

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 110**

51 Int. Cl.:

A01H 5/00 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.02.2005 E 05723097 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2015 EP 1737290**

54 Título: **Evento de maíz MIR604**

30 Prioridad:

25.03.2004 US 556260 P

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

26.06.2015

73 Titular/es:

**SYNGENTA PARTICIPATIONS AG (100.0%)
SCHWARZWALDALLEE 215
4058 BASEL, CH**

72 Inventor/es:

**STEINER, HENRY-YORK;
CHEN, ERIC y
MEGHJI, MOEZ**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 539 110 T3

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

DESCRIPCIÓN

Evento de maíz MIR604

La presente invención se refiere generalmente al campo de biología molecular de plantas, transformación de plantas, y reproducción de plantas. Más específicamente, la invención se refiere métodos para caracterizar plantas de maíz transgénicas resistentes a insectos que comprenden un nuevo genotipo transgénico.

Las plagas de plantas son un factor importante en la pérdida de los cultivos agrícolas importantes del mundo. Alrededor de \$8.000 millones de dólares se pierden cada año en los Estados Unidos solo debido a infestaciones de plagas no mamíferas que incluyen insectos. Las especies de gusanos de raíz de maíz se consideran las plagas de maíz más destructivas. Especies de plagas de gusanos de raíz importantes incluyen *Diabrotica virgifera virgifera*, el gusano de raíz de maíz del oeste; *D. longicornis barberi*, el gusano de raíz de maíz del norte, *D. undecimpunctata howardi*, el gusano de raíz de maíz del sur, y *D. virgifera zea*, el gusano de raíz de maíz mejicano.

El gusano de raíz de maíz se controla principalmente por aplicaciones intensivas de plaguicidas químicos. Así se puede lograr un buen control del gusano de raíz de maíz, pero estas sustancias químicas algunas veces también pueden afectar organismos beneficiosos. Otro problema que resulta del amplio uso de plaguicidas químicos es la aparición de variedades resistentes de insectos. Esto se ha mejorado parcialmente mediante varias prácticas de manejo de la resistencia, pero existe una necesidad en aumento de estrategias de control de plagas alternativas. Una de tales alternativas incluye la expresión de genes externos que codifican proteínas insecticidas en plantas transgénicas. Este enfoque ha proporcionado un medio eficiente de protección contra plagas de insectos seleccionadas, y se han comercializado plantas transgénicas que expresan toxinas insecticidas, permitiendo a los granjeros reducir las aplicaciones de insecticidas químicos.

La expresión de genes externos en plantas puede ser influenciada por sus posiciones cromosómicas, posiblemente debido a la estructura de cromatina o a la contigüidad de elementos de regulación transcripcional cercanos al sitio de integración (véase, por ejemplo, Weising et al., 1988, "Foreign Genes in Plants", Ann. Rev. Genet. 22:421-477). Por lo tanto, es habitual producir cientos de eventos diferentes e identificar aquellos eventos en busca de un único evento que tenga niveles y patrones de expresión transgénica deseados para fines comerciales. Un evento que tiene niveles o patrones deseados de expresión transgénica es útil para la introgresión del transgén en otros antecedentes genéticos por cruzamiento sexual usando métodos de reproducción convencionales. La progenie de tales cruzamientos mantiene las características de expresión transgénica del transformante original. Esta estrategia se usa para asegurar la expresión génica fiable en un número de variedades que están bien adaptadas a condiciones de crecimiento local.

Sería ventajoso poder detectar la presencia de un evento particular con el propósito de determinar si la progenie de un cruzamiento sexual contiene un transgén de interés. Además, un método para la detección de un evento particular podría ser práctico para cumplir con normativas que requieren la aprobación de pre-mercado y el etiquetado de alimentos derivados de plantas de maíz recombinantes, por ejemplo. Es posible detectar la presencia de un transgén mediante cualquier método de detección de ácido nucleico bien conocido que incluye pero no se limita a amplificación térmica (reacción en cadena de la polimerasa (PCR)) usando cebadores polinucleotídicos o hibridación de ADN usando sondas de ácido nucleico. Típicamente, por cuestión de simplicidad y uniformidad de reactivos y metodologías para uso en la detección de un constructo de ADN particular que se ha usado para transformar diversas variedades de plantas, estos métodos de detección generalmente se centran en elementos genéticos usados frecuentemente, por ejemplo promotores, terminadores, y genes marcadores, porque para muchos constructos de ADN, la región de secuencia codificante es intercambiable. Como resultado, tales métodos pueden no ser útiles para discriminar entre constructos que difieren solamente con referencia a la secuencia codificante. Además, tales métodos pueden no ser útiles para discriminar entre eventos diferentes, particularmente aquellos producidos usando el mismo constructo de ADN a menos que la secuencia de ADN cromosómico adyacente al ADN heterólogo insertado ("ADN flanqueante") sea conocida.

El documento WO 03/052073 describe un evento de maíz transgénico nuevo denominado VIP1034 que comprende un nuevo genotipo transgénico que comprende un gen *vip3A* y un gen *pat* que confiere resistencia a insectos y tolerancia a herbicidas, respectivamente, al evento de maíz transgénico y su progenie.

Se describen además ensayos para detectar la presencia del evento VIP1034 en base a las secuencias de ADN de los constructos recombinantes insertados en el genoma de maíz que dan como resultado el evento VIP1034, y de secuencias genómicas que flanquean los sitios de inserción.

El documento WO 2004/011601 describe composiciones y métodos para detectar la presencia del ADN del evento de maíz MON863 insertado en el genoma de maíz procedente de la transformación del constructo recombinante que contiene un gen *Cry3Bb* y de secuencias genómicas que flanquean el sitio de inserción. Se describen además plantas del evento de maíz MON863, su progenie y semillas que contienen el ADN del evento de maíz MON863.

El documento EP 1167531 describe un constructo de ADN que confiere tolerancia a plantas de maíz transgénicas. También se describen ensayos para detectar la presencia del evento de maíz PV-ZMGT32(nk603) en base a la

secuencia de ADN del constructo recombinante insertado en el genoma de maíz y de secuencias genómicas que flanquean el sitio de inserción.

5 El documento US 2002102582 describe plantas de maíz que incluyen el evento MON810, que confiere resistencia al daño por insecto lepidóptero. También se describen ensayos para detectar la presencia del evento MON810 en base a la secuencia de ADN del constructo recombinante insertado en el genoma de maíz que da como resultado el evento MON810, y las secuencias genómicas que flanquean el sitio de inserción.

10 La presente invención incluye métodos para caracterizar un evento de maíz transgénico resistente a insectos que ha incorporado en su genoma un gen *cry3A055*, descrito en la Publicación Internacional nº WO 03/01.8810, publicada el 6 de marzo de 2003, que codifica una toxina insecticida *Cry3A055*, útil para controlar de plagas de insectos *Diabrotica spp.* El evento de maíz transgénico también ha incorporado en su genoma un gen *pmi*, que codifica una enzima de fosfomanosa isomerasa (PMI), descrita en la Patente US nº 5.767.378, útil como un marcador seleccionable, que permite a la planta utilizar manosa como una fuente de carbono. Se describen además aquí secuencias de ácido nucleico aisladas novedosas las cuales son únicas para el evento de maíz transgénico, útiles para identificar el evento de maíz transgénico y para detectar ácidos nucleicos del evento de maíz transgénico en una muestra biológica, además de kits que comprenden los reactivos necesarios para uso en la detección de estos ácidos nucleicos en una muestra biológica.

20 La presente invención se refiere a un método para caracterizar una planta de maíz, o una parte de la misma, que comprende un inserto heterólogo que comprende un gen *cry3A055* de SEC ID NO: 59 flanqueado por secuencias nucleotídicas expuestas en SEC ID NO: 1 y SEC ID NO: 3, y SEC ID NO: 2, y SEC ID NO: 4, respectivamente, o por sus complementos, que comprende digerir el ADN genómico de la planta con la endonucleasa de restricción *KpnI* y sondar el ADN digerido con una sonda que comprende al menos una molécula de ácido nucleico de longitud suficiente de nucleótidos contiguos homólogos o complementarios a una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 3, y SEC ID NO: 4, que funciona como una sonda de ADN específica para dicho ADN. En una realización, se usa una sonda que comprende la secuencia nucleotídica expuesta en SEC ID NO: 56 o SEC ID NO: 59. En una realización, la invención se refiere al método para caracterizar una planta de maíz como se define anteriormente, en el que dicha planta de maíz comprende además en el inserto heterólogo la secuencia nucleotídica expuesta en SEC ID NO: 62.

30 En particular, la invención se refiere al método para caracterizar una planta de maíz como se define anteriormente, en el que dicha planta de maíz comprende en el inserto heterólogo las secuencias nucleotídicas como se exponen en SEC ID NOS: 57-63.

En una realización, la planta de maíz a caracterizar en el método según la invención es una semilla de una planta de maíz como se define anteriormente que comprende un inserto heterólogo que comprende un gen *cry3A055* de SEC ID NO: 59 flanqueado por secuencias nucleotídicas expuestas en SEC ID NO: 1 y SEC ID NO: 3, y SEC ID NO: 2, y SEC ID NO: 4, respectivamente, o por sus complementos.

35 En una realización, la planta de maíz a caracterizar en el método según la invención es una semilla como se define anteriormente, que comprende además en el inserto heterólogo la secuencia nucleotídica como se expone en SEC ID NO: 62, particularmente las secuencias nucleotídicas como se exponen en SEC ID NO: 57-63.

En una realización, dicha semilla se trata con sustancias químicas de tratamiento de semillas.

En una realización, dicha semilla es una semilla híbrida.

40 En una realización, la presente invención se refiere a un método para detectar la presencia de un ADN que corresponde a una planta de maíz que comprende un inserto heterólogo que comprende un gen *cry3A055* de SEC ID NO: 59 flanqueado por secuencias nucleotídicas expuestas en SEC ID NO: 1 y SEC ID NO: 3, y SEC ID NO: 2, y SEC ID NO: 4, respectivamente, o por sus complementos, en una muestra, que comprende

45 a) poner en contacto la muestra que comprende ADN con una sonda que se hibrida en condiciones muy restrictivas con ADN genómico de una planta de maíz que comprende inserto heterólogo que comprende un gen *cry3A055* de SEC ID NO: 59 flanqueado por secuencias nucleotídicas expuestas en SEC ID NO: 1 y SEC ID NO: 3, y SEC ID NO: 2, y SEC ID NO: 4, respectivamente, o por sus complementos, y que no se hibrida en condiciones muy restrictivas con ADN de una planta de maíz de control;

b) someter la muestra y la sonda a condiciones de hibridación muy restrictivas; y

50 c) detectar la hibridación de la sonda al ADN,

en el que dicha sonda comprende al menos una molécula de ácido nucleico de longitud suficiente de nucleótidos contiguos homólogos o complementarios a una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 3, y SEC ID NO: 4.

En otra realización, la invención se refiere a un kit para la detección de un ADN que corresponde a una planta de maíz que comprende un inserto heterólogo que comprende un gen *cry3A055* de SEC ID NO: 59 flanqueado por secuencias nucleotídicas expuestas en SEC ID NO: 1 y SEC ID NO: 3, y SEC ID NO: 2, y SEC ID NO: 4, respectivamente, o por sus complementos en una muestra biológica, en el que el kit comprende al menos una molécula de ácido nucleico de longitud suficiente de nucleótidos contiguos homólogos o complementarios a una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 3, y SEC ID NO: 4, que funciona como una sonda de ADN específica para dicho ADN.

SUMARIO

La presente invención se refiere a un método para caracterizar un evento de maíz transgénico, designado MIR604, que comprende un nuevo genotipo transgénico que comprende un gen *cry3A055* y un gen *pmi* el cual confiere resistencia a insectos y la capacidad para utilizar manosa como una fuente de carbono, respectivamente, al evento de maíz MIR604 y progenie del mismo. También se describen aquí plantas de maíz transgénicas que comprenden el genotipo como se describe aquí, semillas de plantas de maíz transgénicas que comprenden el genotipo como se describe aquí, y métodos para producir una planta de maíz transgénica que comprende el genotipo como se describe aquí por cruzamiento de un maíz endogámico que comprende el genotipo como se describe aquí con su propia u otra línea de maíz de un genotipo diferente. Las plantas de maíz transgénicas esencialmente pueden tener todas las características morfológicas y fisiológicas de la planta de maíz no transgénica isogénica correspondiente, además de aquellas conferidas en la planta de maíz por el genotipo novedoso como se describe aquí. También se describen aquí composiciones y métodos para detectar la presencia de ácidos nucleicos del evento MIR604 en base a la secuencia de ADN de los casetes de expresión recombinante insertados en el genoma de maíz que dan como resultado el evento MIR604 y de secuencias genómicas que flanquean el sitio de inserción. El evento MIR604 se puede caracterizar además analizando los niveles de expresión de las proteínas *Cry3A055* y *PMI* además de ensayando la eficacia frente al gusano de raíz de maíz.

Según un aspecto, se describe aquí una molécula de ácido nucleico aislada que comprende al menos 10 nucleótidos contiguos de una secuencia de ADN heteróloga insertada en el genoma de la planta de maíz de evento de maíz MIR604 y al menos 10 nucleótidos contiguos de un ADN de genoma de planta de maíz que flanquea el punto de inserción de una secuencia de ADN heteróloga insertada dentro del genoma de la planta de maíz de evento de maíz MIR604. La molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con este aspecto puede comprender al menos 20 o al menos 50 nucleótidos contiguos de una secuencia de ADN heteróloga insertada dentro del genoma de la planta de maíz del evento de maíz MIR604, y al menos 20 o al menos 50 nucleótidos contiguos de un ADN de genoma de planta de maíz que flanquea el punto de inserción de una secuencia de ADN heteróloga insertada dentro del genoma de la planta de maíz del evento de maíz MIR604.

Según otro aspecto, se describe aquí una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia nucleotídica, que comprende al menos una secuencia de unión del evento MIR604 seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 1 y SEC ID NO: 2, y sus complementos. Una secuencia de unión abarca la unión entre el ADN heterólogo que comprende los casetes de expresión insertados en el genoma de maíz y el ADN del genoma de maíz que flanquea el sitio de inserción, y es un diagnóstico para el evento MIR604.

Según otro aspecto, se describe un ácido nucleico aislado que liga una molécula de ADN heteróloga al genoma de la planta de maíz en el evento de maíz MIR604 que comprende una secuencia de alrededor de 11 a alrededor de 20 nucleótidos contiguos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO:1, SEC ID NO: 2, y sus complementos.

Según otro aspecto, se describe una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 4, y sus complementos.

Según otro aspecto, se describe un amplicón que comprende una molécula de ácido nucleico como se describe aquí.

Según todavía otro aspecto, se describen cebadores de secuencias flanqueantes para detectar el evento MIR604. Tales cebadores de secuencias flanqueantes comprenden una secuencia de ácido nucleico aislada que comprende al menos 10-15 nucleótidos contiguos de los nucleótidos 1-801 como se expone en SEC ID NO: 3 (designada arbitrariamente en la presente como la secuencia de flaqueo 5'), o sus complementos. Según un subaspecto, los cebadores de secuencias flanqueantes se seleccionan del grupo que consiste en SEC ID NO:7, SEC ID NO: 8, SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 10, SEC ID NO: 11, SEC ID NO: 12, SEC ID NO: 13, SEC ID NO: 14, SEC ID NO: 15, y sus complementos.

En otro aspecto, los cebadores de secuencias flanqueantes comprenden una secuencia de ácido nucleico aislada que comprende al menos 10-15 nucleótidos contiguos de los nucleótidos 507-1570 como se expone en SEC ID NO: 4 (designada arbitrariamente aquí como la secuencia flanqueante 3'), o sus complementos. En un subaspecto, los cebadores de secuencias flanqueantes se seleccionan del grupo que consiste en SEC ID NO: 39, SEC ID NO: 40, SEC ID NO: 41, SEC ID NO: 42, SEC ID NO: 43, SEC ID NO: 44, SEC ID NO: 45, SEC ID NO: 46, y sus complementos.

