal como se emplea en la presente, "ADN amplificado" o "amplicón" se refiere al producto de la amplificación de un 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 algodón resultante de un cruzamiento sexual contiene ADN genómico del evento transgénico procedente de la planta de algodón de la presente invención, el ADN extraído de una muestra de tejido de una planta de algodón puede someterse a un método de amplificación de ácidos nucleicos empleando una pareja 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 son diagnósticas para el evento. El amplicón puede variar en longitud de la longitud combinada de las parejas de cebadores más un par de bases nucleotídicas y/o la longitud combinada de las parejas de cebadores más aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, or 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750, 2000 o más pares de bases nucleotídicas (más o menos cualquiera de los incrementos listados anteriormente). Como alternativa, una pareja de cebadores puede derivarse de la secuencia flanqueante en ambos lados del ADN insertado para producir un amplicón que incluya la secuencia de nucleótidos del inserto completa. Un miembro de una pareja de cebadores derivada de la secuencia genómica de la planta puede localizarse a una distancia de la secuencia de ADN insertada. Esta distancia puede variar desde un par de bases nucleotídicas hasta aproximadamente 20.000 pares de bases nucleotídicas. El uso del término "amplicón" excluye específicamente los dímeros de cebadores que pueden formarse en la reacción de amplificación térmica del ADN.

- 55 La amplificación de ácidos nucleicos puede acompañarse de cualquiera de los diversos métodos de amplificación de ácidos nucleicos conocidos en la técnica, que incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En la técnica se conoce una diversidad de métodos de amplificación y se describen, entre otros, en la patente de EEUU n.º 4.683.195 y la patente de EEUU n.º 4.683.202. Los métodos de amplificación mediante PCR se han desarrollado para amplificar hasta 22 kb de ADN genómico. Estos métodos, así como otros métodos conocidos en la técnica de la amplificación del ADN, pueden utilizarse en la práctica de la presente invención. La secuencia del inserto de ADN del transgén heterólogo o la secuencia genómica flanqueante de un evento del algodón de la presente pueden verificarse (y corregirse si es necesario) amplificando dichas secuencias a partir del evento empleando cebadores

derivados de las secuencias proporcionadas en la presente, seguido por una secuenciación de ADN convencional del amplicón de PCR o del ADN clonado.

El amplicón producido mediante estos métodos puede detectarse mediante una pluralidad de técnicas. La electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio es un método muy conocido y habitual para detectar amplicones de ADN. Otro de estos métodos es el análisis de bits genéticos, en el que se diseña un oligonucleótido de ADN que se solapa con la secuencia de ADN genómico flanqueante adyacente y con la secuencia de ADN insertada. El oligonucleótido se inmoviliza en pocillos de una placa de micropocillos. Después de una PCR de la región de interés (empleando un cebador en la secuencia insertada y otro en la secuencia genómica flanqueante adyacente), un producto de la PCR monocatenario puede hibridarse con el oligonucleótido inmovilizado y actuar como molde para una reacción de extensión de una sola base empleando una ADN polimerasa y ddNTP marcados específicos para la siguiente base esperada. La lectura puede ser fluorescente o estar basada en ELISA. Una señal indica la presencia de la secuencia del inserto/flanqueante debido a una amplificación, hibridación y extensión de una sola base exitosas.

Otro método es la técnica de pirosecuenciación descrita por Winge (Innov. Pharma. Tech., 00:18-24, 2000). En este método se diseña un oligonucleótido que se solapa con la unión entre el ADN genómico adyacente y el ADN insertado. El oligonucleótido se hibrida con un producto de la PCR monocatenario procedente de la región de interés (un cebador en la secuencia insertada y otro en la secuencia genómica flanqueante) y se incuba en presencia de una ADN polimerasa, ATP, sulfúrico, luciferasa, apirasa, adenosina-5'-fosfosulfato y luciferina. Se añaden dNTP individualmente y la incorporación produce una señal luminosa que se mide. Una señal luminosa indica la presencia de la secuencia flanqueante/del inserto del transgén debido a una amplificación, hibridación y extensión de una sola base o de múltiples bases exitosas.

La polarización fluorescente es otro método que puede utilizarse para detectar un amplicón de la presente invención. Según este método, se diseña un oligonucleótido que se solapa con la unión del ADN insertado y flanqueante genómico. El oligonucleótido se hibrida con un producto de la PCR monocatenario procedente de la región de interés (un cebador en el ADN insertado y otro en la secuencia de ADN genómico flanqueante) y se incuba en presencia de una ADN polimerasa y un ddNTP marcado de modo fluorescente. La extensión de una sola base provoca la incorporación del ddNTP. La incorporación puede medirse como un cambio en la polarización empleando un fluorómetro. Un cambio en la polarización indica la presencia de la secuencia flanqueante/del inserto del transgén debido a una amplificación, hibridación y extensión de una sola base exitosas.

TAQMAN (PE Applied Biosystems, Foster City, Calif.) es un método para detectar y cuantificar la presencia de una secuencia de ADN. Brevemente, se diseña una sonda oligonucleotídica FRET que se solapa con la unión del ADN insertado y flanqueante genómico. La sonda FRET y los cebadores de la PCR (un cebador en la secuencia del ADN insertado y otro en la secuencia genómica flanqueante) se ciclan en presencia de una polimerasa termoestable y dNTP. La hibridación de la sonda FRET provoca la ruptura y la liberación del resto fluorescente, alejándolo del resto extintor sobre la sonda FRET. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia flanqueante/del inserto del transgén debido a una amplificación y una hibridación exitosas.

Se han descrito balizas moleculares para su uso en la detección de secuencias. Brevemente, se diseña una sonda oligonucleotídica FRET que se solapa con la unión del ADN insertado y flanqueante genómico. La estructura exclusiva de la sonda FRET hace que contenga una estructura secundaria que mantiene los restos fluorescentes y extintores en proximidad cercana. La sonda FRET y los cebadores de la PCR (un cebador en la secuencia del ADN insertado y otro en la secuencia genómica flanqueante) se ciclan en presencia de una polimerasa termoestable y dNTP. Tras haber realizado con éxito una amplificación con PCR, la hibridación de la sonda FRET con la secuencia diana provoca la eliminación de la estructura secundaria de la sonda y la separación espacial de los restos fluorescente y extintor. Se produce una señal fluorescente. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia flanqueante/del inserto del transgén debido a una amplificación y una hibridación exitosas.

Tras haber descrito dos localizaciones generales en el genoma del algodón que son excelentes para las inserciones, la presente invención también comprende una semilla de algodón y/o una planta de algodón que comprende al menos un inserto no cry1F y no cry1Ac en la vecindad general de una o ambas de estas localizaciones. Una opción es sustituir un inserto diferente en lugar del inserto cry1F y/o cry1Ac ejemplificados en la presente. En estas consideraciones generales, puede emplearse una recombinación homóloga dirigida, por ejemplo, según la presente invención. Este tipo de tecnología es el tema, por ejemplo, del documento WO 03/080809 A2 y la correspondiente solicitud de EEUU publicada (USPA 20030232410).

Los siguientes ejemplos se incluyen para ilustrar procedimientos para practicar la invención y para demostrar ciertas realizaciones preferidas de la invención. Estos ejemplos no deben considerarse limitantes. Los expertos en la técnica apreciarán que las técnicas descritas en los siguientes ejemplos representan estrategias específicas empleadas para ilustrar los modos preferidos para su práctica. A menos que se indique lo contrario, todos los porcentajes son en peso y todas las proporciones de mezcla de los disolventes son en volumen.

Ejemplo 1: Producción de la semilla depositada

La resistencia a insectos de marca WideStrike™ para el algodón es un rasgo transgénico desarrollado por Dow AgroSciences que proporciona una resistencia a insectos en la planta contra lepidópteros. Contiene dos genes de tolerancia a los insectos, *cry1Ac* y *cry1F*, que se derivan de *Bacillus thuringiensis* subespecie *kurstaki* y *Bacillus thuringiensis* subespecie *aizawai*, respectivamente. *Bacillus thuringiensis* (B.t.) es una bacteria del suelo gram-positiva común. En su estadio de formación de esporas produce varios cristales de proteínas insecticidas (conocidas como delta-endotoxinas) que incluyen *Cry1Ac* y *Cry1F*. Estas proteínas son tóxicas para ciertos insectos lepidópteros. En insectos susceptibles, se unen a receptores específicos presentes sobre las células epiteliales del intestino medio, formando poros que alteran el equilibrio osmótico y finalmente provocan la lisis y muerte celular. Se ha demostrado que *Cry1Ac* y *Cry1F* no son tóxicos para seres humanos, ganado o insectos beneficiosos, que no tienen sitios de unión para la delta-endotoxina. Empleando dos delta-endotoxinas, en lugar de una, se proporciona mayor resistencia a insectos, porque las dos proteínas *Cry* proporcionan un mayor espectro de control que cualquiera de ellas por sí sola y presentan actividad diferenciada contra las plagas de lepidópteros contra las que son eficaces. De modo más importante, pueden ayudar a retrasar el desarrollo de insectos resistentes.

Los genes *cry1Ac* y *cry1F* en WideStrike se introducen empleando una transformación mediada por *Agrobacterium* en plantas de algodón GC-510 (*Gossypium hirsutum* L.) en dos eventos de transformación distintos, 3006-210-23 y 281-24-236. Después del cruzamiento en una variedad de algodón elite, estos eventos se combinan mediante cruzamiento convencional para producir un algodón que porta el rasgo de resistencia a los insectos WideStrike. WideStrike también contiene el gen *pat* de *Streptomyces viridochromogenes*, una bacteria del suelo aerobia común. El gen *pat* codifica la enzima fosfotricina acetil transferasa (PAT), que desintoxica el gufosinato amonio en un compuesto inactivo mediante acetilación. El gen *pat* se incluye para permitir la selección de las plantas de algodón transformadas.