Según otro aspecto, se describen, por ejemplo, pares de cebadores que son útiles para amplificación de ácido nucleico. Tales pares de cebadores comprenden un primer cebador que comprende una secuencia nucleotídica de al menos 10-15 nucleótidos contiguos de longitud que es o es complementaria a una de las secuencias de flaqueo genómicas descritas anteriormente (SEC ID NO: 3, o SEC ID NO: 4), y un segundo cebador que comprende una secuencia nucleotídica de al menos 10-15 nucleótidos contiguos de ADN heterólogo insertado en el genoma del evento MIR604. El segundo cebador preferiblemente comprende una secuencia nucleotídica la cual es o es complementaria a la secuencia de inserto adyacente a la secuencia de ADN flanqueante genómica de la planta como se expone en SEC ID NO: 3 desde la posición nucleotídica 802 hasta 1310 y en SEC ID NO: 4 desde la posición nucleotídica 1 hasta 506.

Según otro aspecto, se describen métodos para detectar la presencia de ADN que corresponde al evento MIR604 en una muestra biológica. Tales métodos comprenden: (a) poner en contacto de la muestra que comprende ADN con un par de cebadores que, cuando se usan en una reacción de amplificación de ácido nucleico con ADN genómico del evento de maíz MIR604, produce un amplicón que es de diagnóstico para el evento de maíz MIR604; (b) llevar a cabo una reacción de amplificación de ácido nucleico, produciendo de esa manera el amplicón; y (c) detectar el amplicón. En un subaspecto, el amplicón comprende una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 3, y SEC ID NO: 4, y sus complementos.

Según otro aspecto, se describen métodos para detectar la presencia de un ADN que corresponde al evento MIR604 en una muestra biológica. Tales métodos comprenden: (a) poner en contacto la muestra que comprende ADN con una sonda que se hibrida en condiciones muy restrictivas con ADN genómico del evento de maíz MIR604 y que no se hibrida en condiciones muy restrictivas con ADN de una planta de maíz de control; (b) someter la muestra y la sonda a condiciones de hibridación muy restrictivas; y (c) detectar la hibridación de la sonda al ADN.

Según otro aspecto, se describe un kit para la detección de ácidos nucleicos del evento MIR604 en una muestra biológica. El kit incluye al menos una secuencia de ADN que comprende una longitud suficiente de polinucleótidos que es o es complementaria a SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 3, o SEC ID NO: 4, en el que las secuencias de ADN son útiles como cebadores o sondas que se hibridan a ADN aislado del evento MIR604, y que, con la amplificación de o hibridación a una secuencia de ácido nucleico en una muestra seguido de la detección del amplicón o hibridación a la secuencia diana, son de diagnóstico para la presencia de secuencias de ácido nucleico del evento MIR604 en la muestra. El kit además incluye otros materiales necesarios para hacer posible métodos de hibridación o amplificación de ácido nucleico.

En otro aspecto, se describe un método para detectar proteína de evento de maíz MIR604 en una muestra biológica, que comprende: (a) extraer proteína de una muestra de tejido de evento de maíz MIR604; (b) ensayar la proteína extraída usando un método inmunológico que comprende anticuerpo específico para la proteína marcadora insecticida o seleccionable producida por el evento MIR604; y (c) detectar la unión de dicho anticuerpo a la proteína marcadora insecticida o seleccionable.

En otro aspecto, se describe una muestra biológica derivada de una planta, tejido o semilla de maíz de evento MIR604, en la que la muestra comprende una secuencia nucleotídica que es o es complementaria a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 1 y SEC ID NO: 2, y en la que la secuencia es detectable en la muestra usando un método de amplificación o hibridación de ácido nucleico. En un subaspecto, la muestra se selecciona del grupo que consiste en harina de maíz, harina molida de maíz, jarabe de maíz, aceite de maíz, almidón de maíz, y cereales fabricados en su totalidad o en parte para contener subproductos de maíz.

En otro aspecto, se describe un extracto derivado de una planta, tejido o semilla de maíz de evento MIR604 que comprende una secuencia nucleotídica que es o es complementaria a una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 1 y SEC ID NO: 2. En un subaspecto, la secuencia es detectable en el extracto usando un método de amplificación de ácido nucleico o hibridación de ácido nucleico. En otro subaspecto, la muestra se selecciona del grupo que consiste en harina de maíz, harina molida de maíz, jarabe de maíz, aceite de maíz, almidón de maíz, y cereales fabricados en su totalidad o en parte para contener subproductos de maíz.

Según otro aspecto, se describen aquí plantas y semillas de maíz que comprenden las moléculas de ácido nucleico como se describen aquí. Según otro aspecto, se describe un método para producir una planta de maíz resistente a al menos infestación de gusano de raíz de maíz, que comprende: (a) cruzar sexualmente una primera planta de maíz progenitora con una segunda planta de maíz progenitora, en el que dicha primera o segunda planta de maíz progenitora comprende ADN de evento de maíz MIR604, produciendo de esa manera una pluralidad de plantas de progenie de primera generación; (b) seleccionar una planta de progenie de primera generación que es resistente a al menos infestación de gusano de raíz de maíz; (c) autofecundar la planta de progenie de primera generación, produciendo de esa manera una pluralidad de plantas de progenie de segunda generación; (d) seleccionar de las plantas de progenie de segunda generación, una planta que al menos es resistente a infestación de gusano de raíz de maíz; en el que las plantas de progenie de segunda generación comprenden una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 1 y SEC ID NO: 2.

Según todavía otro aspecto, se describe un método para producir semilla de maíz, que comprende cruzar una primera planta de maíz progenitora con una segunda planta de maíz progenitora y cosechar las semillas de maíz de

primera generación resultantes, en el que la primera o segunda planta de maíz progenitora es una planta de maíz endogámica como se describe aquí.

- 5 Según otro aspecto, se describe un método para producir semillas de maíz híbridas, que comprende las etapas de: (a) sembrar semillas de una primera línea de maíz endogámica como se describe aquí y semillas de una segunda línea de maíz endogámica que tiene un genotipo diferente; (b) cultivar plantas de maíz que resultan de dicha siembra hasta el momento de la floración; (c) emasculas flores de plantas de maíz de una las líneas endogámicas de maíz; (d) permitir que suceda la polinización de la otra línea endogámica, y (e) cosechar las semillas híbridas producidas de ese modo.

Lo anterior será más manifiesto a partir de la siguiente descripción detallada.

10 DESCRIPCION DE LAS SECUENCIAS EN EL LISTADO DE SECUENCIAS

SEC ID NO: 1 es la unión de genoma-inserto 5'.

SEC ID NO: 2 es la unión de inserto-genoma 3'.

SEC ID NO: 3 es la secuencia de genoma + inserto 5'.

SEC ID NO: 4 es la secuencia de inserto + genoma 3'.

- 15 SEC ID NO: 5 es genoma de maíz que flanquea en 5' al inserto.

SEC ID NO: 6 es genoma de maíz que flanquea en 3' al inserto.

SEC ID Nos: 7-15 son cebadores de secuencias flanqueantes de 5' útiles en la presente invención.

SEC ID Nos: 16-20 son cebadores de la secuencia del promotor MTL útiles en la presente invención.

SEC ID Nos: 21-28 son cebadores de la secuencia de *cry3A055* útiles en la presente invención.

- 20 SEC ID Nos: 29-30 son cebadores de la secuencia de *ZmUbiInt* útiles en la presente invención.

SEC ID Nos: 31-37 son cebadores de la secuencia de *pmi* útiles en la presente invención.

SEC ID NO: 38 es un cebador de la secuencia de NOS útil en la presente invención.

SEC ID Nos: 39-46 son cebadores de secuencias flanqueantes de 3' útiles en la presente invención.

SEC ID Nos: 47-49 son cebadores y sondas TAQMAN de *cry3A055*.

- 25 SEC ID Nos: 50-52 son cebadores y sondas TAQMAN de *pmi*.

SEC ID Nos: 53-55 son cebadores y sondas TAQMAN de *ZmADH*.

SEC ID NO: 56 es una sonda de MIR604 útil en la presente invención.

SEC ID NO: 57 es la secuencia para la región de frontera derecha.

SEC ID NO: 58 es la secuencia del promotor MTL.

- 30 SEC ID NO: 59 es la secuencia del gen *cry3A055*.

SEC ID NO: 60 es la secuencia del terminador de NOS.

SEC ID NO: 61 es la secuencia del promotor *ZmUbiInt*.

SEC ID NO: 62 es la secuencia del gen *pmi*.

SEC ID NO: 63 es la secuencia de la región de frontera izquierda.

35 BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

La Figura 1 ilustra un vector de expresión de planta designado pZM26. El mapa identifica el sitio de restricción KpnI usado para análisis de Southern.

- 40 La Figura 2 es un mapa gráfico que ilustra la organización de los elementos que comprenden las secuencias de ácido nucleico heterólogas insertadas dentro del genoma de evento de maíz MIR604 y establece las posiciones relativas en las que las secuencias de ácido nucleico insertadas se ligan a secuencias de ADN genómico de maíz las cuales flanquean los extremos de las secuencias de ADN heterólogas insertadas. 1 =

genoma vegetal flanqueante 5' (SEC ID NO: 5); 2 = región de frontera derecha (SEC ID NO: 57); 3 = promotor MTL (SEC ID NO: 58); 4 = gen cry3A055 (SEC ID NO: 59); 5 = terminador NOS (SEC ID NO: 60); 6 = promotor ZmUbiINT (SEC ID NO: 61); 7 = gen pmi (SEC ID NO: 62); 8 = terminador NOS (SEC ID NO: 60); 9 = región de frontera izquierda (SEC ID NO: 63); y 10 = genoma vegetal flanqueante 3' (SEC ID NO: 6).

5 Las siguientes definiciones y métodos se proporcionan para definir mejor la presente invención y para guiar a aquellos de pericia normal en la técnica en la práctica de la presente invención. A menos que se indique de otra manera, los términos usados aquí están para ser entendidos de acuerdo con el uso convencional por aquellos de pericia normal en la técnica pertinente. Las definiciones de términos comunes en biología molecular también se pueden encontrar en Rieger et al., *Glossary of Genetics: Classical and Molecular*, 5ª edición, Springer-Verlag: Nueva York, 1994.

10 Como se usa aquí, el término “amplificado” significa la construcción de copias múltiples de una molécula de ácido nucleico o copias múltiples complementarias a la molécula de ácido nucleico usando al menos una de las moléculas de ácido nucleico como un molde. Los sistemas de amplificación incluyen el sistema de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), sistema de reacción en cadena de ligasa (LCR), amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA, Cangene, Mississauga, Ontario), sistemas Q-Beta Replicase, sistema de amplificación basada en transcripción (TAS), y amplificación por desplazamiento de hebra (SDA). Véase, por ejemplo, *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*, D. H. Persing et al., Ed. American Society for Micro biology, Washington, D. C. (1993). El producto de amplificación se denomina un amplión.

20 Una “secuencia codificante” es una secuencia de ácido nucleico que se transcribe en ARN tal como ARNm, ARNr, ARNt, ARNnp, ARN codificante o ARN no codificante. Preferiblemente, el ARN se traduce luego en un organismo para producir una proteína.

25 “Kit de detección”, como se usa aquí, se refiere a un kit usado para detectar la presencia o ausencia de ADN de plantas de MIR604 en una muestra, que comprende sondas y cebadores de ácido nucleico que se pueden usar en la presente invención, que se hibridan específicamente en condiciones muy restrictivas a una secuencia de ADN diana, y otros materiales necesarios para hacer posibles los métodos de hibridación o amplificación de ácido nucleico.

30 Como se usa aquí, el término “evento” transgénico se refiere a una planta recombinante producida por transformación y regeneración de una célula vegetal única con ADN heterólogo, por ejemplo un casete de expresión que incluye un gen de interés. El término “evento” se refiere al transformante original y/o progenie del transformante que incluye el ADN heterólogo. El término “evento” también se refiere a progenie producida por un cruce sexual entre el transformante y otra línea de maíz. Aún después del retrocruzamiento repetido con un progenitor recurrente, el ADN insertado y el ADN de flanco del progenitor transformado está presente en la progenie del cruce en la misma localización cromosómica. Normalmente, la transformación de tejido vegetal produce eventos múltiples, cada uno de los cuales representan inserción de un constructo de ADN en una localización diferente en el genoma de una célula vegetal. En base a la expresión del transgén u otras características deseables, se selecciona un evento particular. Así, “evento MIR604”, “MIR604” o “evento MIR604”, como se usa aquí, significa el transformante de MIR604 original y/o la progenie del transformante de MIR604.

35 “Casete de expresión”, como se usa aquí, significa una molécula de ácido nucleico capaz de dirigir la expresión de una secuencia nucleotídica particular en una célula hospedante apropiada, que comprende un promotor ligado operablemente a la secuencia nucleotídica de interés que está ligada operablemente a señales de terminación. También comprende típicamente secuencias requeridas para traducción apropiada de la secuencia nucleotídica. El casete de expresión también puede comprender secuencias no necesarias en la expresión directa de una secuencia nucleotídica de interés pero que están presentes debido a sitios de restricción convenientes para la eliminación del casete de un vector de expresión. El casete de expresión que comprende la secuencia nucleotídica de interés puede ser quimérico, significando que al menos uno de sus componentes es heterólogo con respecto a al menos uno de sus otros componentes. El casete de expresión también puede ser uno de origen natural pero que se ha obtenido en una forma recombinante útil para expresión heteróloga. Típicamente, sin embargo, el casete de expresión es heterólogo con respecto al hospedante, esto es, la secuencia de ácido nucleico particular del casete de expresión no aparece de forma natural en la célula hospedante y debe haber sido introducida dentro de la célula hospedante o en un ancestro de la célula hospedante mediante un proceso de transformación conocido en la técnica. La expresión de la secuencia nucleotídica en el casete de expresión puede estar bajo el control de un promotor constitutivo o de un promotor inducible que inicia la transcripción solamente cuando la célula hospedante se expone a algún estímulo externo particular. En el caso de un organismo multicelular, tal como una planta, el promotor también puede ser específico para un tejido particular, u órgano, o etapa del desarrollo. Un casete de expresión, o fragmento de este, también puede ser referido como “secuencia insertada” o “secuencia de inserción” cuando se transforma en una planta.

60 Un “gen” es una región definida que se localiza dentro de un genoma y que, además de la secuencia de ácido nucleico codificante mencionada anteriormente, comprende otras secuencias de ácido nucleico, principalmente reguladoras, responsables del control de la expresión, es decir, la transcripción y traducción, de la porción codificante. Un gen también puede comprender otras secuencias no traducidas 5' y 3' y secuencias de terminación. Otros elementos que pueden estar presentes son, por ejemplo, intrones.