Ejemplo 2: Ensayo de diagnóstico para el evento *Cry1F* del algodón 281-24-236

El ADN del evento *Cry1F* de 281-24-236 y del evento *Cry1Ac* de 3006-210-23 y el algodón no transgénico PCS355 se extrajeron de hojas de algodón empleando el kit Plant DNeasy de QIAGEN (n.º de catálogo 69181, Qiagen, Valencia, CA, EEUU). Se siguió el protocolo sugerido por el fabricante. Brevemente, se rompieron discos de hojas en un tampón precalentado suplementado con ARNasa empleando una esfera de carburo de wolframio (diámetro de 0,125 mm) y un molino mezclador Retsch MM3000. La mezcla se centrifugó a temperatura ambiente, y después el sobrenadante se capturó haciéndolo pasar a través de una placa DNeasy 96. El ADN se eluyó en un tampón de elución y se conservó congelado hasta su utilización.

El ADN extraído del tejido de hoja de algodón se empleó en una amplificación de ADN mediante PCR de las secuencias del inserto del transgén/genómica 5' en el evento *Cry1F* de 281-24-236 empleando el cebador 281-14 (SEQ ID NO:3, 5'TGTCGGCTGAAGGTAGGGAGG3') y el cebador 281-15 (SEQ ID NO:4, 5'CCGGACATGAAGCCATTTAC3'), y las secuencias del inserto del transgén/genómicas 3' flanqueantes empleando el cebador 281-9 (SEQ ID NO:6, 5'TCTCTAGAGAGGGGCACGACC3') y el cebador 281-10 (SEQ ID NO:7, 5'CGAGCTGGAGAGACCGGTGAC3'). Se realizaron análisis de amplificación del ADN de la PCR empleando ADN genómico extraído del evento *Cry1F* del algodón 281-24-236 y la línea de algodón no transgénica PCS355. La reacción de amplificación para la secuencia genómica flanqueante 5' se realizó empleando el kit de PCR QIAGEN HotStarTaq (n.º de catálogo 203203 o 203205, QIAGEN, Valencia, Calif., EEUU) con una concentración final de 0,4 µM para el cebador 281-14 y el cebador 281-15 en un volumen de reacción de 50 µl. Las reacciones se realizaron empleando un GenAmp PCR System 9600 (Applied Biosystem, Foster City, CA) bajo las siguientes condiciones de ciclación: 1 ciclo a 95 °C durante 15 minutos; 35 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 57 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 60 segundos; 1 ciclo a 72 °C durante 10 minutos. La PCR para la secuencia genómica flanqueante 3' se realizó empleando el kit de PCR Takara ExTaq (n.º de catálogo RR001A, Panvera, Madison, WI) en un volumen de reacción de 50 µl que contiene una concentración final de 0,4 µM del cebador 281-9 y el cebador 281-10. Las reacciones se realizaron empleando un GenAmp PCR System 9600 (Applied Biosystem, Foster City, CA) bajo las siguientes condiciones de ciclación: 1 ciclo a 95 °C durante 5 minutos; 35 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 60 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 60 segundos; 1 ciclo a 72 °C durante 10 minutos. Los productos de la PCR se separaron utilizando una electroforesis en gel de agarosa al 1,0% a 100 V durante aproximadamente 1 hora y se visualizaron con tinción con bromuro de etidio.

Se determinó la secuencia de ADN producto de la PCR 5' y resultó una secuencia de 603 pares de bases nucleotídicas que representa la secuencia del inserto del transgén/genómica 5' del evento *Cry1F* del algodón 281-24-236, y se identificó como SEQ ID NO:5. Se determinó la secuencia de ADN producto de la PCR 3' y resultó una secuencia de 562 pares de bases nucleotídicas que representa la secuencia del inserto del transgén/genómica 3' del evento *Cry1F* del algodón 281-24-236, y se identificó como SEQ ID NO:8.

Las secuencias de unión del transgén/genómica, SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:8, son nuevas secuencias de ADN en el evento *Cry1F* de 281-24-236 que son diagnósticas para el evento *Cry1F* de la planta de algodón 281-24-236 y su progenie.

Ejemplo 3: Ensayo de diagnóstico para el evento *Cry1Ac* del algodón 3006-210-23

El ADN extraído del tejido de hoja de algodón se empleó en una amplificación de ADN mediante PCR de las secuencias del inserto del transgén/genómica 5' en el evento *Cry1Ac* de 3006-210-23 empleando el cebador 3006-20 (SEQ ID NO:9, 5'TTCCAACCTTTAACTATTATCCTGC3') y el cebador 3006-22 (SEQ ID NO:10, 5'GCTGCGGACATCTACATTT3'), y las secuencias del inserto del transgén/genómicas 3' flanqueantes empleando el cebador 3006-9 (SEQ ID NO:12, 5'GACATGCAATGCTCATTATCTCTA3') y el cebador 3006-12 (SEQ ID NO:13, 5'AAGTCTCTGCCTTCTACCCTGG3'). Se realizaron análisis de amplificación del ADN de la PCR empleando ADN genómico extraído del evento *Cry1Ac* del algodón 3006-210-23 y la línea de algodón no transgénico PCS355. La reacción de amplificación para la secuencia genómica flanqueante 5' se realizó empleando el kit de PCR QIAGEN HotStarTaq (n.º de catálogo 203203 o 203205, QIAGEN, Valencia, Calif., EEUU) con una concentración final de 0,4 µM para el cebador 3006-20 y el cebador 3006-22 en un volumen de reacción de 50 µl. Las reacciones se realizaron empleando un GenAmp PCR System 9600 (Applied Biosystem, Foster City, CA) bajo las siguientes condiciones de ciclación: 1 ciclo a 95 °C durante 15 minutos; 35 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 53 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 60 segundos; 1 ciclo a 72 °C durante 10 minutos. La PCR para la secuencia genómica flanqueante 3' se realizó empleando el kit de PCR QIAGEN HotStarTaq (n.º de catálogo 203203 o 203205, QIAGEN, Valencia, Calif., EEUU) en un volumen de reacción de 50 µl que contiene una concentración final de 0,4 µM del cebador 3006-9 y el cebador 3006-12. Las reacciones se realizaron empleando un GenAmp PCR System 9600 (Applied Biosystem, Foster City, CA) bajo las siguientes condiciones de ciclación: 1 ciclo a 95 °C durante 5 minutos; 30 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 56 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 60 segundos; 1 ciclo a 72 °C durante 10 minutos. Los productos de la PCR se separaron utilizando una electroforesis en gel de agarosa al 1,0% a 100 V durante aproximadamente 1 hora y se visualizaron con tinción con bromuro de etidio.

Se determinó la secuencia de ADN producto de la PCR 5' y resultó una secuencia de 614 pares de bases nucleotídicas que representa la secuencia del inserto del transgén/genómica 5' del evento *Cry1Ac* del algodón 3006-210-23 (identificada en la presente como SEQ ID NO:11). Se determinó la secuencia de ADN producto de la PCR 3' y resultó una secuencia de 662 pares de bases nucleotídicas que representa la secuencia del inserto del transgén/genómica 3' del evento *Cry1Ac* del algodón 3006-210-23 (identificada en la presente como SEQ ID NO:14).

Las secuencias de unión del transgén/genómica, SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:14, son nuevas secuencias de ADN en el evento *Cry1Ac* de 3006-210-23 que son diagnósticas para el evento *Cry1Ac* de la planta de algodón 3006-210-23 y su progenie.

Ejemplo 4: Otros ensayos de diagnóstico

Se emplean parejas de cebadores para un evento de ADN para producir un amplicón diagnóstico para el evento *Cry1F* de 281-24-236 y el evento *Cry1Ac* de 3006-210-23. Estas parejas de cebadores para un evento incluyen, pero no se limitan a SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12 y SEQ ID NO:13. Cuando se emplean en un método de amplificación del ADN (PCR), estos cebadores producen un amplicón diagnóstico para el evento *Cry1F* de 281-24-236 y el evento *Cry1Ac* de 3006-210-23, y sus progenies. Además de estas parejas de cebadores, otros aspectos de la presente invención incluyen cualquier pareja de cebadores derivada del producto de amplicón de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11 y/o SEQ ID NO:14, que, en una reacción de amplificación de ADN, producen un amplicón diagnóstico para el evento *Cry1F* de 281-24-236, el evento *Cry1Ac* de 3006-210-23 y sus progenies. Cualquier modificación que implique el uso de cebadores de ADN para producir un amplicón diagnóstico para el evento *Cry1F* de 281-24-236, el evento *Cry1Ac* de 3006-210-23 y sus progenies está dentro del técnica normal, dadas las ventajas de la presente invención. El análisis de una muestra de tejido vegetal procedente del evento *Cry1F* de 281-24-236, el evento *Cry1Ac* de 3006-210-23 y sus progenies debería incluir un control de tejido positivo procedente de estos eventos, un control negativo procedente de una planta de algodón que no presente ninguno de estos eventos, y un control negativo que no contenga el molde de ADN de algodón. Los expertos en la técnica de los métodos de amplificación del ADN pueden obtener otras secuencias de cebadores de SEQ ID NO:1 y/o SEQ ID NO:2. Las condiciones optimizadas para la producción de un amplicón pueden diferir de los métodos descritos en los anteriores ejemplos. El uso de estas secuencias de cebadores de ADN con modificaciones en los métodos descritos en estos ejemplos está dentro del alcance de la invención. Los amplicones y cebadores derivados de SEQ ID NO:1 y/o SEQ ID NO:2 que son diagnósticos para el evento *Cry1F* de 281-24-236 y/o el evento *Cry1Ac* de 3006-210-23, y sus progenies, son aspectos de la invención. El ensayo para amplicones del evento *Cry1F* de 281-24-236, del evento *Cry1Ac* de 3006-210-23 y de sus progenies puede realizarse empleando un Stratagene Robocycler, MJ, Engine, o un termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient, o mediante métodos y aparatos conocidos por los expertos en la técnica.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Dow AgroSciences LLC