- 5 “Gen de interés” se refiere a cualquier gen el cual, cuando se transfiere a una planta, confiere en la planta una característica deseada tal como resistencia a antibióticos, resistencia a virus, resistencia a insecto, resistencia a enfermedad, o resistencia a otras plagas, tolerancia a herbicidas, valor nutricional mejorado, comportamiento mejorado en un proceso industrial o capacidad reproductiva alterada. El “gen de interés” también puede ser uno que se transfiere a plantas para la producción de enzimas o metabolitos de valor comercial en la planta.
- “Genotipo”, como se usa aquí, es el material genético heredado de plantas de maíz progenitoras, el cual no todo se expresa necesariamente en las plantas de maíz descendientes. El genotipo MIR604 se refiere al material genético heterólogo transformado en el genoma de una planta además del material genético que flanquea la secuencia insertada.
- 10 Una secuencia de ácido nucleico “heteróloga” es una secuencia de ácido nucleico no asociada naturalmente con una célula hospedante en la cual se introduce, incluyendo copias múltiples de origen no natural de una secuencia de ácido nucleico de origen natural.
- Una secuencia de ácido nucleico “homóloga” es una secuencia de ácido nucleico asociada naturalmente con una célula hospedante dentro de la cual se introduce.
- 15 “Ligado operablemente” se refiere a la asociación de secuencias de ácido nucleico en un único fragmento de ácido nucleico tal que la función de una afecta a la función de la otra. Por ejemplo, un promotor se liga operablemente con una secuencia codificante o ARN funcional cuando es capaz de afectar la expresión de aquella secuencia codificante o ARN funcional (esto es, que la secuencia codificante o ARN funcional está bajo el control transcripcional del promotor). Las secuencias codificantes en orientación codificante o no codificante se pueden ligar operablemente a secuencias reguladoras.
- 20 “Cebadores”, como se usa aquí, son ácidos nucleicos aislados que se hibridan a una hebra de ADN diana complementaria mediante hibridación de ácidos nucleicos para formar un híbrido entre el cebador y la hebra de ADN diana, luego se alargan a lo largo de la hebra de ADN diana mediante una polimerasa, tal como ADN polimerasa. Los pares o conjuntos de cebadores se pueden usar para amplificación de una molécula de ácido nucleico, por ejemplo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otros métodos de amplificación de ácidos nucleicos convencionales.
- 25 Una “sonda” es un ácido nucleico aislado al cual se acopla un marcador detectable convencional o molécula informadora, tales como un isótopo radioactivo, ligando, agente quimioluminiscente, o enzima. Tal sonda es complementaria a una hebra de un ácido nucleico diana, en el caso de la presente invención, a una hebra de ADN genómico de evento de maíz, MIR604. El ADN genómico de MIR604 puede ser de una planta de maíz o de una muestra que incluye ADN del evento. Las sondas que se pueden usar en la presente invención incluyen no solamente ácidos desoxirribonucleicos o ribonucleicos sino también poliamidas y otros materiales de sonda que se unen específicamente a una secuencia de ADN diana y se pueden usar para detectar la presencia de esa secuencia de ADN diana.
- 30 Los cebadores y sondas generalmente tienen entre 10 y 15 nucleótidos o más de longitud, los cebadores y sondas también pueden ser de al menos 20 nucleótidos o más de longitud, o al menos 25 nucleótidos o más, o al menos 30 nucleótidos o más de longitud. Tales cebadores y sondas se hibridan específicamente a una secuencia diana en condiciones de hibridación muy restrictivas. Los cebadores y sondas que se pueden usar en la presente invención pueden tener una complementariedad de secuencia completa con la secuencia diana, aunque se pueden mediante métodos convencionales diseñar sondas que difieren de la secuencia diana y que retienen la capacidad para hibridarse a secuencias diana.
- 35 “Condiciones restrictivas” o “condiciones de hibridación restrictivas” incluyen referencia a condiciones bajo las cuales una sonda hibridará a su secuencia diana, hasta un grado detectablemente mayor que a otras secuencias. Las condiciones restrictivas dependen de la secuencia diana y diferirán dependiendo de la estructura del polinucleótido. Mediante el control de la restricción de las condiciones de hibridación y/o lavado, se pueden identificar secuencias diana las cuales son 100% complementarias a la sonda (sondeo homólogo). Alternativamente, las condiciones de restricción se pueden ajustar para permitir cierto desemparejamiento en las secuencias de manera que se detecten menores grados de similitud (sondeo heterólogo). Las secuencias más largas se hibridan específicamente a temperaturas más altas. Una guía extensiva para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen (1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic acid probes, Parte I, Capítulo 2 “Overview of principles of hibridation and the strategy of nucleic acid probe assays”, Elsevier: Nueva York; y Current Protocols in Molecular Biology, Capítulo 2, Ausubel et al., Eds., Greene Publishing and Wiley-Interscience: Nueva York (1995), y también Sambrook et al., (2001) Molecular cloning: A Laboratory Manual (5ª Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).
- 40 45 50 55 La especificidad es típicamente la función de lavados post-hibridación, siendo los factores críticos la fuerza iónica y la temperatura de la disolución de lavado final. Generalmente, las condiciones de hibridación y lavado muy restrictivas se seleccionan para ser alrededor de 5°C menor que el punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (bajo fuerza iónica y pH definidos) a la cual el

50% de la secuencia diana se hibrida a una sonda perfectamente emparejada. Típicamente, en condiciones muy restrictivas una sonda se hibridará a su subsecuencia diana, pero no a otras secuencias.

Un ejemplo de condiciones de hibridación muy restrictivas para hibridación de ácidos nucleicos complementarios los cuales tienen más de 100 restos complementarios sobre un filtro en una transferencia Southern o Northern es formamida al 50% con 1 mg de heparina a 42°C, llevándose a cabo la hibridación durante la noche. Un ejemplo de condiciones de lavado de restricción muy elevada es NaCl 0,15M a 72°C durante alrededor de 15 minutos. Un ejemplo de condiciones de lavado muy restrictivas es un lavado SSC 0,2x a 65°C durante 15 minutos (véase, Sambrook, más abajo, para una descripción de disolución amortiguadora SSC).

Las condiciones de hibridación ejemplares para la presente invención incluyen hibridación en SDS al 7%, NaPO₄ 0,25 M pH 7,2 a 67°C durante la noche, seguido de dos lavados en SDS al 5%, NaPO₄ 0,20 M pH 7,2 a 65°C durante 30 minutos cada lavado, y dos lavados en SDS al 1%, NaPO₄ 0,20 M pH 7,2 a 65°C durante 30 minutos cada lavado. Un lavado de restricción media ejemplar para dúplex de, por ejemplo, más de 100 nucleótidos, es 1x SSC a 45°C durante 15 minutos. Un lavado de restricción baja ejemplar para un dúplex de, por ejemplo, más de 100 nucleótidos, es 4-6x SSC a 40°C durante 15 minutos.

Para sondas de alrededor de 10 hasta 50 nucleótidos, las condiciones muy restrictivas típicamente implican concentraciones de sal de menos de alrededor de 1,0 M de ion de Na, típicamente una concentración de alrededor de 0,01 a 1,0 M de ion de Na (u otras sales) a pH 7,0 a 8,3, y la temperatura típicamente es al menos alrededor de 30°C. Las condiciones muy restrictivas también se pueden lograr con la adición de agentes de desestabilización tales como formamida. En general, una relación de señal a ruido de 2x (o mayor) que aquella observada para una sonda no relacionada en el ensayo de hibridación particular indica la detección de una hibridación específica. Los ácidos nucleicos que no se hibridan entre sí en condiciones muy restrictivas son todavía sustancialmente idénticos si las proteínas que codifican son sustancialmente idénticas. Esto ocurre, por ejemplo, cuando una copia de un ácido nucleico se crea usando la degeneración de codón máxima permitida por el código genético.

Los siguientes son conjuntos ejemplares de condiciones de hibridación/lavado que se pueden usar para hibridar secuencias nucleotídicas que son sustancialmente idénticas a secuencias nucleotídicas de referencia como se describen aquí: una secuencia nucleotídica de referencia preferiblemente se hibrida a la secuencia nucleotídica de referencia en dodecilsulfato de sodio (SDS) al 7%, NaPO₄ 0,5 M, EDTA 1 mM a 50°C con lavado en SSC 2X, SDS al 0,1% a 50°C, más deseablemente en dodecilsulfato de sodio (SDS) al 7%, NaPO₄ 0,5 M, EDTA 1 mM a 50°C con lavado en SSC 1X, SDS al 0,1% a 50°C, todavía más deseablemente en dodecilsulfato de sodio (SDS) al 7%, NaPO₄ 0,5 M, EDTA 1 mM a 50°C con lavado en SSC 0,5X, SDS al 0,1% a 50°C, preferiblemente en dodecilsulfato de sodio (SDS) al 7%, NaPO₄ 0,5 M, EDTA 1 mM a 50°C con lavado en SSC 0,1X, SDS 0,1% a 50°C, más preferiblemente en dodecilsulfato de sodio (SDS) al 7%, NaPO₄ 0,5 M, EDTA 1 mM a 50°C con lavado en SSC 0,1X, SDS 0,1% a 65°C. Las secuencias de la presente invención se pueden detectar usando todas las condiciones anteriores. Con el fin de definir la invención, se usan las condiciones muy restrictivas.

“Transformación” es un proceso para introducir un ácido nucleico heterólogo en una célula u organismo hospedante. En particular, “transformación” significa la integración estable de una molécula de ADN en el genoma de un organismo de interés.

“Transformado/transgénico/recombinante” se refiere a un organismo hospedante tal como una bacteria o una planta en la cual una molécula de ácido nucleico heteróloga se ha introducido. La molécula de ácido nucleico puede ser integrada establemente dentro del genoma del hospedante, o la molécula de ácido nucleico también puede estar presente como una molécula extracromosómica. Tal molécula extracromosómica puede ser autorreplicante. Se entiende que las células, tejidos o plantas transformadas engloban no solamente el producto final de un proceso de transformación, sino también la progenie transgénica de este. Un hospedante “no transformado”, “no transgénico”, o “no recombinante” se refiere a un organismo de tipo silvestre, por ejemplo una bacteria o planta, que no contiene la molécula de ácido nucleico heteróloga. Como se usa aquí, “transgénico” se refiere a una planta, célula vegetal, o multitud de células vegetales estructuradas o no estructuradas que tienen integrado, vía técnicas bien conocidas de manipulación genética e inserción génica, una secuencia de un ácido nucleico que representa un gen de interés dentro del genoma de la planta, y típicamente dentro de un cromosoma de un núcleo celular, mitocondria u otro orgánulo que contiene cromosomas, en una ubicación diferente a, o en un número de copias mayor que, aquel presente normalmente en la planta o célula vegetal nativa. Las plantas transgénicas resultan de la manipulación e inserción de las secuencias de ácido nucleico, en oposición a mutaciones de origen natural, para producir una planta de origen no natural o una planta con un genotipo de origen no natural. Las técnicas para transformación de plantas y células vegetales son bien conocidas en la técnica y pueden comprender por ejemplo electroporación, microinyección, transformación mediada por *Agrobacterium*, y transformación balística.

Se usa aquí la nomenclatura de bases de ADN y aminoácidos como se expone en 37 C.F.R. § 1.822.

Se describe aquí una línea mejorada genéticamente de maíz que produce la proteína de control de insectos, Cry3A055, y una enzima fosfomanosa isomerasa (PMI) que permite a la planta utilizar manosa como una fuente de carbono. Particularmente, se describe aquí un evento de maíz transgénico designado MIR604 que comprende un genotipo novedoso, así como composiciones y métodos para detectar ácidos nucleicos de este evento en una

- muestra biológica. Se describen además plantas de maíz que comprenden el genotipo MIR604, semillas transgénicas de las plantas de maíz, y métodos para producir una planta de maíz que comprende el genotipo MIR604 por cruzamiento de un maíz endogámico que comprende el genotipo MIR604 con él mismo u otra línea de maíz. Las plantas de maíz que comprenden el genotipo MIR604 como se describe aquí son útiles para controlar plagas de insectos coleópteros que incluyen *Diabrotica virgifera virgifera*, el gusano de raíz de maíz del oeste, *D. virgifera zea*, el gusano de raíz de maíz mejicano, y *D. longicornis barberi*, el gusano de raíz de maíz del norte. Las plantas de maíz que comprenden el genotipo MIR604 como se describe aquí también son capaces de utilizar manosa como una fuente de carbono.
- En un aspecto, se describe una molécula de ácido nucleico aislada que comprende al menos 10 o más (por ejemplo, 15, 20, 25, ó 50) nucleótidos contiguos de una secuencia de ADN heteróloga insertada dentro del genoma de planta de maíz del evento de maíz MIR604 y al menos 10 o más (por ejemplo, 15, 20, 25 ó 50) nucleótidos contiguos de un ADN de genoma de planta de maíz que flanquea el punto de inserción de una secuencia de ADN heteróloga insertada dentro del genoma de la planta de maíz del evento de maíz MIR604. También están incluidas las secuencias nucleotídicas que comprenden 10 o más nucleótidos de secuencia de inserto contigua del evento MIR604 y al menos un nucleótido de ADN de flanqueo del evento MIR604 adyacente a la secuencia de inserto. Tales secuencias nucleotídicas son de diagnóstico para evento MIR604. La amplificación de ácido nucleico de ADN genómico del evento MIR604 produce un amplicón que comprende tales secuencias nucleotídicas de diagnóstico.
- En otro aspecto, se describe una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia nucleotídica que comprende al menos una secuencia de unión del evento MIR604 seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 2, y sus complementos, en la que una secuencia de unión abarca la unión entre un casete de expresión heterólogo insertado dentro del genoma de maíz y el ADN del genoma de maíz que flanquea el sitio de inserción y es de diagnóstico para el evento.
- En otro aspecto, se describe un ácido nucleico aislado que liga una molécula de ADN heteróloga al genoma de la planta de maíz en el evento de maíz MIR604, que comprende una secuencia de desde alrededor de 11 hasta alrededor de 20 nucleótidos contiguos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 2, y sus complementos.
- En otro aspecto, se describe una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 4, y sus complementos.
- En un aspecto, se describe un amplicón que comprende una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 4, y sus complementos.
- En otro aspecto, se describen cebadores de secuencia de flanqueo para detectar el evento MIR604. Tales cebadores de secuencia de flanqueo comprenden una secuencia de ácido nucleico aislada que comprende al menos 10-15 nucleótidos contiguos de nucleótidos 1-801 de SEC ID NO: 3 (designada arbitrariamente aquí como la secuencia de flanqueo 5'), o sus complementos. En un subaspecto, los cebadores de secuencia de flanqueo se seleccionan del grupo que consiste en SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 8, SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 10, SEC ID NO: 11, SEC ID NO: 12, SEC ID NO: 13, SEC ID NO: 14, SEC ID NO: 15, y sus complementos.
- En otro aspecto, se describen cebadores de secuencia de flanqueo que comprenden al menos 10-15 nucleótidos contiguos de los nucleótidos 507-1570 de SEC ID NO: 4 (designada arbitrariamente aquí como la secuencia de flanqueo 3'), o sus complementos. En un aspecto, los cebadores de secuencia de flanqueo se seleccionan del grupo que consiste en SEC ID NO: 39, SEC ID NO: 40, SEC ID NO: 41, SEC ID NO: 42, SEC ID NO: 43, SEC ID NO: 44, SEC ID NO: 45, SEC ID NO: 46, y sus complementos.
- En todavía otro aspecto, se describe un par de cebadores polinucleotídicos que comprenden un primer cebador polinucleotídico y un segundo cebador polinucleotídico los cuales funcionan juntos en la presencia de un molde de ADN de evento de maíz MIR604 en una muestra para producir un amplicón de diagnóstico para el evento de maíz MIR604, en el que la primera secuencia de cebador es o es complementaria a un genoma de planta de maíz que flanquea el punto de inserción de una secuencia de ADN heteróloga insertada dentro del genoma de la planta de maíz del evento de maíz MIR604, y la segunda secuencia de cebador polinucleotídico es o es complementaria a la secuencia de ADN heteróloga insertada dentro del genoma de la planta de maíz del evento de maíz MIR604.
- En un subaspecto, el primer cebador polinucleotídico comprende al menos 10 nucleótidos contiguos de posición 1-801 de SEC ID NO: 3 o sus complementos. En un subaspecto adicional, el primer cebador polinucleotídico comprende la secuencia nucleotídica expuesta en SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 8, SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 10, SEC ID NO: 11, SEC ID NO: 12, SEC ID NO: 13, SEC ID NO: 14, SEC ID NO: 15, o sus complementos. En otro subaspecto, el primer cebador polinucleotídico comprende al menos 10 nucleótidos contiguos de posición 507-1570 de SEC ID NO: 4 o sus complementos. En otro subaspecto, el primer cebador polinucleotídico comprende la secuencia nucleotídica expuesta en SEC ID NO: 39, SEC ID NO: 40, SEC ID NO: 41, SEC ID NO: 42, SEC ID NO: 43, SEC ID NO: 44, SEC ID NO: 45, SEC ID NO: 46, o sus complementos. En todavía otro subaspecto, el segundo cebador polinucleotídico comprende al menos 10 nucleótidos contiguos de SEC ID NO: 57, SEC ID NO: 58, SEC ID

NO: 59, SEC ID NO: 60, SEC ID NO: 61, SEC ID NO: 62, SEC ID NO: 63, o sus complementos. En todavía un subaspecto adicional, el segundo cebador polinucleotídico comprende la secuencia nucleotídica expuesta en SEC ID NO: 16 hasta SEC ID NO: 38, o sus complementos.