5 <120> Líneas de algodón transgénico *Cry1F* y *Cry1Ac* y su identificación específica de evento

<130> 502-7 T1

<140> 04 809 955.0

10 <141> 2004-10-13

<150> US 60/556,586

<151> 2004-03-26

15 <150> US 60/613,851

<151> 2004-09-27

<160> 16

20 <170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 15490

<212> DNA

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Evento *Cry1F* inserto 281-24-236 y sus secuencias de borde

30 <400> 1

```

aagcttgctt aaaagtatca caagccatga tccttataaa aatgatatct gacactatgc      60
ttctttgcac attcttcact atgctttctc atttgagcaa tgggtgggatt tgctctcaaa    120
tttggtggcc ctatgtcagt attcaaaaat tttcataggt caaaggcttg aagataagcc    180
ttcattttta ccaccatata gtagtaaatt tcaccgatga atacaagagg tggaggtggt    240
gagaaactag atgaatacat tcttgcagaa aacgtccctc aaagatcaaa atggctctca    300
ataccaattc ttggtgtttt cagactaaga gagaaagcaa aacgagacaa tgaaccaca    360
agatgaatta attcaatac atttttttaa atttcatttc aaacggttac aatataatc    420
ttttgtttc caaacaactc aactgatcca actaacatct tggaaatagg aaaacttaac    480
ttgtacacaa actgattgtg aaatcaacac ctaaacacat caagtcatta ccaacttagt    540
ttattcctag ctaagtatct taacataagg attgaacaaa aggttaaacc aaaactttga    600
tttttttgct ctaggaagac agcttgcact tcatcataca gttcgcctta ttgttaatca    660
actcacactt tggctgtccg ttgatatgct ggcagttaaa atgttcacca atgtgcttag    720
acaatccgcc aagcctatcg tgtaaaaact ctttgcatac cagttcacct attgacagtc    780
cgccagtctt ttaatgctca gactgtctac catgtgactt agagacggaa ttgtttgcca    840
tatgtgttcg ccaactagat tgttcaccat ttgtgttgtt taccatgtgt gttcgttaat    900
gcatggttgg ccatgtcgca aaacaaatth ttggatgggc caaaattgga attttttcat    960
ttgaccaaataaaaaaac gaattgaaca aattactttt agagggatta aaaattaaaa   1020
ttatactatt tatcgagggg agtcaaggct cctatcttct tcgcttcttc tattgtttag   1080
    
```


ES 2 531 980 T3

attaagacta aaattttaaa atttatagaa attaaaattg atgaaattaa aatacaaaat 1140
 taaatatata attcagttag gtttaacat tttttaatgt tgcttagctt taatgtttgg 1200
 gatttggtta ctttcagtcg ttatgcagtt atgctcagac aaatttgttc tctttctgtc 1260
 ttatcaacta ctcaaaatct cagtatagtt atgtcattta atctcttcat cgtagatgtt 1320
 atattggtga aaatggggcc aagaaatcca cattcaatga ctttgaaaga atatatattg 1380
 ttagttgcac attcccttat tcaatcacag ttgcttgttt ctgagtctat agaatcatga 1440
 tatttgtaaa tcttatataa agtaagagta tatggctaga cagtctggcc ctgctggctg 1500
 aaggtaggga ggaattaatc aatcacagtt gcttgtttct gagtctatag aatcatgaat 1560
 tttaaattta tggaatgcat tttttcgaag atattgtatg cattaagtgt aattttagtt 1620
 tcaatatgaa atttgagatt tatatatata cttacataaa accctccttt actgaattag 1680
 tgccatggat aaaagaccaa ttaagcaatc cttccaacac gtgcatgcac tggattttca 1740
 tcgcctcgtc cattgttaaa ttgataggtt aataagaaca attagttggc tactgattat 1800
 atggattctg ggttaaaagt atttaggttt actgttacct acatggagga tctacctta 1860
 ttttcacttt tgtttaatta atttaagtta gttttgatga gtttaaggat tgtactagcc 1920
 aatagtagta cataaaggag atagagtacc aaaacaaaga aaaagccgaa aggtgttaat 1980
 gctaaattgt aaaagaaagt taaaataaga gactcgaatt ataatatgat tctctggcgc 2040
 actaattaag ctactatata ttgtcaatag tattgtaaat ggcttcatgt ccgggaaatc 2100
 tacatggatc agcaatgagt atgatggtca atatggagaa aaagaaagag taattaccaa 2160
 ttttttttca attcaaaaat gtagatgtcc gcagcgttat tataaaatga aagtacattt 2220
 tgataaaacg acaaattacg atccgctcga tttataggcg aaagcaataa acaaattatt 2280
 ctaattcggga aatctttatt tcgacgtgtc tacattcacg tccaaatggg ggccacttgg 2340
 ctgacgtgca gcgtgacccg gtcgtgcccc tctctagaga taatgagcat tgcattgtca 2400
 agttataaaa aattaccaca tatttttttt gtcacacttg tttgaagtgc agtttatcta 2460
 tctttataca tatatttaaa ctttactcta cgaataatat aatctatagt actacaataa 2520
 tatcagtgtt ttagagaatc atataaatga acagttagac atgggtctaaa ggacaattga 2580
 gtattttgac aacaggactc tacagtttta tctttttagt gtgcatgtgt tctccttttt 2640
 tttgcaaata gcttcaccta tataataact catccatttt attagtacat ccatttaggg 2700
 tttagggtta atgggtttta tagactaatt ttttttagtac atctatttta ttctatttta 2760
 gcctctaaat taagaaaact aaaactctat tttagttttt ttatttaata atttagatat 2820
 aaaatagaat aaaataaagt gactaaaaat taaacaaata ccctttaaga aattaaaaaa 2880
 actaaggaaa catttttctt gtttcgagta gataatgcca gcctgttaaa cgccgtcgac 2940
 gagtctaacg gacaccaacc agcgaaccag cagcgtcgcg tcgggccaag cgaagcagac 3000
 ggcacggcat ctctgtcgtc gcctctggac ccctctcgag agttccgctc caccgttggg 3060
 cttgctccgc tgtcggcatc cagaaattgc gtggcggagc ggcagacgtg agccggcacg 3120

ES 2 531 980 T3

gcaggcggcc tcctcctcct ctcacggcac cggcagctac gggggattcc tttcccaccg 3180
ctccttcgct ttcccttcct cgcccgcgct aataaataga caccctcc acaccctctt 3240
tccccaacct cgtgttggtc ggagcgcaca cacacacaac cagatctccc ccaaatccac 3300
ccgtcggcac ctccgcttca aggtacgccg ctctcctcc cccccccc cctctctacc 3360
ttctctagat cggcgttccg gtccatggtt agggcccggg agttctactt ctgttcatgt 3420
ttgtgttaga tccgtgtttg tgttagatcc gtgctgctag cgttcgtaca cggatgacgac 3480
ctgtacgtca gacacgttct gattgctaac ttgccagtgt ttctctttgg ggaatcctgg 3540
gatggctcta gccgttccgc agacgggacg gatttcatga tttttttgt ttcgttgcac 3600
agggtttggg ttgccctttt cttttatttc aatatatgcc gtgcaactgt ttgtcgggtc 3660
atcttttcat gctttttttt gtcttggttg tgatgatgtg gtctggttgg gcggtcgttc 3720
tagatcggag tagaattctg tttcaacta cctgggtgat ttattaattt tggatctgta 3780
tgtgtgtgcc atacatattc atagttacga attgaagatg atggatggaa atacgatct 3840
aggataggta tacatgttga tgcgggtttt actgatgcat atacagagat gctttttggt 3900
cgcttggttg tgatgatgtg gtgtggttgg gcggtcgttc attcgttcta gatcggagta 3960
gaatactgtt tcaactacc tgggtgtattt attaattttg gaactgtatg tgtgtgcat 4020
acatcttcat agttacgagt ttaagatgga tggaaatc gatctaggat aggtatacat 4080
gttgatgtgg gttttactga tgcataata tgatggcata tgcagcatct attcatatgc 4140
tctaacttg agtacctatc tattataata aacaagtatg tttataaatt attttgatct 4200
tgatatactt ggatgatggc atatgcagca gctatatgtg gattttttta gccctgcctt 4260
catacgtat ttatttgctt ggtactgttt cttttgtcga tgctaccct gttgtttggt 4320
gttacttctg caggctcaca tgtctccgga gaggagacca gttgagatta ggccagctac 4380
agcagctgat atggccgagg tttgtgatat cgtaacat tacattgaga cgtctacagt 4440
gaactttagg acagagccac aaacaccaca agagtggatt gatgatctag agaggttgca 4500
agatagatac ccttggttgg ttgctgaggt tgaggggtgt gtggctggtg ttgcttacgc 4560
tgggccctgg aaggctagga acgcttacga ttggacagtt gagagtactg tttacgtgtc 4620
acataggcat caaagggttg gcctaggatc cacattgtac acacatttgc ttaagtctat 4680
ggaggcgcaa ggttttaagt ctgtggttgc ttttataggc cttccaaacg atccatctgt 4740
taggttgcac gaggctttgg gatacacagc ccgggttaca ttgcgcgag ctggatacaa 4800
gcatggtgga tggcatgatg ttggtttttg gcaaaggat tttgagttgc cagctcctcc 4860
aaggccagtt aggccagtta cccagatctg agtcgacgga tccccgacat atgccccggt 4920
ttcgttgca ctaacatgag ttcttgaca aatttgattg gacctgatga gatgatccaa 4980
cccaggata tagcaaagct cgttcgtgca gcaatggaac ggccaaaccg tgcttttgtc 5040
ccaagaatg aggtgctatg catgaaggaa tctacccgtt gatgtccaac agtctcaggg 5100
ttaatgtcta tgotatctaa ataatgttgt cggatatttg taatctcata tagattttca 5160

ES 2 531 980 T3

ctgtgcgacg caaaaatatt aaataaatat tattattatc tacgttttga ttgagatac 5220
 atcaatatta taataaaaat atccattaa cacgatttga tacaatgac agtcaataat 5280
 ctgatttgaa tatttattaa ttgtaacgaa ttacataaag atcgaataga aaatactgca 5340
 ctgcaaatga aaattaacac atactaataa atgctgcaaa tatctttgcc aagatcaagc 5400
 ggagtgaggg cctcatatcc ggtctcagtt acaagcacgg tatccccgaa gcgctcca 5460
 ccaatgccct cgacatagat gccgggctcg acgctgagga cattgcctac cttgagcatg 5520
 gtctcagcgc cggctttaag ctcaatccca tccaatctg aatatcctat cccgccccca 5580
 gtccggtgta agaacgggtc tgtccatcca cctctgttgg gaattctgat cttggcggtgta 5640
 cccggggatc ctcatctc catcagaagt aactccacgc tatcaacaat gaatgttct 5700
 tccgtttctc caatctcaat ccaaaccctg tcggtttctg gaaagtactc taactctttg 5760
 gtgacatagc cggctggtaa cgggtgtgtag tccccatagc ctctgttaga ttcgcaagga 5820
 ttgtccctac gtccatcggg gtaagccttc tcctcatagg ctgatgcata gtcagcgggt 5880
 acagaagagt tgctctcata ggctccatcg taccctcgat tgcgagaagt gtaagtacc 5940
 tcatactcct cttgagtcgc agtgtagtca ttgcaagtta cgggtgtgtt tgggtagact 6000
 tcctcctcga cgcagttgct gaacttcagc tcgtcgggtg tgttctcaat ctctgtgatg 6060
 gtgacgcaac cttctccgta tccttctttg tacgcggtaa cacgaagaat gtagccacga 6120
 ccaggacaga cacgaacttc ttgtgaaact tctgcttccc actcaggaac aacaaggaca 6180
 gagcgggtgat tgttctgttc ttctacatct acgtgccctt tcacattcca gcaggatagg 6240
 ccattgttga agtcaccatt cttgatgaca tcctcgcgat catacaagga gaatgcagtg 6300
 aagatgcgcc cttctaactc ttcaaagata gcagcattga caccgggaat cacgctaagt 6360
 tcaggaaggt aagcttcccg aatgctatga acgctttgt ctgcagcatg aatcatagct 6420
 atgttggtat cagcttgag cctatcatac tgagagttca caaacagagc gtcaacgctt 6480
 tctttggctt cttgtacac aatgtttgtt tccattcca acttctctct cttgtccctc 6540
 cacttcttct cagccctctt cactctagcg agggcttctc caacaagtgg tttcttctt 6600
 agaaactcca gattgcctag cctggcatgg ccatcttgag tcttgatctt gaagatcacc 6660
 cacacaccga ggtcttcggt caggctcggta cagccaacgt ctatgtccaa ggagaagtgg 6720
 tgtgagtgat gggcacactt gccgatggga cttggggctg aaagtggcca gagtgaacc 6780
 gtcccaggca cattgactgt ctcatgtttg gcgttgatc tgatgaggta gatctcaagg 6840
 tcttgactgt cctcgatgta acctctcaac tggatcttg tgtaggctt gagtttcgat 6900
 tcatctatct tctgtacag gtatgttgg tagcactcat caaaggtag caagagcgtg 6960
 acatagtctt cctgaacac atcatcacct ccttgaatgg tgatgtccgt acttcccctc 7020
 catccacgat ctagtgcct gttgatcccg cgaaagtgg gatcttgaag caagtccgc 7080
 tcatcactaa gtcgcttagc atgtttgacc ttctcggaca actccttctt ctcatcaaaa 7140
 cagaactcat cagagaggca ctcaacaagg ttggaaacgc gatcgatgtg atagtcagtc 7200

ES 2 531 980 T3

acatctgtct tgagcccaat ctgattggac gaagtgaaca gagcattcac cgccttctgt 7260
 gctctttcca agtcagactc tgcctcgagt gtggcagtaa ctggaatcaa ctcaaacctg 7320
 tcaatgtaca cttcgttgcc tgaactgaag gtatcagcac ctactgtgaa actgctctgg 7380
 ctcatggaa aggtgaacgc ggtgttgata gtggcgtagg agaaagattg gaatgtaagt 7440
 ggatcaccgg tatccattgt cttgttgaac tgaccagcaa agatccgttc acctgcaacc 7500
 gtaacgtaga ttcttagatt ggtagtagag gcatagcgta tcctggcacg atacctttgg 7560
 ggaagttgcc cattgatgtt gacaatggtg tacgcgaatg gtcctccact agtgcgtcga 7620
 agaatgtctc ctcccgtgaa ccccgccct cttacaactg tagttcctga ctgaagtgtg 7680
 tgtgccttca ccaagggaa ctgagtgatt ctctctggat caatggtgtt tgtgggggta 7740
 gcgctacgat gcgtccaaga gaacattggt gctctccatg agtcggaacc tgagatctca 7800
 cctggccagc gcacaaaggt aacatgattc agcacatggg agtagtcatt ccaaggtgcg 7860
 ccgctgtgtt cttgaggtgg tatctcatct agagagtcaa tggccccgga gttcctgaat 7920
 gtgctgggtg gattcgtacc agtttgttga aaggccactc ccctaagacc gagtacatag 7980
 tgaggattgc caaagcctcc tcggacgaag acaggatctg acaaggtccg atagaaagga 8040
 cgtggatctt catctgcaat ccagatggcg cccccgggat tgaagacccc gtaactagga 8100
 aagttgatac gattgccagc cgtgttgctg gagctaacta agtgcctcc ccacacagt 8160
 tgggatctaa cagtctctgc agtcacaaac aaagagttca tgaagtccat gagatgggg 8220
 ggtctgactc caaactcagc cctgttgaaa ccattgggta tgttcgcaga aactggagag 8280
 tcttcaatga ctgaactggt gtagatctcc cttgtaagtt gggatgacgt ttgaatcgga 8340
 taggtacgaa catcgtagtt cggaaagaga gcaactatgt ctaacacagt aagtgtaagg 8400
 tctctcctga actgattgaa cctggcccat tggcgagtgt tagtacctct caggttctcc 8460
 aatccctgat tgtaggtatc caaacaatgt ttcgtgtatc gatgaatcag attgatgagt 8520
 ctgtttagt gattgttgac agtagctatg tccagtcccc aaccttggcc aaacgacaca 8580
 gcgtcgcgca gtagtgacaa gtgcaggta gcagcttga catagaccga gagaagaggg 8640
 atctcgaagc tggtaaaggt gaagttgttg atggctgtga tcaaagcatc atctgtgtta 8700
 gcaaagcgta tacgcacatc ttctctcagt tgggcattgt taggattggc ttccactct 8760
 cttagtgtt caatgtagat ctcatagctg tctgctaagc cacgaagggt agtgateggc 8820
 cgattccttt ccaaggtctc aatcctttgt tcaatcaact gttcaatctg gagaagaaag 8880
 aggtccaat cagatggagt gatgaagccc cagatgaggt cgaagaggcc aaacgcaact 8940
 cccacacctg gaacaaactc agacaacagg agacgtgtaa gggacagga gatgtctaac 9000
 ggcaatctgc cagtcgacct ctcttcgttg agaatctcta cttcaggatt gttgaggcag 9060
 ttgtagggga cgactgatt ctgtatgttg ttctccattg ttggatccgc gatttgggtg 9120
 atcgagattg gttatgaaat tcagatgcta gtgtaatgta ttggtaattt gggagatat 9180
 aataggaagc aaggctatct atccatttct gaaaaggcga aatggcgtca ccgcgagcgt 9240