5 En otro subaspecto, el primer cebador polinucleotídico, el cual se expone en SEC ID NO: 15, y el segundo cebador polinucleotídico el cual se expone en SEC ID NO: 28, funcionan juntos en presencia de un molde de ADN de evento de maíz MIR604 en una muestra para producir un amplicón de diagnóstico para el evento de maíz MIR604 como se describe en el Ejemplo 4. En otro subaspecto, el primer cebador polinucleotídico, el cual se expone en SEC ID NO: 45, y el segundo cebador polinucleotídico el cual se expone en SEC ID NO: 27, funcionan juntos en presencia de un molde de ADN de evento de maíz MIR604 en una muestra para producir un amplicón de diagnóstico para el evento de maíz MIR604 como se describe en el Ejemplo 4.

10 Por supuesto, es bien conocido dentro de la pericia en la técnica obtener secuencia adicional más externa en la secuencia genómica que flanquea cualquier extremo de las secuencias de ADN heterólogas insertadas para uso como una secuencia cebadora que se puede usar en tales pares de cebadores para amplificar las secuencias que son de diagnóstico para el evento MIR604. Para los fines de esta descripción, la frase "más externa en la secuencia genómica que flanquea cualquier extremo de las secuencias de ADN heterólogas insertadas" se refiere específicamente a un movimiento secuencial hacia afuera de los extremos de las secuencias de ADN heterólogas insertadas, los puntos en los cuales las secuencias de ADN insertadas son adyacentes a la secuencia de ADN genómico nativo, y externo en el ADN genómico del cromosoma particular en el que se insertaron las secuencias de ADN heterólogas. Preferiblemente, una secuencia cebadora que corresponde o es complementaria a una parte de la secuencia de inserto debería cebar el alargamiento transcripcional de una hebra naciente de ADN o ARN hacia la unión de secuencia de flanqueo más cercana. Consecuentemente, una secuencia cebadora que corresponde o es complementaria a una parte de la secuencia de flanqueo genómica debería cebar el alargamiento transcripcional de una hebra naciente de ADN o ARN hacia la unión de secuencia de flanqueo más cercana. Una secuencia cebadora puede ser, o puede ser complementaria a, una secuencia de ADN heteróloga insertada dentro del cromosoma de la planta, o una secuencia de flanqueo genómica. Un experto en la técnica podría reconocer fácilmente el beneficio de si una secuencia cebadora podría necesitar ser, o podría necesitar ser complementaria a, la secuencia como se expone dentro de la secuencia de ADN heteróloga insertada o como se expone en SEC ID NO: 3 o SEC ID NO: 4 dependiendo de la naturaleza del producto deseado a obtener a través del uso del conjunto anidado de cebadores destinados para uso en la amplificación de una secuencia de flanqueo particular que contiene la unión entre la secuencia de ADN genómico y la secuencia de ADN heteróloga insertada.

15 En otro aspecto, se describe un método para detectar la presencia de ADN que corresponde al evento MIR604 en una muestra biológica, en el que el método comprende: (a) poner en contacto la muestra que comprende ADN con una sonda que se hibrida en condiciones muy restrictivas con ADN genómico de evento de maíz MIR604 y que no se hibrida en condiciones muy restrictivas con ADN de una planta de maíz control; (b) someter la muestra y la sonda a condiciones de hibridación muy restrictivas; y (c) detectar la hibridación de la sonda al ADN. En un subaspecto, el amplicón comprende una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 4, y sus complementos.

20 En otro aspecto, se describe un método para detectar la presencia de un ADN que corresponde al evento MIR604 en una muestra biológica, en el que el método comprende: (a) poner en contacto la muestra que comprende ADN con una sonda que se hibrida en condiciones muy restrictivas con ADN genómico del evento de maíz MIR604 y que no se hibrida en condiciones muy restrictivas con ADN de una planta de maíz control; (b) someter la muestra y la sonda a condiciones de hibridación muy restrictivas; y (c) detectar la hibridación de la sonda al ADN. La detección puede ser por cualquier medio bien conocido en la técnica que incluye pero no se limita a fluorescente, quimioluminiscente, radiológico, inmunológico, u otra manera. En el caso en el cual la hibridación está destinada a ser usada como un medio para la amplificación de una secuencia particular para producir un amplicón el cual es de diagnóstico para el evento de maíz MIR604, la producción y detección del amplicón, mediante cualquier medio bien conocido en la técnica, está destinada para ser indicativa de la hibridación pretendida a la secuencia diana en la que se utiliza una sonda o cebador, o secuencias en las que se utilizan dos o más sondas o cebadores. El término "muestra biológica" está destinado a comprender una muestra que contiene o es sospechosa de contener un ácido nucleico que comprende entre cinco y diez nucleótidos en cualquier lado del punto en el cual uno o el otro de los dos extremos terminales de la secuencia de ADN heteróloga insertada contacta la secuencia de ADN genómica dentro del cromosoma en el cual la secuencia de ADN heteróloga fue insertada, en la presente también conocidas como las secuencias de unión. Además, la secuencia de unión comprende como mínimo dos nucleótidos: siendo esos el primer nucleótido dentro del ADN genómico de flanqueo adyacente y ligado covalentemente al primer nucleótido dentro de la secuencia de ADN heteróloga insertada.

25 En todavía otro aspecto, se describe un kit para detectar la presencia de ácidos nucleicos MIR604 en una muestra biológica, en el que el kit comprende al menos una molécula de ácido nucleico de suficiente longitud de nucleótidos contiguos homólogos o complementarios a una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 3, y SEC ID NO: 4, que funciona como un cebador o sonda de ADN específica para el evento MIR604, y otros materiales necesarios para hacer posible la hibridación o amplificación de ácido nucleico. Se puede usar una variedad de métodos de detección que incluyen TAQMAN (Perkin Elmer), amplificación térmica, reacción en cadena de ligasa, hibridación de southern, métodos de ELISA, y métodos de detección

colorimétricos y fluorescentes. En particular, la presente invención proporciona kits para detectar la presencia de la secuencia diana, esto es, al menos una de las uniones del ADN inserto con el ADN genómico de la planta de maíz en MIR604, en una muestra que contiene ácido nucleico genómico de MIR604. El kit se compone de al menos un polinucleótido capaz de unirse al sitio diana o sustancialmente adyacente al sitio diana y al menos un medio para detectar la unión del polinucleótido al sitio diana. El medio de detección puede ser fluorescente, quimioluminiscente, colorimétrico, o isotópico, y puede estar acoplado al menos con métodos inmunológicos para detectar la unión. También se imagina un kit el cual pueda detectar la presencia del sitio diana en una muestra, esto es, al menos una de las uniones del ADN inserto con el ADN genómico de la planta de maíz en MIR604, aprovechando dos o más secuencias polinucleotídicas que juntas son capaces de unirse a secuencias nucleotídicas adyacentes a o en alrededor de 100 pares de bases, o en alrededor de 200 pares de bases, o en alrededor de 500 pares de bases o en alrededor de 1000 pares de bases de la secuencia diana y que se pueden alargar entre sí para formar un amplicón el cual contiene al menos el sitio diana.

En otro aspecto, se describe un método para detectar proteína de evento MIR604 en una muestra biológica, comprendiendo el método: (a) extraer proteína de una muestra de tejido de evento de maíz MIR604; (b) ensayar la proteína extraída usando un método inmunológico que comprende anticuerpo específico para la proteína marcadora insecticida o seleccionable producida por el evento MIR604; y (c) detectar la unión de dicho anticuerpo a la proteína marcadora insecticida o seleccionable.

En otro aspecto, se describen una planta de maíz, o partes de la misma, que comprende el genotipo del evento transgénico MIR604, en la que el genotipo comprende la secuencia nucleotídica expuesta en SEC ID NO:1, SEC ID NO:2, SEC ID NO:3, SEC ID NO:4, o sus complementos. En un subaspecto, la planta de maíz procede de las líneas de maíz endogámico CG5NA58, CG5NA58A, CG3ND97, CG5NA01, CG5NF22, CG4NU15, CG00685, CG00526, CG00716, NP904, NP948, NP934, NP982, NP991, NP993, NP2010, NP2013, NP2015, NP2017, NP2029, NP2031, NP2034, NP2045, NP2052, NP2138, NP2151, NP2166, NP2161, NP2171, NP2174, NP2208, NP2213, NP2222, NP2275, NP2276, NP2316, BCTT609, AF031, H8431, 894, BUTT201, R327H, 2044BT, y 2070BT. Un experto en la técnica reconocerá, sin embargo, que el genotipo MIR604 se puede introducir en cualquier variedad vegetal que pueda procrearse con maíz, incluyendo especies de maíz salvajes.

En otro aspecto, se describe una planta de maíz que comprende al menos una primera y una segunda secuencia de ADN ligadas juntas para formar una secuencia nucleotídica contigua, en la que la primera secuencia de ADN está dentro de una secuencia de unión y comprende al menos alrededor de 11 nucleótidos contiguos seleccionados del grupo que consiste en nucleótidos 792-811 de SEC ID NO:3; nucleótidos 497-516 de SEC ID NO: 4; SEC ID NO: 5; SEC ID NO: 6; y sus complementos, en la que la segunda secuencia de ADN esta dentro de la secuencia de ADN de inserto heteróloga seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 57, SEC ID NO: 58, SEC ID NO: 59, SEC ID NO: 60, SEC ID NO: 61, SEC ID NO: 62, SEC ID NO: 63, y sus complementos; y en la que la primera y la segunda secuencias de ADN son útiles como cebadores o sondas nucleotídicas para detectar la presencia de secuencias de ácido nucleico del evento de maíz MIR604 en una muestra biológica. En un subaspecto, los cebadores nucleotídicos se usan en un método de amplificación de ADN para amplificar una secuencia de ADN diana a partir de ADN molde extraído de la planta de maíz, y la planta de maíz es identificable de otras plantas de maíz por la producción de un amplicón que corresponde a una secuencia de ADN que comprende SEC ID NO: 1 o SEC ID NO: 2.

Las plantas de maíz, como se describen aquí, pueden además caracterizarse además por que la digestión del ADN genómico de la planta con la endonucleasa de restricción *KpnI* da como resultado una única banda hibridante de *cry3A055* usando una sonda específica para *cry3A055* en condiciones muy restrictivas. En la presente se ejemplifica una sonda de *cry3A055* que comprende una secuencia nucleotídica expuesta en SEC ID NO: 56 o SEC ID 59.

Las plantas de maíz, como se describen aquí, pueden además caracterizarse además por que la digestión del ADN genómico de la planta con la endonucleasa de restricción *KpnI* da como resultado una única banda hibridante de *pmi* usando una sonda específica de *pmi* en condiciones muy restrictivas. En la presente se ejemplifica una sonda de *pmi* que comprende una secuencia nucleotídica expuesta en SEC ID NO: 62.

En un aspecto, se describe una planta de maíz, en la que el genotipo MIR604 confiere sobre la planta de maíz resistencia a los insectos o la capacidad para utilizar manosa. En un subaspecto, el genotipo que confiere resistencia a insectos sobre la planta de maíz comprende un gen *cry3A055*. En otro aspecto, el genotipo que confiere sobre la planta de maíz la capacidad de utilizar manosa comprende un gen *pmi*.

En una aspecto, se describe una muestra biológica derivada de una planta, tejido, o semilla de maíz de evento MIR604, en la que la muestra comprende una secuencia nucleotídica que es o es complementaria a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 1 y SEC ID NO: 2, y en la que la secuencia se detecta en la muestra usando un método de amplificación de ácido nucleico o hibridación de ácido nucleico. En un subaspecto, la muestra se selecciona de harina de maíz, jarabe de maíz, aceite de maíz, almidón de maíz, y cereales fabricados totalmente o en parte para contener productos de maíz.

En otro aspecto, se describe un extracto derivado de una planta, tejido, o semilla de maíz de evento MIR604, que comprende una secuencia nucleotídica que es o es complementaria a una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 1 y SEC ID NO: 2. En un subaspecto, la secuencia se detecta en el extracto

usando un método de amplificación de ácido nucleico o de hibridación de ácido nucleico. En otro subaspecto, la muestra se selecciona de harina de maíz, jarabe de maíz, aceite de maíz, almidón de maíz y cereales fabricados completamente o en parte para contener productos de maíz.

5 Aún en otro aspecto, se describe un método para producir una planta de maíz resistente a al menos una infestación de gusanos de raíz de maíz, que comprende: (a) cruzar sexualmente una primera planta de maíz progenitora con una segunda planta de maíz progenitora, en el que dicha primera o segunda planta de maíz progenitora comprende el ADN del evento de maíz MIR604, produciendo de ese modo una pluralidad de plantas de progenie de primera generación; (b) seleccionar una planta de progenie de primera generación que es resistente a al menos la infestación de gusanos de raíz del maíz; (c) autofecundar la planta de progenie de primera generación, produciendo
10 de ese modo una pluralidad de plantas de progenie de segunda generación; y (d) seleccionar de las plantas de progenie de segunda generación, una planta que es al menos resistente a la infestación de gusanos de raíz del maíz; en el que las plantas de progenie de segunda generación comprenden una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 1 y SEC ID NO: 2.

15 En otro aspecto, se describe un método para producir semillas de maíz híbridas, que comprende: (a) sembrar semillas de una primera línea de maíz endogámica que comprende una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 3, y SEC ID NO: 4, y semillas de una segunda línea endogámica que tiene un genotipo diferente; (b) cultivar las plantas de maíz que resultan de dicha siembra hasta el momento de la floración; (c) emasculas dichas flores de plantas de una de las líneas endogámicas de maíz; (d) cruzar sexualmente entre sí las dos líneas endogámicas diferentes; y (e) cosechar la semilla híbrida producida de
20 ese modo. En un subaspecto, la primera línea de maíz endogámica proporciona los progenitores femeninos. En otro subaspecto, la primera línea de maíz endogámica proporciona los progenitores masculinos. También se describe aquí la semilla híbrida producida por el método divisado, y plantas híbridas que se hacen crecer a partir de la semilla.

25 Un experto en la técnica reconocerá que el genotipo transgénico como se describe aquí se puede introgresar mediante reproducción en otras líneas de maíz que comprenden diferentes genotipos transgénicos. Por ejemplo, el maíz endogámico que comprende el genotipo transgénico como se describe aquí se puede cruzar con un maíz endogámico que comprende el genotipo transgénico del evento Bt11 resistente a lepidópteros, que se conoce en la técnica, produciendo de esta manera semillas de maíz que comprenden tanto el genotipo transgénico como se describe aquí como el genotipo transgénico Bt11. Los ejemplos de otros eventos transgénicos que pueden cruzarse
30 con un endogámico como se describe aquí incluyen los eventos tolerantes al glifosato GA21 y NK603, el evento MON802 resistente a insectos lepidópteros/tolerante a glifosato, el evento DBT418 resistente a lepidópteros, el evento DAS-06275-8 resistente a lepidópteros, el evento MS3 estéril masculino, el evento B16 tolerante a la fosfotricina, el evento MON 80100 resistente a insectos lepidópteros, los eventos T14 y T25 tolerantes a fosfotricina, el evento 176 resistente a insectos lepidópteros, y el evento MON863 resistente a coleópteros, todos los cuales se conocen en la técnica. Se reconocerá además que se pueden realizar otras combinaciones con el
35 genotipo transgénico como se describe aquí.