ES 2 531 980 T3

cacgctctag tcgaccatgt acgtaagcgc ttacgttttt ggtggacccc ctcgaccatg 9300
tacgtaagcg cttacgtttt tgggtggaccc cctcgaccat gtacgtaagc gcttacgttt 9360
ttggtggacc ccctcgacca tgtacgtaag cgcttacggt tttggtggac cccctcgacg 9420
gatccccct cgaccctaga cgtatctatt caaaagtcgt taatggctgc ggatcaagaa 9480
aaagtggaa tagaaacaga ataccgcga aattcaggcc cggttgccat gtcctacacg 9540
ccgaaataaa cgaccaaatt agtagaaaaa taaaaactga ctcggatact tacgtcacgt 9600
cttgcgcact gatttgaaaa atctcaatat aaacaaagac ggccacaaga aaaaaccaa 9660
acaccgatat tcattaatct tatctagttt ctcaaaaaaa ttcatatctt ccacaccctc 9720
gagatctaga tatcgatgaa ttttggcgcg ccttaattaa ggaattcctc gagtttaaac 9780
ggatccctga aagcgacggt ggatgttaac atctgcaaat tgccttttct tatcgaccat 9840
gtacgtaagc gcttacgttt ttggtggacc cttgagggaa ctggttagctg ttgtgggcct 9900
gtggtctcaa gatggatcat taatttccac cttcacctac gatggggggc atcgaccgg 9960
tgagtaatat tgtacggcta agagcgaatt tggcctgtag acctcaattg cgagctttct 10020
aatttcaaac tattcgagct ttctaattga atatatccag ggcccagcgt aagcaatacc 10080
agccacaaca ccctcaacct cagcaaccaa ccaagggtat ctatcttgca acctctctag 10140
atcatcaatc cactcttggt gtgtttgtgg ctctgtccta aagttcactg tagacgtctc 10200
aatgtaatgg ttaacgatat cacaaaccgc ggccatatca gctgctgtag ctggccta 10260
ctcaactggt ctctctccg gagacatgtc gacctgcaga agtaacacca aacaacaggg 10320
tgagcatcga caaaagaaac agtaccaagc aaataaatag cgtatgaagg cagggctaaa 10380
aaaatccaca tatagctgct gcatatgcc tcatccaagt atatcaagat caaataatt 10440
ataaaacata cttgtttatt ataatagata ggtactcaag gttagagcat atgaatagat 10500
gctgcatatg ccattcatgta tatgcatcag taaaaccac atcaacatgt atacctatcc 10560
tagatcgata tttccatcca tcttaaactc gtaactatga agatgtatga cacacacata 10620
cagttccaaa attaataaat acaccaggta gtttgaaca gtattctact ccgatctaga 10680
acgaatgaac gaccgcccaa ccacaccaca tcatcacaac caagcgaaca aaaagcatct 10740
ctgtatatgc atcagtaaaa cccgcatcaa catgtatacc taccctagat cgatatttcc 10800
atccatcatc ttcaattcgt aactatgaat atgtatggca cacacataca gatccaaaat 10860
taataaatcc accaggtagt ttgaaacaga attctactcc gatctagaac gaccgcccaa 10920
ccagaccaca tcatcacaac caagacaaaa aaaagcatga aaagatgacc cgacaaacaa 10980
gtgcacggca tatattgaaa taaaggaaaa gggcaacca aaccctatgc aacgaaacaa 11040
aaaaaatcat gaaatcgatc ccgtctgcgg aacggctaga gccatcccag gattcccaa 11100
agagaaacac tggcaagtta gcaatcagaa cgtgtctgac gtacaggtcg catccgtgta 11160
cgaacgctag cagcacggat ctaacacaaa cacggatcta acacaaacat gaacagaagt 11220
agaactaccg ggccctaacc atggaccgga acgccgatct agagaaggta gagagggggg 11280

ES 2 531 980 T3

gggggggggg aggacgagcg gctgtacctt gaagcggagg tgccgacggg tggatttggg 11340
 ggagatctgg ttgtgtgtgt gtgcgctccg aacaacacga ggttggggaa agaggggtgtg 11400
 gagggggtgt ctatttatta cggcgggcga ggaagggaaa gcgaaggagc ggtgggaaag 11460
 gaatccccg tagctgccgg tgccgtgaga ggaggaggag gccgcctgcc gtgccggctc 11520
 acgtctgccg ctccgccacg caatttctgg atgccgacag cggagcaagt ccaacgggtg 11580
 agcggaaactc tcgagagggg tccagaggca gcgacagaga tgccgtgccg tctgcttcgc 11640
 ttggcccagc gcgacgctgc tggttcgctg gttggtgtcc gttagactcg tcgacggcgt 11700
 ttaacaggct ggcattatct actcgaaaca agaaaaatgt ttccttagtt tttttaattt 11760
 cttaaagggt atttgcttaa ttttagtca ctttatttta ttctatttta tatctaaatt 11820
 attaaataaa aaaactaaaa tagagtttta gttttcttaa tttagaggct aaaatagaat 11880
 aaaatagatg tactaaaaaa attagtctat aaaaaccatt aaccctaac cctaaatgga 11940
 tgtactaata aaatggatga agtattatat aggtgaagct atttgcaaaa aaaaaggaga 12000
 acacatgcac actaaaaaga taaaactgta gagtcctggt gtcaaaatac tcaattgtcc 12060
 tttagaccat gtctaactgt tcatttatat gatttcttaa aacactgata ttattgtagt 12120
 actatagatt atattattcg tagagtaaag ttaaatata tgtataaaga tagataaact 12180
 gcacttcaaa caagtgtgac aaaaaaata tgtggtaatt tttataact tagagatgca 12240
 atgctcatta tctctagaga ggggcacgac cgggtcacgc tgcactgcag ccaagtggcc 12300
 cccatttggg cgtgaatgta gacacgctga aataaagatt tccgaattag aataatttgc 12360
 ttattgcttt cgcctataaa tacgacggat cgtaatttgt cgctttatca gaatgtactt 12420
 tcattttata ataacgctgc ggacatctac atttttgaat tgaaaaaaaa ttgtaatta 12480
 ctctttcttt ttctccatat tgaccatcat actcattgct gatccatgta gatttccctt 12540
 acttgtctcc ctctaactctg actttattaa cccaaagcaa ttgcttattt gttccccacg 12600
 cccacaaagc ccagcattgt ccctaaggta ttaatttgtt gttcgattct tgttcttgaa 12660
 cccatttggg gaatgcaaca agggttttca tgtcagcacg gtaatggtc tgtgtaaatt 12720
 ccagtagtgc tgcccaagta aagtctgggt atttcctcga atttgcggca ttaactaagc 12780
 tagctgctgg tgtcaccggt ctctccagct cgggacatag aaagaatgca agtgattttc 12840
 tcaccgtttc agtattcact actgcccaag cagctcttgt agataccgtt tgtcaaagcc 12900
 tgtattcaaa caccacaacc tcattttcgt taaaattttt tgtatatacg tatgcatata 12960
 tgttcagaat gtttattacc atgaatgtat cgcaatgttg acaacgaaag ctctgggat 13020
 atgagcaacg gagtgccact tttcatcggc aaacacttga aggcctcaa cttgatcctg 13080
 atgaaggatt gtcaaggaag tgggatcggg gtggggaccg gttcccaggg tcaactcagg 13140
 cttttcgcag ggagagtagt gattcagtct caggattgaa tcattttggt cgaaaaagtc 13200
 tttgaagtag gcttgggtcaa gccctagact tatccctagc agccccatta tctctttgga 13260
 aacctgttc ctggcttcac aatattcctg gtaaagcctc ctgtcaagta cgaaaagcaa 13320

ES 2 531 980 T3

aatcgagtgt tagattccta tcctatggta aaacttgtcg caacattcta caaattaaca 13380
taggttataa aagagaaacg caaagtcaaa aaaggccatc cagttataat gtgtattttt 13440
tgtttttagga gaaggggtat ttaagcaatc catgttgaat ggacttaggg ttcggtcaat 13500
gcaaggaatg atgtctattg aatttgtcac cccatctctt tcaaacctaa aaaagatgta 13560
tatccaattg tcaactattg tacaaggcct gaaatacaca tgggggttaac aaatacgctg 13620
aaactgcaac atgtattttt tgcatttttg agactaaatc ttgacgtaaa aataagctga 13680
tcatctcgta tattgactga atgcaaatta gcatttctcc tatttaatta ggaatggaag 13740
ggtgagaaga atttatttac ccaaaatctc taaaatcttc agtgccgaaa agacagtgtt 13800
tctttccatg gcaacttggg ggaaaacctg ccaacgaaac tgcttgcata cccatagctt 13860
tctcctactt ttctcttagc cttttgcttc tcagagagtt gcaggctgaa gaagcggctc 13920
atgtactgat gagcttaca ccaaaaaaaaa cccatgcttc ttgcatgcct cattcaccgc 13980
ccctgccact tttgatacag caagagagcc cccaagcaag aaagctcca agtcaatggc 14040
ttgaattaca agttccgggt catccaggca tggcttatcg tcgtcaggcc atatgaactg 14100
agaggtata ttggattcag atccaaggat tgatgcatcg aaagctaaag ggcgatgctc 14160
attctttgcg acagcagcag ttggcggaag catcggcttc tcttgaatga cagaactat 14220
tggcagacaa tgtaccattt tctgtttctt gttttaggtg gtcggagagg aaaaagaaga 14280
caagatatag aggagcaaaa ctaagagggt ttaaataaga gaagtagaaa accaataata 14340
tttggaatct aattgtttgt tttgaaactgt tgcctcattt cccctttaat ttgtgtttgt 14400
ttggcagctt aacgcttcct ttgggttcga ttgcaatata gtgcgttgaa atttttacct 14460
tgattttcaa tctactaca ccacagtac ttgcttggtt gtttgataa tttttacctt 14520
gattttcaat ctactacac cacagtgact tgcttggttg tttggataat ttttaccttg 14580
attttcaatc tcaactacac acagtgact gcctggttgt ttggatatct tggtttccag 14640
cacagtgaga caagcctgct gcaactgaca accttatctt cactggtgct aaaagctcca 14700
gtcagctcta gctagggcaa taggtatttt tggatgacaa aaatacccat actttaattt 14760
attattttac cattttatcc ttagatgtta aactaatttc tttccaatc ttatttgttt 14820
tcagatttgg gaataaaaca atagtttctc ccttgttctt gctggttctt cccttgttct 14880
tgctggttct tcccctcttt tttgctttgt tcttggttgt gggagcttag gatattcttt 14940
ttcttcaatc agactaaca gttagagata tcttgtgttt tttcacttta ttttctcatg 15000
ctcaacattt accctttttc tcaattaaca ggggaagtct acattaatta gtgcactctc 15060
agatagtaat ctgtatagt atgcaatgta tatatattct ttaaacagt ttttctcga 15120
agttaaattc tttgttaaaa gtaaaaggct ggatgttttt acctaattgg aggtaatgtc 15180
tttgtgtaga ttgtttgcaa cattggatgg ttgattaaaa agtgttgttc ttcttcaag 15240
gtgagatggg ttgctgtcac tcaactattat tattgttgtt attgttattg cttttccatt 15300
gaatagcctg gttctaaatg atatacttac cttatcccat aggcagcaac attttatctt 15360
ttgatctttg gacctatcat ttagcatgct ttacactcta tttagtaata ttattactaa 15420
ctataatttt aagtcataca caatgaaatt acctaaacat ctaaactcaa aaaattataa 15480
cttaaagctt 15490