Un experto en la técnica también reconocerá que la semilla de maíz transgénico que comprende el genotipo transgénico como se describe aquí puede tratarse con diversas sustancias químicas de tratamiento de semillas, incluyendo insecticidas, para aumentar o sinergizar la actividad insecticida de la proteína Cry3A055. Por ejemplo, la
40 semilla de maíz transgénica como se describe aquí puede tratarse con el insecticida comercial Cruiser®. Tal combinación puede usarse para incrementar el espectro de actividad y para incrementar la eficacia de la proteína expresada y la sustancia química.

Reproducción

45 El genotipo transgénico como se describe aquí puede hacer introgresar en cualquier maíz endogámico o híbrido que usa las técnicas de reproducción reconocidas en la técnica. El objetivo de la reproducción vegetal es combinar en una variedad o híbrido único diversos rasgos deseables. Para cultivos de campo, estos rasgos pueden incluir resistencia a insectos y enfermedades, tolerancia a herbicidas, tolerancia al calor y la sequía, reducción del tiempo para maduración del cultivo, mayor rendimiento, y calidad agronómica mejorada. Con la cosecha mecánica de muchos cultivos, es importante la uniformidad de características de la planta tales como germinación y
50 establecimiento en reposo, velocidad de crecimiento, madurez, y altura de la planta y la mazorca.

Los cultivos de campo se reproducen a través de técnicas que aprovechan el método de polinización de la planta. Una planta se autopoliniza si el polen de una flor se transfiere a la misma u otra flor de la misma planta. Una planta se poliniza cruzadamente si el polen proviene de una flor en una planta diferente.

55 Las plantas que se han autopolinizado y seleccionado por tipo para muchas generaciones se vuelven homocigotas en casi todos los loci génicos, y producen una población uniforme de progenie de reproducción verdadera. Un cruzamiento entre dos líneas homocigóticas diferentes produce una población uniforme de plantas híbridas que pueden ser heterocigotas para muchos loci génicos. Un cruzamiento de dos plantas, cada una heterocigota en un número de loci génicos, producirá una población de plantas híbridas que difieren genéticamente y no serán uniformes.

El maíz se puede reproducir mediante técnicas tanto de autopolinización y como de polinización cruzada. El maíz tiene flores masculinas y femeninas separadas en la misma planta, localizadas sobre la panoja y la mazorca, respectivamente. La polinización natural ocurre en el maíz cuando el viento hace volar el polen desde las panojas hasta las sedas que sobresalen de las puntas de las mazorcas.

- 5 Un método fiable para controlar la fertilidad masculina en plantas ofrece la oportunidad de reproducción vegetal mejorada. Esto es especialmente cierto para desarrollo de híbridos de maíz, que se basa en algún tipo de sistema de esterilidad masculina. Existen varias opciones para controlar la fertilidad masculina disponibles para los cultivadores, tales como: emasculación (o despanojado) manual o mecánica, esterilidad masculina citoplásmica, esterilidad masculina genética, gametocidas y similares.
- 10 La semilla de maíz híbrido típicamente se produce por un sistema de esterilidad masculina que incorpora el despanojado manual o mecánico. Se plantan filas alternas de dos maíces endogámicos en un campo, y se eliminan las panojas que portan el polen de uno de los endogámicos (femenino). Siempre y cuando hay suficiente aislamiento de fuentes de polen de maíz externo, las mazorcas del endogámico despanojado serán fertilizadas solamente desde el otro endogámico (masculino), y la semilla que resulta es por lo tanto híbrida y formará plantas híbridas.
- 15 El proceso de despanojado laborioso, y ocasionalmente no fiable, puede ser evitado mediante el uso de uno de muchos métodos para conferir esterilidad masculina genética en la técnica, cada uno con sus propios beneficios e inconvenientes. Estos métodos usan una variedad de enfoques tales como suministrar a la planta un gen que codifica una sustancia citotóxica asociada con un promotor específico de tejido masculino, o un sistema no codificante en el que se identifica un gen crítico para la fertilidad y un no codificante para ese gen se inserta en la
- 20 planta (véase: Fabinjanski, et al., EPO 89/3010153.8 publicación nº 329.308 y solicitud PCT nº PCT/CA90/00037 publicada como WO 90/08828).

Desarrollo de líneas endogámicas de maíz

- El uso de endogámicos estériles masculinos es un y solo un factor en la producción de híbridos de maíz. Las técnicas de reproducción vegetal conocidas en la técnica y usadas en un programa de reproducción de planta de maíz incluyen, pero no se limitan a, selección recurrente, retrocruzamiento, reproducción de linaje, selección mejorada de polimorfismo de longitud de restricción, selección mejorada de marcador genético y transformación. El desarrollo de híbridos de maíz en un programa de reproducción de planta de maíz requiere, en general, el desarrollo de líneas endogámicas homocigotas, el cruzamiento de estas líneas, y la evaluación de los cruces. Los métodos de reproducción de linaje y reproducción por selección recurrente se usan para desarrollar líneas endogámicas de poblaciones de reproducción. Los programas de reproducción de planta de maíz combinan los antecedentes genéticos de dos o más líneas endogámicas u otras diferentes fuentes de germoplasma en conjuntos de reproducción a partir de los cuales se desarrollan nuevas líneas endogámicas por autofecundación y selección de fenotipos deseados. Los nuevos endogámicos se cruzan con otras líneas endogámicas, y los híbridos de estos cruces se evalúan para determinar cuál de ellos tiene potencial comercial. La reproducción vegetal y el desarrollo de híbridos, como se practica en un programa de reproducción de planta de maíz, son procesos caros y consumen tiempo.

- La reproducción de linaje comienza con el cruce de dos genotipos, cada uno de los cuales puede tener una o más características deseables que falta en el otro o que complementa al otro. Si los dos progenitores originales no proporcionan todas las características deseadas, se pueden incluir otras fuentes en la población de reproducción. En el método de linaje, las plantas superiores son autofecundadas y seleccionadas en generaciones sucesivas. En las generaciones subsiguientes, la condición heterocigota cede el paso a líneas homogéneas como resultado de la autopolinización y la selección. Típicamente en el método de reproducción de linaje, se practican cinco o más generaciones de autofecundación y selección: $F_1 \rightarrow F_2$; $F_2 \rightarrow F_3$; $F_3 \rightarrow F_4$; $F_4 \rightarrow F_5$; etc.

- La reproducción por selección recurrente, por ejemplo retrocruzamiento, se puede usar para mejorar una línea endogámica y un híbrido que se obtiene usando aquellos endogámicos. El retrocruzamiento se puede usar para transferir un rasgo deseable específico de un endogámico o fuente a un endogámico que carece de ese rasgo. Esto se puede lograr, por ejemplo, cruzando en primer lugar un endogámico superior (progenitor recurrente) a un endogámico donante (progenitor no recurrente), que porta el o los genes apropiados para el rasgo en cuestión. La progenie de este cruce se aparea luego nuevamente con el progenitor recurrente superior seguido de la selección en la progenie resultante para el rasgo deseado a transferir del progenitor no recurrente. Después de cinco o más generaciones de retrocruzamiento con selección del rasgo deseado, la progenie será homocigota para los loci que controlan la característica que se transfiere, pero será como el progenitor superior para esencialmente todos los otros genes. La última generación de retrocruzamiento es luego autofecundada para dar progenie de reproducción pura para el o los genes que se transfieren. Un híbrido desarrollado de endogámicos que contienen el o los genes transferidos es esencialmente el mismo que un híbrido desarrollado de los mismos endogámicos sin el o los genes transferidos.

Las líneas endogámicas de élite, esto es, líneas endogámicas homocigotas de reproducción pura, también se pueden usar como materiales de partida para poblaciones de reproducción o fuentes a partir de las cuales se desarrollan otras líneas endogámicas. Estas líneas endogámicas derivadas de líneas endogámicas élite pueden

desarrollarse usando los métodos de reproducción de linaje y de reproducción por selección recurrente descritos anteriormente. Como un ejemplo, cuando la reproducción de retrocruzamiento se usa para crear estas líneas derivadas en un programa de reproducción de planta de maíz, los endogámicos de élite se pueden usar como una línea parental o material de partida o población de fuente, y puede servir ya sea como el progenitor donante o recurrente.

Desarrollo de Híbridos de Maíz

Un híbrido de maíz de un solo cruce resulta del cruce de dos líneas endogámicas, cada una de las cuales tiene un genotipo que complementa el genotipo de la otra. La progenie híbrida de la primera generación se designa F_1 . En el desarrollo de híbridos comerciales en un programa de reproducción de planta de maíz, solamente se buscan las plantas de híbrido F_1 . Los híbridos F_1 preferidos son más vigorosos que sus progenitores endogámicos. Este vigor del híbrido, o heterosis, se puede manifestar en muchos rasgos poligénicos, que incluyen crecimiento vegetativo aumentado y rendimiento aumentado.

El desarrollo de un híbrido de maíz en un programa de reproducción de planta de maíz implica tres etapas: (1) la selección de plantas de varios conjuntos de germoplasma para cruces de reproducción inicial; (2) la autofecundación de las plantas seleccionadas a partir de los cruces de reproducción durante varias generaciones para producir una serie de líneas endogámicas, las cuales, aunque diferentes una de otra, se reproducen de verdad y son altamente uniformes; y (3) el cruce de las líneas endogámicas seleccionadas con diferentes líneas endogámicas para producir la progenie híbrida (F_1). Durante el proceso de reproducción en maíz, el vigor de las líneas disminuye. El vigor se restaura cuando dos líneas endogámicas diferentes se cruzan para producir la progenie híbrida (F_1). Una consecuencia importante de la homocigosidad y homogeneidad de las líneas endogámicas es que el híbrido entre un par definido de endogámicos siempre será el mismo. Una vez que los endogámicos que dan un híbrido superior se han identificado, la semilla híbrida se puede reproducir por un tiempo indefinido en tanto que se mantenga la homogeneidad de los progenitores endogámicos. Una gran parte del vigor del híbrido mostrado por los híbridos F_1 se pierde en la siguiente generación (F_2). Consecuentemente, la semilla de híbridos no se usa para plantar plantas madre.

La producción de semilla híbrida requiere la eliminación o inactivación del polen producido por el progenitor femenino. La eliminación o inactivación incompleta del polen proporciona el potencial de autopolinización. Esta semilla autopolinizada inadvertidamente puede ser cosechada no intencionadamente y se puede envasar con la semilla híbrida.

Una vez que se siembra la semilla, es posible identificar y seleccionar estas plantas autopolinizadas. Estas plantas autopolinizadas serán equivalentes genéticamente a la línea endogámica femenino usada para producir el híbrido.

Como es fácilmente manifiesto por un experto en la técnica, lo anterior es solamente algunas de las diversas formas mediante las cuales el endogámico descrito aquí se puede obtener por aquellos que buscan introgresar el genotipo transgénico como se describe aquí en otras líneas de maíz. Están disponibles otros medios, y los ejemplos anteriores son solamente ilustrativos.

EJEMPLOS

La invención además estará descrita con referencia a los siguientes ejemplos detallados. Estos ejemplos se proporcionan con fines ilustrativos solamente, y no están destinados para ser limitantes a menos que se especifique de otra manera. Las técnicas de ADN recombinante y clonación molecular estándar usadas aquí son bien conocidas en la técnica y se describen por Ausubel (ed.) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc. (1994); J. Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3d Ed., Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001); y por T. J. Silhavy, M. L. Berman, y L. W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984).

Ejemplo 1. Transformación y selección del evento MIR604.

El evento MIR604 fue producido por transformación mediada por Agrobacterium de la línea de maíz endogámico (*Zea mays*) A188. El callo embriogénico tipo I se transformó esencialmente como se describe en Negrotto et al., (Plant Cell Reports 19:798-803, 2000), incorporado en aquí como referencia, usando un fragmento de ADN de plásmido pZM26 (Figura 1). pZM26 contiene una secuencia nucleotídica que comprende casetes de expresión en tándem. El primer casete de expresión se compone de una secuencia de promotor MTL (Patente US 6.018.099) ligada operablemente a una secuencia codificante de *cry3A055* ligada además operablemente a una secuencia de poliadenilación y terminación de transcripción del extremo 3' de nopalina sintetasa. El segundo casete de expresión se compone de un promotor de ubiquitina de maíz (*ZmUblnt*) (Christensen et al., 1992 PMB 18:675) ligado operablemente a una secuencia codificante de *pmi* ligada además operablemente a una secuencia de poliadenilación y terminación de transcripción del extremo 3' de nopalina sintetasa.

Los embriones inmaduros se cortaron de mazorcas de 8-12 días y se enjuagaron con medio reciente en preparación para la transformación. Los embriones se mezclaron con la suspensión de células Agrobacterium que albergan el vector de transformación pZM26, se pusieron en torbellino durante 30 segundos, y se dejaron incubar durante unos

5 minutos adicionales. La disolución de *Agrobacterium* en exceso se aspiró, y los embriones se movieron entonces a placas que contienen un medio de cultivo no selectivo. Los embriones se cocultivaron con el *Agrobacterium* que queda a 22°C durante 2-3 días en la oscuridad. Los embriones se transfirieron a medio de cultivo suplementado con ticarcilina (100 mg/ml) y nitrato de plata (1,6 mg/l), y se incubaron en la oscuridad durante 10 días. Los embriones que producen callo embriogénico se transfirieron a medio de cultivo celular que contiene manosa.

Las plántulas regeneradas se evaluaron mediante análisis de PCR de TAQMAN® (véase el Ejemplo 2) en busca de la presencia de ambos genes *pmi* y *cry3A055*, así como la ausencia del gen de espectomicina de resistencia antibiótica (*Spec*). Las plantas positivas para ambos transgenes, y las negativas para el gen *spec*, se transfirieron al invernadero para la propagación posterior. Los eventos positivos se identificaron y se cribaron usando bioensayos de insectos contra gusano de raíz de maíz. Los eventos insecticidas se caracterizaron para determinar el número de copias mediante análisis de TAQMAN. El MIR604 se seleccionó para el análisis posterior basándose en que tiene una copia única de los transgenes, buena expresión proteica como se identifica mediante ELISA, y buena actividad insecticida contra gusano de raíz de maíz.

El T₀ MIR604 se retrocruzó con la línea de maíz endogámica CG00526, creando la población T₁. Las plantas T₁ se autofecundaron para crear la generación T₂, y este proceso se repitió para crear una generación T₃. La evaluación de progenie de las plantas T₃ se empleó para identificar familias homocigotas (convertidas). El endogámico CG00526 convertido de MIR604 se cruzó con otras líneas endogámicas de élite para crear híbridos usados en estudios posteriores

Ejemplo 2. Detección de MIR604 mediante PCR de TAQMAN

El análisis de TAQMAN se llevó a cabo esencialmente como se describe en Ingham et al. (Biotechniques, 31:132-140, 2001) incorporado aquí como referencia. Brevemente, el ADN genómico fue aislado de las hojas de plantas de maíz transgénicas y no transgénicas usando el kit de extracción de ADN genómico Puregene® (Gentra Systems, Minneapolis, MN) esencialmente de acuerdo con las instrucciones del fabricante, excepto que todas las etapas se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos de 1,2 ml. El pelete de ADN seco se volvió a suspender en disolución amortiguadora TE (Tris-HCl 10 Mm, pH 8,0, EDTA 1 mM).

Las reacciones de PCR de TAQMAN se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos. Para el control del gen de maíz endógeno, se diseñaron cebadores y sondas específicos para el gen de alcohol deshidrogenasa (*adh*) *Zea mays* (nº de acceso Genbank AF044295). Se reconocerá por la persona experta que otros genes de maíz se pueden usar como controles endógenos. Las reacciones se multiplexaron para amplificar simultáneamente *cry3A055* y *adh* o *pmi* y *adh*. Para cada muestra, se generó una mezcla maestra combinando 20 µl de ADN genómico extraído con 35 µl de 2x TAQMAN Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) suplementada con cebadores hasta una concentración final de 900 nM cada uno, sondas hasta una concentración final de 100 nM cada una, y agua hasta un volumen final de 70 µl. Esta mezcla se distribuyó en tres réplicas de 20 µl cada una en placas de amplificación de 96 pocillos y se sellaron con película de sellado por calor ópticamente transparente (Marsh Bio Products). La PCR se ejecutó en el instrumento ABI Prism 7700 usando los siguientes parámetros de amplificación: 2 min. a 50°C y 10 min. a 95°C, seguido de 35 ciclos de 15 s a 95°C y 1 min. a 60°C.