- 5 <210> 2
- <211> 9382
- <212> DNA
- <213> Secuencia Artificial

ES 2 531 980 T3

<220>
 <223> Evento Cry1Ac inserto 3006-210-23 y sus secuencias de borde

5 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (556)..(556)
 <223> n is a, c, g, o t

10 <400> 2

```

·accaattatt atcgtctttt ttaattattc caacctttaa ctattatcct gccttaaaat   60
tcgaatacat ttattatcta taaactatcc gaatattatt atctaaatcc taattaaata   120
ctatttttta tcgagtattc gtatccgcca aggaaatcca tctccaaatt ttcaattatt   180
tttcagatat ctaaatctgt aaaatttcaa attcaagtac gttacaattc tttataaata   240
atccaaatta taaatatttt ataactatta attcataaat taaaatttat tattcaaata   300
ttcgaataat ctatttttaa gacgtaaagt attacatcga agggttactt tcaaagggta   360
gtgtatttcc atttcaatta ttcagaacgt tgtcgttttg ttccggtcat agaaaagggc   420
tctggaagag aagaaaatga cttgactttt caatttcatg ctcatccact cgtttcaatt   480
actgtttact aaaaaataa taaaataaaa tattaacaat gcattgagta tgatgtccgg   540
gaaatctaca tggatnagca atgagtatga tggatcaatat ggagaaaaag aaagagtaat   600
taccaatttt ttttcaattc aaaaatgtag atgtccgcag cgttattata aaatgaaagt   660
acattttgat aaaacgacaa attacgatcc gtcgtattta taggcgaaag caataaacia   720
attattctaa ttcggaaatc tttatttcga cgtgtctaca ttcacgtcca aatgggggccc   780
acttggctgc agccaagctt tcgcgagctc gagatccccg acatatgccc cggtttcgtt   840
gcgactaaca tgagttcttg gacaaatttg attggacctg atgagatgat ccaacccgag   900
gatatagcaa agctcgttcg tgcagcaatg gaacggccaa accgtgcttt tgtccccaag   960
aatgaggtgc tatgcatgaa ggaatctacc cgttgatgtc caacagtctc agggttaatg  1020
tctatgtatc ttaaataatg ttgtcgggat tttgtaatct catatagatt ttcactgtgc  1080
gacgcaaaaa tattaaataa atattattat tatctacgtt ttgattgaga tatctagatc  1140
tcgaggtgtg gaagatatga atttttttga gaaactagat aagattaatg aatatcggtg  1200
ttttggtttt ttcttgtggc cgtctttggt tatattgaga tttttcaaat cagtgcgcaa  1260
gacgtgacgt aagtatccga gtcagttttt atttttctac taatttggtc gtttatttcg  1320
gcgtgtagga catggcaacc gggcctgaat ttcgcggtta ttctgtttct attccaactt  1380
  
```


ES 2 531 980 T3

tttcttgatc cgcagccatt aacgactttt gaatagatac gtctagggtc gaggggggat 1440
 ccgtcgaggg ggtccaccaa aaacgtaagc gcttacgtac atggtcgagg gggccacca 1500
 aaaacgtaag cgcttacgta catggtcgag ggggtccacc aaaaacgtaa gcgcttacgt 1560
 acatggtcga gggggtccac caaaaacgta agcgcttacg tacatggtcg actagagcgt 1620
 gacgctcgcg gtgacgccat ttcgcctttt cagaaatgga taaatagcct tgcttcctat 1680
 tatacttcc caaattacca atacattaca ctagcatctg aatttcataa ccaatctcga 1740
 tacaccaaat cgcggatccg tcgacctgca ggtcgacatg tctccggaga ggagaccagt 1800
 tgagattagg ccagctacag cagctgatat ggccgcggtt tgtgatatcg ttaaccatta 1860
 cattgagacg tctacagtga actttaggac agagccacaa acaccacaag agtggattga 1920
 tgatctagag aggttgcaag atagataccc ttggttggtt gctgaggttg aggggtgttg 1980
 ggctggtatt gcttacgctg ggccttgaa ggctaggaac gcttacgatt ggacagttga 2040
 gagtactggt tacgtgtcac ataggcatca aagggtgggc ctaggatcca cattgtacac 2100
 acatttgctt aagtctatgg aggcgcaagg ttttaagtct gtggttgctg ttataggcct 2160
 tccaaacgat ccatctgtta ggttgcata ggccttgga tacacagccc ggggtacatt 2220
 gcgcgcagct ggatacaagc atggtgatg gcgatggtt ggttttggc aaagggattt 2280
 tgagttgcca gctcctcaa ggcagttag gccagttacc cagatctgag tcgacggatc 2340
 cccgacatat gccccggtt cgttgcgact aacatgagtt cttggacaaa tttgattgga 2400
 cctgatgaga tgatccaacc cgaggatata gcaaagctc ttcgtgcagc aatggaacgg 2460
 ccaaaccgtg cttttgtccc caagaatgag gtgctatgca tgaaggaatc taccggttga 2520
 tgtccaacag tctcagggtt aatgtctatg tatcttaaat aatgttgctg gtattttgta 2580
 atctcatata gattttact gtgcgacgca aaaatattaa ataaatatta ttattatcta 2640
 cgttttgatt gagatatcat caatattata ataaaaatat ccattaaaca cgatttgata 2700
 caaatgacag tcaataatct gatttgaata tttattaatt gtaacgaatt acataaagat 2760
 cgaatagaaa atactgcact gcaaatgaaa attaacacat actaataaat gcgtcaaata 2820
 tctttgcaa gatcaagcgg agtgagggcc tcatatccgg tctcagttac aagcacggta 2880
 tccccgaagc gcgctccacc aatgccctcg acatagatgc cgggctcgac gctgaggaca 2940
 ttgcctacct tgagcatggt ctcagcgcg gctttaagct caatcccatc ccaatctgaa 3000
 tatcctatcc cgcgcccagt ccggtgtaag aacgggtctg tccatccacc tctggtgga 3060
 attctgatct tggcgcgcat gcggatcctc attcctccat cagaagtaac tccacgctat 3120
 caacaatgaa tgttccttcc gtttctcaa tctcaatcca aaccttgctg gtttctggaa 3180
 agtactctaa ctctttggtg acatagccgg ctggtaacgg tgtgtagtcc ccatagcctc 3240
 tgttagattc gcaaggattg tccctacgtc catcggtgta agccttctcc tcataggctg 3300
 atgcatagtc agcgggtaca gaagagttgc tctcataggc tccatcgat cctcgattgc 3360
 gagaagtgta agtaccctca tactcctctt gagtcgcagt gtagtcattg caagttacgg 3420