Los resultados del análisis de TAQMAN demostraron que el evento MIR604 tuvo una copia del gen *cry3A055* y una copia del gen *pmi*.

Ejemplos de combinaciones de secuencia cebadora/sonda apropiadas las cuales que se usaron son:

Nombre del cebador	Secuencia del cebador	SEC ID NO:
Cry3A055-directo	5'-TACGAGAGCTGGGTGAACCTTCA-3'	SEC ID NO: 47
Cry3A055-inverso	5'-CGATCAGGTCCAGCACGG-3'	SEC ID NO: 48
Cry3A055-sonda	5'-CCGCTACCGCCGCGAGATGA-3'	SEC ID NO: 49
(marcador 5' = FAM, marcador 3' = TAMRA)		
PMI-directo	5'-CCGGGTGAATCAGCGTTT-3'	SEC ID NO: 50
PMI-inverso	5'-GCCGTGGCCTTTGACAGT-3'	SEC ID NO: 51
PMI-sonda	5'-TGCCGCCAACGAATCACCGG-3'	SEC ID NO: 52
(marcador 5' = FAM, marcador 3' = TAMRA)		

Nombre del cebador	Secuencia del cebador	SEC ID NO:
ZmADH-267 directo	5'-GAACGTGTGTTGGGTTTGCAT-3'	SEC ID NO: 53
ZmADH-337 inverso	5'-TCCAGCAATCCTTGCACCTT-3'	SEC ID NO: 54
ZmADH-316 sonda	5'-TGCAGCCTAACCATGCGCAGGGTA-3'	SEC ID NO: 55

(marcador 5' = TET, marcador 3' = TAMRA)

Ejemplo 3. Detección de MIR604 por transferencia Southern

El ADN genómico usado para análisis de southern se aisló del tejido de hoja reunido de diez plantas que representan la generación seis de retrocruzamiento (BC6) de MIR604 usando esencialmente el método de Thomas et al., (Theor. Appl. Genet. 86:173-180, 1993), incorporado aquí como referencia. Todas las plantas usadas para aislar ADN se analizaron individualmente usando PCR de TAQMAN (como se describe en el Ejemplo 2) para confirmar la presencia de una sola copia del gen *cry3A055* y el gen *pmi*. Para los controles segregantes negativos, el ADN se aisló de tejido de hoja reunido de cinco plantas que representan la generación BC4 del evento MIR604. Estas plantas segregantes negativas se analizaron individualmente usando PCR de TAQMAN, y los ensayos fueron negativos para la presencia del gen *cry3A055* y el gen *pmi*, pero fueron, como se esperaba, positivos para el control interno del ensayo, el gen *adh* de maíz endógeno.

El análisis de Southern se llevó a cabo usando técnicas de biología molecular convencionales. EL ADN genómico (7,5 µg) se digirió con enzima de restricción *KpnI*, que tiene un sitio de reconocimiento único en el inserto de T-ADN de MIR604 de plásmido pZM26 (Figura 1). Este enfoque permite la determinación del número de copias de los elementos, que corresponden a la sonda específica usada para cada Southern, que se ha incorporado en MIR604. Esto da como resultado una banda de hibridación por copia del elemento presente en MIR604. Tras la electroforesis en gel de agarosa y transferencia alcalina a una membrana Nytran®, las hibridaciones se llevaron a cabo usando sondas generadas con PCR de longitud completa específicas del elemento. La sonda usada en las transferencias Southern de *cry3A055* y *pmi* comprende las secuencias nucleotídicas expuestas en SEC ID NO: 58 y SEC ID NO: 61, respectivamente. Las sondas se marcaron con ³²P vía cebado aleatorio usando el sistema Rediprime™ II (Amersham Biosciences, nº de catálogo RPN1633).

Se usaron las siguientes condiciones de hibridación muy restrictivas: 1-2 millones de cpm/ml se añaden a PerfectHyb (Sigma) suplementado con 100 µg/ml de ADN de timo de ternera (Invitrogen) precalentado a 65°C. La prehibridación tiene lugar en la misma disolución como anteriormente, a la misma temperatura durante la noche o durante al menos una hora. La hibridación se llevó a cabo a 65°C durante 3 horas seguido del lavado 2X en 2X SSC, SDS al 0,1% durante 20 minutos a 65°C y 2X en 0,1X SSC, SDS al 0,1% durante 20 minutos a 65°C.

En cada Southern se incluyeron tres muestras de control: (1) ADN de un segregante negativo (no transformado) usado para identificar cualesquiera secuencia de *Zea mays* endógenas que puedan hibridarse de forma cruzada con la sonda específica del elemento; (2) el ADN de un segregante negativo en el cual se introduce una cantidad de pZM26 digerido con *KpnI* que es igual a un número de copias basado en la longitud de la sonda, para demostrar la sensibilidad del experimento en la detección de una sola copia génica dentro del genoma de *Zea mays*; y (3) el plásmido pZM26 digerido con *KpnI* que es igual a un número de copias basado en la longitud de la sonda, como un control positivo para hibridación así como para demostrar la sensibilidad del experimento.

Los datos de hibridación proporcionan pruebas confirmatorias para apoyar el análisis de PCR de TAQMAN de que MIR604 contiene una sola copia de los genes *cry3A055* y *pmi*, y que MIR604 no contiene ninguna de las secuencias de soporte de vector presente en pZM26. Como se espera para ambas sondas *cry3A055* y *pmi*, la digestión de *KpnI* dio como resultado una única banda de hibridación del tamaño correcto, demostrando que una sola copia de cada gen está presente en el evento MIR604. Adicionalmente, para la sonda de soporte la carencia de hibridación demuestra la ausencia de cualquier secuencia de soporte de vector pZM26 que se incorporan en MIR604 durante el proceso de transformación.

Ejemplo 4. Secuenciación del inserto de T-ADN

La secuencia nucleotídica de todo el inserto de ADN transgénico presente en el evento MIR604 se determinó para demostrar la integridad global del inserto, la vecindad de los elementos funcionales, y para detectar cualesquiera cambio de pares de bases individuales. El inserto de MIR604 se amplificó mediante PCR a partir de ADN derivado de la generación BC5 como dos fragmentos solapantes individuales. Cada fragmento se amplificó usando un cebador polinucleotídico homólogo a secuencias genómicas vegetales que flanquean el inserto de MIR604, y un cebador polinucleotídico homólogo al gen *cry3A055*. Para generar el fragmento 5', se combinó un primer cebador polinucleotídico homólogo a la secuencia de flanqueo 5', 5'S1 (SEC ID NO: 15) con un segundo cebador polinucleotídico homólogo al ADN insertado dentro del gen *cry3A055*, 5'AS1 (SEC ID NO: 28). Para generar el fragmento 3', se combinó un primer cebador polinucleotídico homólogo a la secuencia de flanqueo 3', 9268AS (SEC

ID NO: 45), con un segundo cebador polinucleotídico homólogo al ADN insertado dentro del gen cry3A055, 5161S (SEC ID NO: 27).

5 La amplificación mediante PCR se llevó a cabo usando el sistema de PCR Expand High Fidelity (Roche, nº de catálogo 1732650), y los siguientes parámetros de amplificación: 2 minutos a 94°C durante 1 ciclo, seguido de 10 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 55-65°C y 5 minutos a 68°C, seguido de 20 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 55-65°C, y 5 minutos +5 segundos/ciclo de 72°C, seguido de 1 ciclo de 7 minutos a 72°C.

10 El amplicón que resulta de la amplificación mediante PCR usando la SEC ID NO: 15 y SEC ID NO: 28 comprendió la secuencia de unión 5' (SEC ID NO: 1). El amplicón que resulta de la amplificación mediante PCR usando SEC ID NO: 45 y SEC ID NO: 27 comprendió la secuencia de unión 3' (SEC ID NO: 2). Cada fragmento de secuenciación fue clonado individualmente en el vector pCR®-XL-TOPO (Invitrogen, nº de catálogo K4700-20), y se identificaron y secuenciaron tres clones distintos para cada fragmento. La secuenciación se llevó a cabo usando el analizador ABI3730XL usando química ABI BigDye® 1.1 o Big Dye 3.1 dGTP (para moldes ricos en GC). El análisis de secuencia se hizo usando el paquete Phred, Phrap, y Consed de la Universidad de Washington, y se llevó a cabo a una tasa de error menor que 1 en 10.000 bases (Ewing y Green, 1998). La secuencia de consenso final se determinó combinando los datos de secuencias de los seis clones individuales (tres para cada fragmento de secuenciación) para generar una secuencia de consenso del inserto MIR604. Para validar adicionalmente cualesquiera discrepancias de pares de bases individuales entre el inserto de MIR604 y el plásmido pZM26, los productos de PCR pequeños (aproximadamente 300-500 pb) específicos para cualquiera de las regiones en las que se observó una discrepancia de pares de bases en la secuencia de consenso inicial se amplificaron usando la misma metodología anterior. Para todas las discrepancias de pares de bases putativas en el inserto MIR604, la secuenciación directa del producto de PCR dio como resultado picos claros individuales en todos los pares de bases en cuestión, indicando que estas discrepancias están presentes probablemente en el inserto MIR604. El alineamiento se realizó usando el programa ClustalW con los siguientes parámetros: matriz de puntuación blosum55, penalización de apertura de salto 15, penalización de extensión de salto 6.66 (Thompson et al., 1994, Nucleic Acids Research, 22, 4673-4680).

15 Los datos de secuencia de consenso para el inserto de T-ADN de MIR604 demuestran que se han mantenido la integridad global del inserto y la contiguidad de los elementos funcionales en el inserto como se pretende en pZM26. El análisis de secuencia reveló que se produjo cierto truncamiento en los extremos de la frontera derecha (RB) (SEC ID NO: 57) y de la frontera izquierda (LB) (SEC ID NO: 62) del inserto de T-ADN durante el proceso de transformación que dio como resultado el evento MIR604. La porción RB del inserto de T-ADN se truncó en 44 pb, y el extremo LB del inserto de T-ADN se truncó en 43 pb. Estas supresiones no tienen efecto sobre la eficacia del inserto de T-ADN, y este fenómeno se ha observado previamente en transformación mediante *Agrobacterium* (Tinland y Hohn, 1995. Genetic Engineering, 17:209-229). Adicionalmente, se observaron tres cambios de pares de bases en el inserto de T-ADN de MIR604. Se produjo una discrepancia en el promotor MTL, una región reguladora que no codifica una proteína. Las dos discrepancias restantes se produjeron en la secuencia codificante de *pmi*, y dio como resultado dos cambios de aminoácidos; la valina en la posición 61 se ha sustituido por alanina (V61A), y la glutamina en la posición 210 se ha sustituido por histidina (Q210H). La alanina y la valina son ambas aminoácidos alifáticos que dan como resultado una sustitución conservativa. La sustitución de glutamina por histidina da como resultado la sustitución de un resto ácido por un resto básico.

40 **Ejemplo 5. Análisis de secuencia de ADN de flanqueo**

La secuencia de ADN del genoma de maíz que flanquea al ADN heterólogo insertado dentro del genoma de la planta de maíz del evento MIR604 se obtuvo usando tecnología OmniPlex™, esencialmente como se describe en Kamberov et al., (Proceedings of SPIE, Tools for Molecular Analysis and High-Throughput Screening, 4626:1-12, 2002), incorporado aquí como referencia.

45 Las secuencias de flanqueo y secuencias de unión 5' y 3' se confirmaron usando procedimientos de PCR estándar. Las secuencias de flanqueo y de unión 5' se confirmaron usando un primer cebador polinucleotídico expuesto en SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 8, SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 10, SEC ID NO: 11, SEC ID NO: 12 o SEC ID NO: 13, combinado con un segundo cebador polinucleotídico expuesto en SEC ID NO: 16 o SEC ID NO: 17. Las secuencias de flanqueo y de unión 3' se confirmaron usando un primer cebador polinucleotídico expuesto en SEC ID NO: 39, SEC ID NO: 40, SEC ID NO: 41, SEC ID NO: 42, SEC ID NO: 43 o SEC ID NO: 44, combinado con un segundo cebador polinucleotídico expuesto en SEC ID NO: 31, SEC ID NO: 32, SEC ID NO: 33, SEC ID NO: 34, SEC ID NO: 35 o SEC ID NO: 36. Se reconocerá por la persona experta que se pueden usar otras secuencias cebadoras para confirmar las secuencias de flanqueo y de unión.

55 Se encontró que el inserto de M1R604 está flanqueado en la frontera derecha (secuencia de flanqueo 5') por la secuencia genómica de maíz mostrada en SEC ID NO: 5, y está flanqueada en la frontera izquierda (secuencia de flanqueo 3') por la secuencia genómica de maíz mostrada en SEC ID NO: 6. La secuencia de unión 5' se expone en SEC ID NO: 1. La secuencia de unión 3' se expone en SEC ID NO: 2.

Ejemplo 6. Detección de la proteína MIR604 vía ELISA

5 Para caracterizar el intervalo de expresión de las proteínas Cry3A055 (el principio insecticida activo) y fosfomanosa isomerasa (PMI) (el marcador seleccionable) en plantas MIR604, se determinaron las concentraciones de proteína Cry3A055 y PMI mediante ELISA en varios tejidos vegetales y plantas completas en cuatro etapas de crecimiento (verticilo, antesis, madurez de la semilla y senescencia) en dos híbridos (MIR604-B y MIR604-C) y un endogámico (MIR604-A). Los híbridos fueron hemocigotos para los transgenes en el evento MIR604, mientras que el endogámico fue homocigoto para los transgenes.

10 Plantas completas y plantas individuales (excepto polen) se redujeron a un polvo fino mediante procesamiento usando un molinillo de café, una amasadora, una trituradora Grindomix™ (Brinkmann Instruments; Westbury, NY, USA), mortero con una mano de almirez, o un molino, o una combinación de estos dispositivos. Todo el procesamiento se realizó en presencia de hielo seco o de nitrógeno líquido. Las mezclas se mezclaron bien para asegurar la homogeneidad. La muestra de tejido vegetal completa, o una submuestra representativa, se retuvo para el análisis, permitiendo un tamaño de muestra suficiente para el almacenamiento de archivo de las muestras de tejido vegetal de reserva. Se determinó el porcentaje de peso seco de cada muestra, y las muestras procesadas se almacenaron a aprox. -80°C hasta liofilización.

15 Se extrajeron muestras recientes de tejido (excepto polen y ensilaje) y de planta completa. Para cada muestra analizada, se pesó una alícuota de 1,0 g del material reciente en polvo en un tubo de polipropileno de 15 ml, se suspendió en 3 ml de disolución amortiguadora de extracción [CAPS 50 mM, NaCl 0,1 M, EDTA 2 mM, ditiotritol 1 mM, fluoruro de 4-(l- aminoetil)benzenosulfonilo HCl 1 mM, leupeptina 1 mM, pH 10], y se extrajo usando un homogenizador Autogizer® (Tomtek; Hamden, CT, USA). Después de centrifugar durante 15 min. a 10.000 x g a 4°C, el sobrenadante se usó para el análisis de Cry3A055 y PMI mediante ELISA. Después del tratamiento con yodoacetamida como se describe por Hill y Straka (1988), la proteína total en los extractos se cuantificó usando el reactivo de ensayo de proteínas BCA™ (Pierce; Rockford, IL, USA).

25 Se prepararon extractos de polen suspendiendo polen 1:30 (p/v) en disolución amortiguadora de extracción. Después de 30 min. en hielo, las suspensiones de polen se disgregaron mediante tres pasadas a través de una cuba de presión francesa a aprox. 15.000 psi (1.054 kg/cm²), seguido de la centrifugación a 14.000 x g durante 5 min. a 4°C. Los análisis de Cry3A055 y PMI mediante ELISA se llevaron a cabo en los sobrenadantes como se describe más abajo. La proteína total se cuantificó como se describe anteriormente.

30 Los extractos de ensilaje se prepararon suspendiendo ensilaje 1:25 (p/v) en disolución amortiguadora de extracción 2X. Después de 30 min. en hielo, las suspensiones de ensilaje se extrajeron usando un homogeneizador Brinkmann Polytron® (Brinkmann; Westbury, NY, USA). Después de centrifugar durante 15 min. a 10.000 x g a 4°C, el sobrenadante se usó para el análisis de Cry3A055 y PMI mediante ELISA. La proteína total se cuantificó como se describe anteriormente.

Cuantificación de Cry3A055

35 Los extractos preparados como se describe anteriormente se analizaron cuantitativamente para determinar Cry3A055 mediante ELISA (Tijssen, 1985) usando anticuerpos policlonales de conejo anti-Cry3A055 purificados mediante inmunoadinidad y anticuerpos policlonales de cabra anti-Btt (Cry3A nativa de *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*) purificados mediante inmunoadinidad. El límite inferior de la cuantificación del ELISA de doble sándwich se estimó en base a la concentración más baja de proteína de referencia pura que se encuentra sobre la porción lineal de la curva patrón, el volumen máximo de un extracto de control que se podía analizar sin interferencia de fondo, y el peso correspondiente de la muestra que representó la alícuota.

40 Se detectaron niveles cuantificables de proteína Cry3A055 en todos los tejidos vegetales derivados de MIR604 analizados, excepto el polen. En la mayoría de los casos, los resultados se presentan como medias de las cinco muestras tisulares repetidas. Para ensilaje, se analizó una muestra; por lo tanto, no se pudo calcular ninguna media. Los niveles de las muestras de control estaban por debajo del límite de cuantificación para todas las etapas y tejidos.

45 A lo largo de todas las etapas de crecimiento, los niveles medios de Cry3A055 medidos en hojas, raíces y plantas oscilaron desde aprox. 3-23 µg/g de peso reciente (4-94 µg/g peso seco), aprox. 2-14 µg/g de peso reciente (7-62 µg/g de peso seco), y alrededor de 0,9-11 µg/g de peso reciente (3-28 µg/g de peso seco), respectivamente. Los niveles medios de Cry3A055 medidos en pepitas en la madurez de las semillas y senescencia oscilaron desde alrededor de 0,6-1,4 µg/g de peso reciente (0,8-2,0 µg de peso seco). Los niveles medios de Cry3A055 medidos en tejido sedoso en antesis estuvieron por debajo del límite inferior de cuantificación (LOQ), <0,1 µg/g de peso reciente (<1,0 µg/g de peso seco). Los niveles medios de Cry3A055 medidos en tejido sedoso en la madurez de semillas oscilaron desde alrededor de 0,6-1,9 µg/g de peso reciente (1-3 µg/g de peso seco). La proteína Cry3A055 no fue detectable en polen del endogámico MIR604-A o de los híbridos MIR604-B y MIR604-C [límite de detección (LOD) = 0,07 µg/g de peso reciente, 0,15 µg/g de peso seco].

55 Los niveles de Cry3A055 fueron generalmente similares entre híbridos para cada tipo de tejido en cada punto de tiempo. Para la línea endogámica, la expresión de Cry3A055 fue generalmente mayor que en los híbridos en hojas, raíces y plantas completas en las etapas de verticilo y antesis, y en raíces en la madurez de semillas. Los niveles de Cry3A055 medidos en tejidos de ensilaje fueron de media 2.5 µg/g de peso reciente (7,3 µg/g de peso seco) durante

15, 29 y 75 días. En comparación, el nivel de Cry3A055 medido en el material vegetal cortado antes del ensilaje (Día 0 previo al ensilaje) fue alrededor de 8 µg/g de peso reciente (20 µg/g de peso seco).

Cuantificación de PMI

5 Los extractos preparados como se describe anteriormente se analizaron cuantitativamente para determinar PMI mediante ELISA (Tijssen, 1985) usando anticuerpos policlonales de conejo purificados mediante Proteína A y anticuerpos policlonales de cabra purificados mediante inmunoafinidad, específicos para PMI. El límite inferior de cuantificación del ELISA de doble sándwich se estimó basándose en la concentración más baja de la proteína de referencia pura que se encuentra sobre la porción lineal de la curva patrón, el volumen máximo de un extracto de control que se pudo analizar sin interferencia de fondo, y el peso correspondiente de la muestra que representó la

10 alícuota.
La proteína PMI se detectó en la mayoría de los tejidos vegetales analizados derivados de MIR604, sin embargo a niveles bajos. En la mayoría de los casos, los resultados se presentan como medias de las cinco muestras tisulares repetidas. Para ensilaje, se analizó una réplica; por lo tanto, no se pudo calcular ninguna media. Los niveles de la muestra de control están por debajo del límite de cuantificación para todas las etapas y tejidos.

15 A lo largo de todas las etapas de la planta, los niveles medios de PMI medidos en hojas, raíces y plantas completas oscilaron desde indetectable (ND) hasta aprox. 0,4 µg/g de peso reciente (ND-2,1 µg/g de peso seco), por debajo del LOQ (<0,03 µg/g de peso reciente) hasta alrededor de 0,2 µg/g de peso reciente (<0,1 – 1,0 µg/g de peso seco), y por debajo del LOQ (<0,02 µg/g de peso reciente) hasta alrededor de 0,3 µg/g de peso reciente (<0,04 - 2 µg/g de peso seco), respectivamente. Los niveles medios de PMI medidos en pepitas en la madurez de semillas y senescencia

20 oscilaron desde debajo del LOQ (<0,06 µg/g de peso fresco) hasta alrededor de 0,4 µg/g de peso reciente (<0,07 – 0,5 µg/g de peso seco). Los niveles medios de PMI medidos en tejido sedoso en antesis y madurez de la semilla oscilaron desde debajo del LOQ (<0,1 µg/g de peso reciente) hasta alrededor de 0,8 µg/g de peso reciente (<0,2 – 6,8 µg/g de peso seco). PMI en polen osciló desde alrededor de 1,9 – 2,6 µg/g de peso reciente (3,9 – 5,2 µg/g de peso seco).

25 Los niveles de PMI fueron generalmente similares entre los genotipos endogámico e híbrido para cada tipo tisular en cada punto de tiempo. PMI no se pudo detectar en ensilaje en los tres tiempos de muestreo (día 15, 29 y 75), mientras que el nivel medido en el material vegetal cortado antes del ensilaje (Día 0 previo al ensilaje) fue alrededor de 0,3 µg/g de peso reciente (0,7 µg/g de peso seco).

Niveles de proteína Cry3A055 total estimados por acre y por hectárea

30 Para la línea endogámica (MIR604-A) y para ambos híbridos (MIR604-B y MIR604-C), las plantas alcanzaron su mayor biomasa en la madurez de las semillas. Las plantas también alcanzaron sus niveles medios de Cry3A055 estimados más elevados en una base por acre (y por hectárea) en la madurez de la semilla, y se estimó que contenían alrededor de 78, 141 y 240 g de Cry3A055/acre (193, 348 y 592 g/hectárea) para MIR604-A, MIR604-B y

Ejemplo 7. Eficacia en Campo de MIR604

40 Gusano de raíz de maíz del oeste y del norte

Las plantas MIR604 se ensayaron para determinar la eficacia frente al gusano de raíz de maíz occidental y del norte en 12 localizaciones en los Estados Unidos de América. MIR604 se ensayó con y sin la adición del tratamiento insecticida de semillas Cruiser®. Los grupos de control consistieron en semilla tratada con dos tasas diferentes de Cruiser® y un control no tratado. Los tratamientos consistieron en cuatro réplicas de dos filas de 17,5-20 pies (5,3-6,1 metros) separados 30" (76,2 cm) en el centro diseñado en un bloque completo aleatorizado. Se escogieron al azar diez plantas por tratamiento y se evaluaron en busca de la eficacia usando una escala de 0-3, en la que 0 = ningún daño de alimentación (la puntuación más baja que se puede dar); 1 = un nodo (círculo de raíces), o el equivalente de un nodo completo, comido en aproximadamente dos pulgadas (5 cm) del tallo (línea del suelo en el 7°

45 nodo); 2 = dos nodos completos comidos; 3 = tres o más nodos comidos (puntuación más elevada que se puede dar). El daño entre nodos completos comidos se anotó como el porcentaje del nodo perdido, es decir, 1,50 = 1 ½ nodos comidos, 0,25 = ¼ de un nodo comido.
Los resultados, mostrados en la Tabla 1, demuestran que las raíces de dos líneas fraternas de MIR604, 3-11 y 3-12, sostuvieron un daño de alimentación significativamente menor que las raíces del tratamiento con Cruiser® o las raíces del control no tratado. MIR04-3-11 y MIR6004-3-12 tuvieron puntuaciones de daño de la raíz de 0,44 y 0,42, respectivamente, en comparación con los tratamientos con Cruiser® de 0,25 y 1,25 mgA/semilla, que tuvieron puntuaciones de daño de 1,6 y 0,9, respectivamente, y la línea de control con una puntuación de daño de 2,14. Hubo

una tendencia hacia puntuaciones de daño de la raíz menores en las plantas MIR604, cuyas semillas se trataron con Cruiser®, sugiriendo que Cruiser® aumentó la proteína Cry3A055, o que hubo una posible sinergia entre Cruiser® y Cry3A055. Esto fue particularmente evidente en los tratamientos de semillas de 1,0 y 1,25 mgA/MIR604, con puntuaciones de daño de raíz de 0,33 y 0,29, respectivamente.

5 Tabla 1. Eficacia de MIR604 con y sin tratamiento de semillas Cruiser®

Línea de maíz	Tratamiento Cruiser® (mgA/Semilla)	Puntuación de daño a la raíz (Escala de 0-3 CRW)
MIR604-3-11	0	0,44
MIR604-3-12	0	0,42
MIR604	0,25	0,43
MIR604	0,50	0,39
MIR604	1,0	0,33
MIR604	1,25	0,29
Híbrido de control	0,25	1,60
Híbrido de control	1,25	0,99
Híbrido de control	0	2,14

La eficacia de MIR604 se comparó con patrones insecticidas granulares comerciales aplicados en el surco. El diseño experimental fue como se describe anteriormente. Los resultados en la Tabla 2 demuestran que la eficacia de MIR604 fue comparable a los patrones comerciales a la hora de proteger plantas frente al daño de alimentación del gusano de raíz de maíz.

10

Tabla 2. Comparación de la eficacia de MIR604 con insecticidas comerciales aplicados en el surco

Tratamiento	Puntuación de daño a la raíz (Escala de 0-3 CRW)
MIR604	0,43
Force® 3G	0,44
Aztec® 6.7G	0,32
Lorsban® 15 G	0,75
Control no tratado	2,14

Gusano de raíz de maíz mejicano

15

Las plantas MIR604 se evaluaron para determinar la resistencia al gusano de raíz de maíz mejicano en dos localizaciones en Tejas. El diseño experimental fue esencialmente el mismo como se describe anteriormente.

20

Los resultados mostrados en la Tabla 3 demuestran que ambos hermanos de MIR604 sostenían menos daño de alimentación que los controles no tratados. Hubo una respuesta positiva para el control de gusano de raíz de maíz mejicano cuando se añadió Cruiser a la semilla de MIR604. Fue evidente una clara respuesta a la tasa. Los resultados en la Tabla 4 demuestran que la eficacia de MIR604 fue comparable a los patrones comerciales a la hora de proteger las plantas frente al daño de alimentación de gusano de raíz de maíz mejicano.

Tabla 3. Eficacia de MIR604 con y sin tratamiento de semillas Cruiser frente a gusano de raíz de maíz mejicano.

Tratamiento	Tasa de Cruiser® (mgA/Semilla)	Puntuación de daño a la raíz (Escala de 0-3 CRW)
MIR604-3-11	0	1,14
	0,125	0,19
	0,25	0,18

Tratamiento	Tasa de Cruiser® (mgA/Semilla)	Puntuación de daño a la raíz (Escala de 0-3 CRW)
	0,50	0,09
	1,25	0,02
MIR604-3-12	0	0,68
	0,125	0,46
	0,25	0,18
	0,50	0,21
	1,25	0,04
Híbrido de control	0,125	1,59
	1,25	0,71
	0	2,76

Tabla 4. Eficacia de MIR604 en comparación con insecticidas comerciales aplicados en el surco frente a gusano de raíz de maíz mejicano

Tratamiento	Puntuación de daño a la raíz (Escala de 0-3 CRW)
MIR604	0,68
Force® 3G	0,66
Aztec® 6.7G	0,88
Lorsban® 15 G	0,81
Control no tratado	2,76

5 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Syngenta Participations AG

STEINER, Henry-York

CHEN, Eric

MEGHJI, Moez

10 <120> Evento de maíz MIR604

<130> 70227PCT

<160> 63

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

15 <211> 20

<212> ADN

<213> Zea mays

<220>

<221> característica diversa

20 <222> (1)..(24)

ES 2 539 110 T3

<223> union de genoma-inserto 5'
<400> 1
aattcaacag aaggcgggaa 20
<210> 2

5 <211> 20
<212> ADN
<213> Zea mays
<220>
<221> característica diversa

10 <222> (1)..(24)
<223> unión de inserto-genoma 3'
<400> 2
tgttattaag agttggtgt 20
<210> 3

15 <211> 1312
<212> ADN
<213> Zea mays
<220>
<221> característica diversa

20 <222> (1)..(1310)
<223> secuencia de genoma+inserto 5'
<400> 3
ccccgcgttt cgttgcccct ggccggtacc catttggcgc cgattctttt cttgcccccc 60
ggccggccgc tcgctcgccct ttggattcct ccaaagccgc tgatgggatg gtggcgaaca 120

ES 2 539 110 T3

cacccaccac ccgctcttgc ccaaagcgac ccggcacagg ccgcgccggc ttcactaacc 180
actagcgctt gtactaataa aatggtttct agcgtttggt gctctccttt ttcttttttc 240
gccggttctt cggagccgtg tggacactgg acagcgtoca gtccagcagg cataggggtg 300
tctcggcggc ggtcgtccga cgacgatcga tctccatgag attccgcgac aggccaggac 360
ggaaagctgg gcccttctca ccaattcgcg tcggagccgg aacaagattc cctcccccaa 420
tcatttcgac ggcctcttc ttcgccaccc ctcgtggcgg tgtttcgcgg ccggccctta 480
tctccttccc gtgacgcgtt cttttgtagc ttagcggcgg gcacgttgct aaccaggcta 540
gcttcgttcg tttttaatct gcctatcgag aagagaagaa aaattcgtcc atggggccac 600
ggcctcttct gcaggcattt ggcatgtgaa ggaacccgaa ccagtgaatg gagatggagc 660
gatgctgctc agatacgcag tcaaacctgc cggcgaaatt acggggggag ctggctggct 720
ggctggctgg acgccagatc acacatggat gacgcggcac ggcagctagc cgagcaggcg 780
ctctgcgcac gcaattcaac agaaggcggg aaacgacaat ctgatcatga gcggagaatt 840
aagggagtca cgttatgacc ccgcgccgat acgcgggaca agccgtttta cgtttggaac 900
tgacagaacc gcaacgctgc aggaattggc cgcagcggcc atttaaatca attgggcgcg 960
ccgaattcga gctcgttaca agcttgaca tgacaacaat tgtaagagga tggagaccac 1020
aacgatccaa caatacttct gcgacgggct gtgaagtata gagaagttaa acgccccaaa 1080
gccattgtgt ttggaathtt tagttattct atttttcatg atgtatcttc ctctaactg 1140
ccttaatttg caaatttggg ataactactg attgaaaata tatgtatgta aaaaaact 1200
aagcatattt ttgaagctaa acatgatggt atttaagaaa atatgttgtt aacagaataa 1260
gattaatata gaaatggaaa catctgtaaa ttagaatcat cttacaagct aa 1312