ES 2 531 980 T3

tggtggttg	gtagacttc	tcctcgacgc	agttgctgaa	cttcagctcg	tcggtggtgt	3480
tctcaatctc	gtgtatggtg	acgcaacctt	ctccgatatcc	ttctttgtac	gcbgtaacac	3540
gaagaatgta	gccacgacca	ggacagacac	gaacttcttg	tgaaacttct	gcttcccact	3600
caggaacaac	aaggacagag	cggtgattgt	tctgttcttc	tacatctacg	tgccctttca	3660
cattccagca	ggataggcca	ttggtgaagt	caccattctt	gatgacattc	ctcgcatcat	3720
acaaggagaa	tgcaatgaa	atgcbccctt	ctaactcttc	aaagatagca	gcattgacac	3780
ccggaatcac	gctaagttca	ggaaggtaag	cttcccgaat	gctatgaacg	cgtttgctg	3840
cagcatgaat	catagctatg	ttggtatcag	cttggagcct	atcatactga	gagttcacia	3900
acagagcgtc	aacgctttct	ttggcttctt	tgtacacaat	gttgtttcc	cattccaact	3960
tctctctctt	gtccctccac	ttcttctcag	ccctcttcac	tctagcgagg	gcttctccaa	4020
caagtggttt	ctcttctaga	aactccagat	tgcttagcct	ggcatggcca	tcttgagtct	4080
tgatcttgaa	gatcaccac	acaccgaggt	cttcgctcag	gtcggtagag	ccaacgtcta	4140
tgtccaagga	gaagtgggtg	gagtgatggg	cacacttgcc	gatgggactt	ggggctgaaa	4200
gtggccagag	tgaacccgtc	ccaggcacat	tgactgtctc	atgtttggcg	ttgtatctga	4260
tgaggtagat	ctcaaggctt	tgactgtcct	cgatgtaacc	tctcaactgg	tatcttggtg	4320
aggctttgag	tttcgattca	tctatcttct	ggtacaggta	tgttggatag	cactcatcaa	4380
aggtaccxaa	gagcgtaaac	tagttctcct	tgaacacatc	atcacctcct	tgaatgggtg	4440
tgtccgtact	tccccctcat	ccacgatcta	gttgcctggt	gatccccgga	aagtgggat	4500
cttgaagcaa	gttccgctca	tactaagtc	gcttagcatg	tttgaccttc	tcggacaact	4560
ccttcttctc	atccaaacag	aactcatcag	agaggcactc	aacaagggtg	gaaacgcat	4620
cgatgtgata	gtcagtcaca	tctgtcttga	gcccaatctg	attggacgaa	gtgaacagag	4680
cattcaccgc	cttctgtgct	ctttccaagt	cagactctgc	ctcgagcgtt	gcagtaacgg	4740
gaatgaattc	gaagcggctg	attatcactc	cggcggttcc	ggagaaattt	ctaaccacta	4800
ctatgttacc	tagggaagag	gtgaaggcat	tggcactttc	gaagtaaccg	aaatcgctag	4860
attggagatt	atccaaggat	gtagctgtcg	ctggactgtg	attggaaaag	atggaggaat	4920
tacccaatt	gacgttgagg	tgaatagggg	taacagaggc	ataccttaca	cgaacacgat	4980
atctggtaga	gtcagatggg	aagtgaatgg	gcacttcaat	atacctcta	ttctggatgt	5040
tggtgccgga	agaattcagc	ctaaccaagt	cgctccaggt	gaatcctggt	cctgaaatga	5100
cagaaccatt	aaagagaaa	ttccccttga	cagctgggat	ctgagtaatg	ctatcggatg	5160
caattatggt	gttaaactca	gcactacgat	gtatccaaga	gaacatcgga	gctctgatga	5220
tactaacgct	gctattacta	aagcctgaac	ggaacatgga	cacatggcta	agcgatggc	5280
taaacccttg	cctaggtgga	acgttggtgt	tctgtggagg	gatctcatcc	aagctatcaa	5340
ctgttccgct	cttctgtag	acagcggatg	gcagatttga	ggaggttcca	taggcaaatt	5400
ctgtcccgtc	aagcacagac	aattggtgat	tggtgatgcc	gatggtgaaa	ggtctcctat	5460

ES 2 531 980 T3

atagagtgct ggacaagggt ctatacacgc cctgaccgag ttgagcaaca atacgttggt 5520
 gtggagctgc attgcccata gtcccgtaaa gtgggaaagt gaattctggt ccagagaacc 5580
 caacgggtga tgccatgac tgatgccctg accagtagta ataaccgagg tgcgcatcgg 5640
 tntagatcgt gatactgttc aatatgtcca tcaggtgtgg agacctgatg cttctctcta 5700
 tgccctgagc cgagcctcga aagctaccgt cgaagttctc gaggactggg tttgtgtaga 5760
 tttcccgggt caattgtgac acagtacgga ttgggtagcg cctagagtcg tagttgggaa 5820
 agagagcgac aatgtctagg acagttagtg tcaactctcg cctgaactgg ttgtacctga 5880
 cccaatctct agaatccggt ccccagacac gttcgagacc cgtgttgtag cagcgaacag 5940
 cataatcggg atagttgcca ataagcctag tcagatcatt ataacgacta ttgatagttg 6000
 cggcatcaaa gccccaccgt tgtccgaaca cggagacatc ggggagcacc gacaagtgca 6060
 ggttggcagc ctgcacgtac acggataaaa gaggaacttg gtaattctga acggcgaaga 6120
 gcggaattgc ggtcgtcagc gcgctgttca tgtcattgaa ttgaatgcgc atctcctctc 6180
 ttaaggcagg attggtcggg tctgcttccc actctcgaaa agattctgcg taaatctggt 6240
 aaaggttgct gaggccttct aaccttgaga tggcttgggt cctagcgaat tcttctattc 6300
 tttggttaat taactgctct atctgtacaa gaaaggcgtc ccattgagag ggaccaaga 6360
 ttccccaaat gatatcgaca agtccaagca cgaatccagc accgggcagc aactctgaca 6420
 aaaggaattg ggtaagtgac aacgagatgt cgataggtgt gtaaccagtc tcaatccggt 6480
 ctccaccag cacctcaacc tcagggttgc tcaggcagtt gtaaggaatg cactcgttga 6540
 tgttgggatt gttgtccatt gttggatcct ctagagtcga cctgcagaag taacaccaa 6600
 caacaggtg agcatcgaca aaagaacag taccaagcaa ataatagcg tatgaaggca 6660
 gggctaataa aatccacata tagctgctgc atatgccatc atccaagtat atcaagatca 6720
 aaataattat aaaacatact tgtttattat aatagatagg tactcaaggt tagagcatat 6780
 gaatagatgc tgcataatgcc atcatgtata tgcacagta aaaccacat caacatgtat 6840
 acctatccta gatcgatatt tccatccatc ttaaactcgt aactatgaag atgtatgaca 6900
 cacacataca gttccaaaat taataaatac accaggtagt ttgaaacagt attctactcc 6960
 gatctagaac gaatgaacga ccgccaacc acaccacatc atcacaacca agcgaacaaa 7020
 aagcatctct gtatatgcat cagtaaaacc cgcacaca tgtataccta tcctagatcg 7080
 atatttccat ccatcatctt caattcgtaa ctatgaatat gtatggcaca cacatacaga 7140
 tccaaaatta ataaatccac caggtagttt gaaacagaat tctactccga tctagaacga 7200
 ccgccaacc agaccacatc atcacaacca agacaaaaaa aagcatgaaa agatgaccgg 7260
 acaaacaagt gcacggcata tattgaaata aaggaaaagg gcaaaccaaa ccctatgcaa 7320
 cgaaacaaaa aaaatcatga aatcgatccc gtctgcggaa cggctagagc catcccagga 7380
 ttccccaaag agaaactg gcaagttagc aatcagaacg tgtctgacgt acaggtcgca 7440
 tccgtgtacg aacgctagca gcacggatct aacacaaaca cggatctaac acaaacatga 7500

ES 2 531 980 T3

acagaagtag aactaccggg ccctaaccat ggaccggaac gccgatctag agaaggtaga 7560
gagggggggg gggggaggac gagcggcgta ccttgaagcg gaggtgccga cgggtggatt 7620
tgggggagat ctggttgtgt gtgtgtgctc tccgaacaac acgaggttgg ggaaagaggg 7680
tgtggagggg gtgtctattt attacggcgg gcgaggaagg gaaagcgaag gagcgggtgg 7740
aaaggaatcc cccgtagctg ccggtgcccgt gagaggagga ggaggccgcc tgccgtgccg 7800
gctcacgtct gccgctccgc cacgcaatth ctggatgccg acagcggagc aagtccaacg 7860
gtggagcggg actctcgaga ggggtccaga ggcagcgaca gagatgccgt gccgtctgct 7920
tcgcttggcc cgacgcgacg ctgctggttc gctggttggg gtccgttaga ctcgtcgacg 7980
gcgtttaaca ggctggcatt atctactcga aacaagaaaa atgtttcctt agttttttta 8040
atthcttaaa gggtatthgt ttaatthtta gtcacttht tttatthct tttatthct 8100
aattatthaa taaaaaaact aaaatagagt thtagththc ttaatthtaga ggctaaaaata 8160
gaataaaaa gatgtactaa aaaaatthgt ctataaaaa cattaaccct aaaccctaaa 8220
tggatgtact aataaaatgg atgaagtatt atataggtga agctatthgc aaaaaaaaag 8280
gagaacacat gcacactaaa aagataaaa tgtagagtcc tgttgtcaaa atactcaatt 8340
gtcctthtaga ccatgtctaa ctgttcattt atatgattct ctaaaact gatattthg 8400
tagtactata gattatatta thcgtagagt aaagththaa tatatgtata aagatagata 8460
aactgcactt caaacaagtg tgacaaaaa aatathgtgg aatthththt aactthgaca 8520
tgcaatgctc attatctcta gagaggggca cgaccgggtc acgctgact gcaggcatgc 8580
gcgcttaaat taaggaatth ctcgagthta aacggatccc tgaaagcgac gttggatgth 8640
aacatctaca aatthcctth thctatcgac catgtacgta agcgctthc tththggthg 8700
accctthgag aactthgtag ctgtthgtgg cctthgtgct caagatggat cattaatthc 8760
cacctthcacc tacgatgggg ggcacgcac cggthgagta ththgtacgg ctaagagcga 8820
atthggcctg tagacctcaa thcggagctt thtaatthca aactatthcg gccthaactth 8880
thgtthgatg atgctgactg gctthcgtg ggaaaaaatt tgcaatctat gtagctthta 8940
actaatgtht ththctthta aaaaaaagtc atthththth gththgathaa thththggth 9000
thaaatthaa thaaatatta aaaagththg thaaatcath thththaacg atththgactg 9060
atththgatc ththththth thhaactthaat ctgaccag gthactagthg thcctgathc 9120
atctthgaaa cactatctth agctthgctg thggththcag gthgathaggc agagacttht 9180
thggagggth ththththth aatthththth ththththth thhaatgath aaaaaaaa 9240
ththththth thagaggaga thaaagthcaa ththththth ththththth thhaatthth 9300
aathththth agaaaaaac thhaatthth atthththth ththththth thhaatthth 9360
ctthctgagth ththththth th 9382

<210> 3
<211> 21
5 <212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
10 <223> Cebador directo 281-14

<400> 3

thcggctga agthgggag g 21

15 <210> 4

ES 2 531 980 T3

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Cebador inverso 281-15
 <400> 4

10 ccggacatga agccatttac 20

<210> 5
 <211> 603
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15

<220>
 <223> Secuencia de 603 bp del amplicón producido usando los cebadores de SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:4

20 <400> 5

tgtcggctga aggtagggag gaattaatca atcacagttg cttgtttctg agtctataga	60
atcatgaatt ttaaatttat ggaatgcatt ttttcgaaga tattgtatgc attaagtgta	120
atTTTTagttt caatatgaaa tttgagattt atatatatac ttacataaaa ccctccttta	180
ctgaattagt gccatggata aaagaccaat taagcaatcc ttccaacacg tgcattgact	240
ggattttcat cgcctcgtcc attgttaaatt tgataggtta ataagaacaa ttagttggct	300
actgattata tggattctgg gttaaaagta tttaggttta ctgttacata catggaggat	360
ctacatctat tttcactttt gtttaattaa ttttaagttag ttttgatgag ttttaaggatt	420
gtactagcca atagtagtac ataaaggaga tagagtacca aaacaagaa aaagccgaaa	480
gggtgtaatg ctaaattgta aaagaaagtt aaaataagag actcgaatta taatatgatt	540
ctctggcgca ctaattaagc tactatatat tgtcaatagt attgtaaatg gcttcatgtc	600
cgg	603

25 <210> 6
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Cebador directo 281-9
 <400> 6

35 tctctagaga ggggcacgac c 21

<210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Cebador inverso 281-10

45 <400> 7

cgagctggag agaccggtga c 21

<210> 8
 <211> 562

ES 2 531 980 T3

<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> Secuencia de 562 bp del amplicón producido usando los cebadores de SEQ ID NO:6 y SEQ ID NO:7

<400> 8

```
tctctagaga ggggcacgac cgggtcacgc tgcactgcag ccaagtggcc cccatttggga    60
cgtgaatgta gacacgtcga aataaagatt tccgaattag aataatttgc ttattgcttt    120
cgcctataaa tacgacggat cgtaatttgt cgctttatca gaatgtactt tcattttata    180
ataacgctgc ggacatctac atttttgaat tgaaaaaaaa ttgtaatta ctctttcttt    240
ttctccatat tgaccatcat actcattgct gatccatgta gatttccctt acttgtctcc    300
ctctaactctg actttattaa cccaaagcaa ttgcttattt gttccccacg cccacaaagc    360
ccagcattgt ccctaaggta ttaatttgtt gttcgattct tgttcttgaa cccatttggga    420
gaatgcaaca agggttttca tgtcagcacg gtaatggttc tgtgtaaatt ccagtagtgc    480
tgccaagta aagtctgggt atttcctcga atttgcggca ttaactaagc tagctgctgg    540
tgtcaccggt ctctccagct cg                                             562
```

10 <210> 9
<211> 25
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Cebador directo 3006-20

20 <400> 9
ttccaacctt taactattat cctgc 25

25 <210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Cebador inverso 3006-22

gctgcggaca tctacattt 20

35 <210> 11
<211> 614
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<223> Secuencia de 614 bp del amplicón producido usando los cebadores de SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10

<400> 11

ES 2 531 980 T3

ttccaacctt taactattat cctgccttaa aattcgaata catttattat ctataaacta 60
 tccgaatatt attatctaaa tcctaattaa atactatttt ttatcgagta ttcgtatccg 120
 ccaagggaat ccatctccaa attttcaatt atttttcaga tatctaaatc tgtaaaatth 180
 caaattcaag tacgttacaa ttctttataa ataatccaaa ttataaatat tttataacta 240
 ttaattcata aattaaaatt tattattcaa atattcgaat aatctatttt taagacgtaa 300
 agtattacat cgaagggtta ctttcaaagg gtagtgtatt tccatttcaa ttattcagaa 360
 cgttgtcgtt ttgttccggt catagaaaag ggctctggaa gagaagaaaa tgacttgact 420
 tttcaatttc atgctcatcc actcgtttca attactgttt actaaaaaaaa taataaaata 480
 aatattaac aatgcattga gtatgatgtc cgggaaatct acatggatca gcaatgagta 540
 tgatggtcaa tatggagaaa aagaaagagt aattaccaat tttttttcaa ttcaaaaatg 600
 tagatgtccg cagc 614

5 <210> 12
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador directo 3006-9
 10 <400> 12
 gacatgcaat gctcattatc tcta 24

15 <210> 13
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> Cebador inverso 3600-12
 <400> 13
 25 aagtctctgc cttctaccct gg 22

30 <210> 14
 <211> 662
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de 662 bp del amplicón producido usando los cebadores de SEQ ID NO:12 y SEQ ID NO:13
 35 <400> 14

gacatgcaat gctcattatc tctagagagg ggcacgaccg gggtcacgctg cactgcaggc 60

ES 2 531 980 T3

atgcgcgcct taattaagga attcctcgag tttaaacgga tccctgaaag cgacgttgga 120
 tgттаacatc tacaattgc cttttcttat cgaccatgta cgtaagcgct tacgtttttg 180
 gtggaccctt gaggaaactg gtagctgttg tgggcctgtg gtctcaagat ggatcattaa 240
 tttccacctt cacctacgat ggggggcatc gcaccggtga gtaatattgt acggctaaga 300
 gcgaatttgg cctgtagacc tcaattgcga gcttttctaat ttcaactat tcgggcctaa 360
 cttttggtgt gatgatgctg actggcttac gtgtggaaaa aatttgcaat ctatgtagtc 420
 tttactaat gtttttttct ttaaaaaaaa agtcattatt tttggtttga ttaatattatt 480
 tggtttaaat taaataaaat attaaaaagt ttagttaaat catctattta aacgatttgt 540
 actgatttgt gatctattaa ttttttaact taatctagac cagggtacta gttggtccga 600
 tcccacttg aaaacactat ctttagcttg ctggtaggtt ccagggtaga aggcagagac 660
 tt 662

<210> 15

<211> 53

5 <212> DNA

<213> Gossypium hirsutum

<220>

10 <223> Segmento de DNA de algodón genómico en el locus 281-24-236

<400> 15

ataactctg tagctctatt ccttagaccc accatgaacg agcagataaa tgc 53

15 <210> 16

<211> 16

<212> DNA

<213> Gossypium hirsutum

20 <220>

<223> genomic cotton DNA segment at locus 3006-210-23

<400> 16

25 ctggttatt ctatga 16

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Una semilla de algodón que comprende en su genoma el evento cry1Ac del algodón 3006-210-23, en la que el evento del algodón 3006-210-23 es una secuencia polinucleotídica del inserto cry1Ac que consiste en los nucleótidos 528-8900 de SEQ ID NO:2 y al menos 20 nucleótidos flanqueantes contiguos en ambos lados de dicha segunda secuencia del inserto, en la que los nucleótidos flanqueantes-5' proceden de los restos nucleótidos 1-527 de SEQ ID NO:2, y los nucleótidos flanqueantes-3' proceden de los restos nucleótidos 8901-9382 de SEQ ID NO:2.
- 2.- La semilla de algodón de la reivindicación 1, en la que la semilla comprende SEQ ID NO:2 en su genoma.
- 3.- Una planta de algodón producida cultivando la semilla de la planta de la reivindicación 1 o 2.
- 10 4.- Una planta de algodón de una progenie resistente a insectos de la planta de la reivindicación 3, en la que dicha planta de algodón de la progenie comprende al menos un evento cry1Ac del algodón 3006-210-23 según la reivindicación 1.
- 5.- La planta de la reivindicación 3, en la que dicha planta de algodón comprende los restos 508-8920 de SEQ ID NO:2.
- 15 6.- Una parte de la planta de algodón de la reivindicación 4, en la que dicha parte se selecciona del grupo que consiste en flores, cápsulas, hilas, brotes, raíces y hojas, y dicha parte comprende dicho polinucleótido.
- 7.- Un polinucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO:2.
- 8.- Una planta de algodón que comprende una secuencia genómica que comprende el polinucleótido según la reivindicación 7 en su genoma.
- 20 9.- Una semilla producida por una planta de algodón de la reivindicación 8, en la que dicha semilla comprende SEQ ID NO:2 en su genoma.

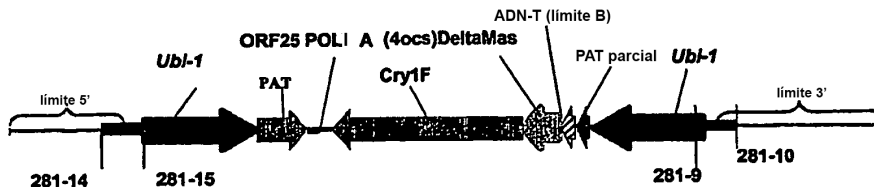


FIG. 1

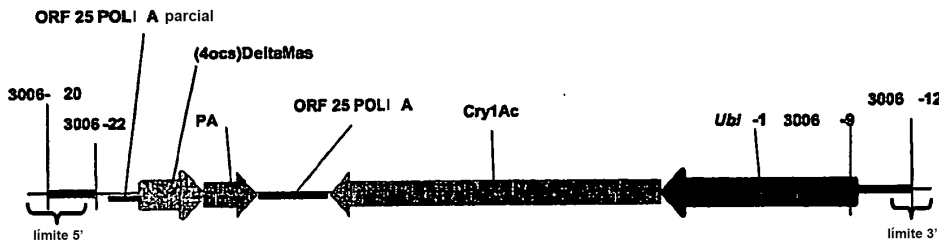


FIG. 2