<210> 4

<211> 1570

<212> ADN

5 <213> Zea mays

<220>

<221> característica diversa

<222> (1)..(1570)

<223> secuencia de inserto +genoma 3'

10 <400> 4

ttgtggaaag gttctcagca gttacagctt aaaccgggtg aatcagcgtt tattgccgcc 60
aacgaatcac cggtgactgt caaaggccac ggccgtttag cgcgtgttta caacaagctg 120
taagagctta ctgaaaaaat taacatctct tgctaagctg ggagctcgat ccgtcgacct 180

ES 2 539 110 T3

gcagatcggt caaacatttg gcaataaagt ttcttaagat tgaatcctgt tgccgggtctt 240
 gcgatgatta tcatataaatt tctggtgaat tacgttaagc atgtaataat taacatgtaa 300
 tgcgatgacgt tatttatgag atgggttttt atgattagag tcccgaatt atacatttaa 360
 tacgcgatag aaaacaaaat atagcgcgca aactaggata aattatcgcg cgcggtgtca 420
 tctatgttac tagatctgct agccctgcag gaaatttacc ggtgcccggg cgccagcat 480
 ggcggtatcc gcaatgtggt attaagagtt ggtggtacgg gtactttaac taacgaggtg 540
 tgtcgcgcag cgctcctgca cggatgtage tttggattgc tggataatgt ctgcgcgaag 600
 cgtcgtatct atttatttat ttattacagc ctccaccgcc gtgcgtgctc cgtttcggat 660
 tataataaaa ctaataataa ataaaaaaat cggattaaag gatgtttccg aaataaagat 720
 ctccaccaca ggagcgaag aaaaaaaaaag agaaacgggc tatggagaaa tgggtgttgcg 780
 agtatacggc ggctcctcgc tcgtcggatc gacatgtaca aagtaggtgc acaaaaggca 840
 aagcaaaatc acctcatcaa agaccaaaag cggagcaaag aatcgatact aaatccacat 900
 gttttttttg ttctctgcta ctacgtgctg tgctgtgctg tgaagcacga ttagtacgtg 960
 tactcactct tgtcatattc tttttagtgt cttgtcacta gtcacatgga gtagcaacca 1020
 tggctggcga taccgcgat aataaaaaa aagagagagg gagtaataa ttagatactc 1080
 accattata aattataaaa ttttttagag tttgaatagg tagttcttgt atatttattt 1140
 atagacctc aagtttgtcc gcctctcgag agccgaactt tgttgcccat gcttccccgg 1200
 ctcaggtcat gccacctcct tcaccaaggg cacacggaag atctggtgaa gcttgtcatc 1260
 accccgcgcc cttcaaacat gtgaggatgc gtogtcgctg gcactagtag cactcattgt 1320
 aggcactact ttgacagttt cctccaaata tgtagtgagg aaacacttga acaacacggt 1380
 tgggattact tatgatgttt ggttngtcca tcaatgataa ttccttcttc ttgcttaatg 1440
 attggctcta gaaccgatac ttggcacatt tcatcaggaa gggcgcgatgc acnaatttaa 1500
 cctgttatcg atgttcoggt tcctaagttg aagaaaaca tggctaaca ttagcccatg 1560
 tgagcataac 1570

<210> 5

<211> 801

<212> ADN

5 <213> Zea mays

<220>

<221> característica diversa

<222> (1)..(801)

<223> secuencia de flanqueo 5'

10 <400> 5

ES 2 539 110 T3

```

ccccgcgttt cgttgccct ggccggtacc catttggegc cgattctttt cttgcccccc 60
ggccggccgc tcgctcgct ttggattctt ccaaagccgc tgatgggatg gtggcgaaca 120
caccaccac ccgtctttgc ccaaagcgac ccggcacagg ccgcgcggc ttcactaacc 180
actagcgctt gtactaataa aatggtttct agcgtttggt gctctccttt ttcttttttc 240
gccggttctt cggagccgtg tggacactgg acagcgtcca gtccagcagg catagggtgg 300
tctcggcggc ggtcgtccga cgaacatcga tctccatgag attccgcgac aggccaggac 360
ggaaagctgg gcccttctca ccaattcgcg tcggagccgg aacaagattc cctcccccaa 420
tcatttcgac gcgccctttc ttgccacccc ctcgtggccg tgtttcggcg ccggccotta 480
tctccttccc gtgacgcgtt cttttgtage ttagcggccg gcacgttget aaccaggcta 540
gcttcgttcg tttttaatct gcctatcgag aagagaagaa aaattcgtcc atggggccac 600
ggcctcttct gcaggcattt ggcattgtgaa ggaaccgaa ccagtgaatg gagatggacg 660
gatgctgctc agatacgcag tcaaacctgc cggcgaaatt acggggggag ctggctggct 720
ggctggctgg acgccagatc acacatggat gacgcggcac ggcagctagc cgagcaggcg 780
ctctgcgcac gcaattcaac a 801

```

<210> 6

<211> 1064

<212> ADN

5 <213> Zea mays

<220>

<221> característica diversa

<222> (1)..(1064)

<223> secuencia de flanqueo 3'

10 <400> 6

```

agttggtggt acgggtactt taactaacga ggtgtgtcgc gcagcgtcc tgcacggatg 60
tagctttgga ttgctggata atgtctcgcg caagcgtcgt atttatttat ttatttatta 120
cagcctccac ccgcgtgogt gctccgtttc ggattataat aaaactaata ttaaataaaa 180
aatcggatt aaaggatggt tccgaaataa agatctccac cacaggagcg aaagaaaaaa 240
aaagagaaac gggctatgga gaaatggtgt tgcgagtata cggcggctcc gtcgtcgtcg 300
gatcgacatg taaaaagtag gtgcacaaaa ggcaaagcaa aatcacctca tcaaagacca 360
aaagcggagc aaagaatcga tactaaatcc acatgttttt ttgtttcctg tctactacgt 420
gctgtgcttg tgcgtgaagc acgattagta cgtgtactca ctcttgtcat attcttttta 480
gtgtcttgtc actagtcaca tggagtagca accatggctg gcgataccg cgataaataa 540

```

ES 2 539 110 T3

aaaaaagaga gaggagtaa tatattagat actcaccat tataaattat aaaatatttt 600
 agagtttgaa taggtagttc ttgtatattt atttatagac cttcaagttt gtccgectct 660
 cgagagccga actttgttgc ccatgcttcc ccggtcagg tcatgccacc tccttcacca 720
 agggcacacg gaagatctgg tgaagcttgt catcaccocg cgccttcaa acatgtgagg 780
 atgcgctcgtc gctggcacta gtagcactca ttgtaggcac tactttgaca gtttctcca 840
 aatatgtagt gaggaaacac ttgaacaaca cgtttgggat tacttatgat gtttggttng 900
 tccatcaatg ataattcctt cttcttgctt aatgattggc tctagaaccg atacttggca 960
 catttcatca ggaagggcgc atgcacnaat ttaacctgtt atcgatgttc cggttcctaa 1020
 gttgaagaaa acaatggcta acaattagcc catgtgagca taac 1064

<210> 7

<211> 20

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador de MIR604(59)

<400> 7

cgctcgctt tggattctc 20

10 <210> 8

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> cebador de MIR604(60)

<400> 8

aagccgctga tgggatgt 19

<210> 9

<211> 24

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador de MIR604(54)

<400> 9

25 cgttcgtttt taatctgcct atcg 24

<210> 10

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador de MIR604(55)
<400> 10
aggcatttgg catgtgaagg aa 22
5 <210> 11
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
10 <223> cebador de MIR604(38)
<400> 11
atgtgaagga acccgaacca g 21
<210> 12
<211> 21
15 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> cebador de MIR604(39)
<400> 12
20 gtgaatggag atggacggat g 21
<210> 13
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
25 <220>
<223> cebador de MIR604 (51)
<400> 13
cagatcacac atggatgacg c 21
<210> 14
30 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> cebador de 604 SEN
35 <400> 14
gtgacgcgtt cttttgtagc 20
<210> 15

<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
5 <223> cebador de 5'S1
<400> 15
tgaatggaga tggacggatg ctg 23
<210> 16
<211> 23
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> cebador de MTL (11)
<400> 16
15 attagaatca tctacaagc taa 23
<210> 17
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
20 <220>
<223> cebador de MTL (10)
<400> 17
ctaagagatg ttcacgctt gag 23
<210> 18
25 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> cebador de MTL AS
30 <400> 18
gactcaacga aggctgctgc 20
<210> 19
<211> 20
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> cebador de WRSEN-1

<400> 19
gcatgtctct ggtcctcgt 20
<210> 20
<211> 20
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> cebador de WRAS-1
<400> 20
10 aggcacgcta tcggaggta 20
<210> 21
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
15 <220>
<223> cebador de WR-1
<400> 21
ggacatcgcc gaggctaca 20
<210> 22
20 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> cebador de WR-2
25 <400> 22
gatgtgcttc ctgatgcagg 20
<210> 23
<211> 20
<212> ADN
30 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> cebador de WRSEN-2
<400> 23
caagcaaata agacgacttg 20
35 <210> 24
<211> 20
<212> ADN

<213> Secuencia artificial
<220>
<223> cebador de WRAS-2
<400> 24
5 agcaccacca aggacgtgat 20
<210> 25
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
10 <220>
<223> cebador de WRSEN-3
<400> 25
tacaacagct tcaacctggc 20
<210> 26
15 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> cebador de WRAS-3
20 <400> 26
ccgtgaacta gatctgagct 20
<210> 27
<211> 22
<212> ADN
25 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> cebador de 5161S
<400> 27
tcaaccaata ctactcgac aa 22
30 <210> 28
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
35 <223> cebador de 5'AS1
<400> 28
acaagacat caacaagggc gac 23

<210> 29
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
5 <220>
<223> cebador de WRSEN-4
<400> 29
atcggcggtc cggccatgg tt 22
<210> 30
10 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> cebador de WRAS-4
15 <400> 30
ggaatcctgg gatggctcta 20
<210> 31
<211> 20
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> PMI-1
<400> 31
gatgtgcttc ctgatgcagg 20
25 <210> 32
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
30 <223> cebador de PMI-2
<400> 32
ctggaagtga tggcaaac 18
<210> 33
<211> 21
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>

<223> cebador de PMI(6)
<400> 33
cgctgcatga ccttagtgat a 21
<210> 34
5 <211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> cebador de PMI(7)
10 <400> 34
cgggtgaatc agcgttatt g 21
<210> 35
<211> 18
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> cebador de PMI(5)
<400> 35
ttgccgcaa cgaatcac 18
20 <210> 36
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
25 <223> cebador de PMI(16)
<400> 36
agtcccgcaa ttatacatTT aat 23
<210> 37
<211> 20
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> cebador de WRSEN-5
<400> 37
35 gaaaatgccg caggatccc 20
<210> 38
<211> 20

<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> cebador de WRAS-5
5 <400> 38
caggtgcaca tccggcgatt 20
<210> 39
<211> 20
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> cebador de MIR604(20)
<400> 39
gctcctgcac ggatgtagct 20
15 <210> 40
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
20 <223> cebador de MIR604(21)
<400> 40
gctttggatt gctggataat gtc 23
<210> 41
<211> 23
25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> MIR604 (31)
<400> 41
30 ccaccacagg agcgaagaa aaa 23
<210> 42
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
35 <220>
<223> cebador de MIR604(30)
<400> 42

gggctatgga gaaatggtg tg 22

<210> 43

<211> 19

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador de MIR604(40)

<400> 43

cttcaccaag ggcacacgg 19

10 <210> 44

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> cebador de MIR604(41)

<400> 44

atgtgaggat gcgtcgtcg 19

<210> 45

<211> 20

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador de 9268AS

<400> 45

25 cacggatgta gctttggatt 20

<210> 46

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> cebador de WRAS-6

<400> 46

tccaccacag gagcgaaaga 20

<210> 47

35 <211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> TaqMan cry3A055-directo
<400> 47
atcgagagct ggggaactt ca 22
5 <210> 48
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
10 <223> TaqMan cry3A055-inverso
<400> 48
cgatcaggtc cagcacgg 18
<210> 49
<211> 20
15 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> TaqMan cr3A055-sonda
<400> 49
20 ccgctaccgc cgcgagatga 20
<210> 50
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
25 <220>
<223> TaqMan pmi-directo
<400> 50
cgggtgaat cagcgttt 18
<210> 51
30 <211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> TaqMan pmi-reverse
35 <400> 51
gccgtggcct ttgacagt 18
<210> 52

<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
5 <223> TaqMan pmi-sonda
<400> 52
tgccgccaac gaatcaccgg 20
<210> 53
<211> 21
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> cebador de ZmADH-267
<400> 53
15 gaacgtgtgt tgggttgca t 21
<210> 54
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
20 <220>
<223> cebador de ZmADH-337
<400> 54
tccagcaatc cttgcacctt 20
<210> 55
25 <211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> sonda de ZmADH-316
30 <400> 55
tgcagcctaa ccatgcgag ggta 24
<210> 56
<211> 779
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> sonda de MIR604

<400> 56

```

ggacategcc gagttctaca agcgccagct gaagctgacc caggagtaca cggaccactg      60
cgtgaagtgg tacaacgtgg gtctagacaa gctccgcggc agcagctacg agagctgggt      120
gaacttcaac cgctaccgcc gcgagatgac cctgaccgtg ctggacctga tcgccctggt      180
ccccctgtac gacgtgagcc tgtaccccaa ggaggtgaag accgagctga ccgcgacgt      240
gctgaccgac cccatcgtgg gcgtgaacaa cctgcgcggc tacggcacca ccttcagcaa      300
catcgagaac tacatccgca agccccacct gttcgactac ctgcaccgca tccagttcca      360
cacgcgtttc cagccccggt actacggcaa cgacagcttc aactactgga gcggcaacta      420
cgtgagcacc cgccccagca tcggcagcaa cgacatcacc accagcccct tctacggcaa      480
caagagcagc gagcccgtgc agaaccttga gttcaacggc gagaaggtgt accgcccgt      540
ggctaacacc aacctggccg tgtggccctc tgcagtgtac agcggcgtga ccaaggtgga      600
gttcagccag tacaacgacc agaccgacga ggccagcacc cagacctacg acagcaagcg      660
caacgtgggc gccgtgagct gggacagcat cgaccagctg ccccccgaga ccaccgacga      720
gcccctggag aagggctaca gccaccagct gaactacgtg atgtgcttcc tgatgcagg      779

```

<210> 57

<211> 183

5 <212> ADN

<213> Agrobacterium tumifaciens

<220>

<221> característica diversa

<222> (1)..(183)

10 <223> Región de frontera derecha

<400> 57

```

gaaggcggga aacgacaatc tgatcatgag cggagaatta agggagtcac gttatgacc      60
ccgccgatga cgccgggacaa gccgttttac gtttggaaact gacagaaccg caacgctgca      120
ggaattggcc gcagcggcca tttaaatcaa ttgggcgcgc cgaattcgag ctccgtacaa      180
gct                                                                                   183

```

<210> 58

15 <211> 2556

<212> ADN

<213> Zea mays

<220>

<221> característica diversa

20 <222> (1)..(2556)

<223> promotor MTL

<400> 58

ES 2 539 110 T3

tgacacatgac aacaattgta agaggatgga gaccacaacg atccaacaat acttctgcga	60
cgggctgtga agtatagaga agttaaacgc ccaaaagcca ttgtgtttgg aatTTTTtagt	120
tattctattt ttcatgatgt atcttctctt aacatgcctt aatTTGcaaa tttggtataa	180
ctactgattg aaaatatatg tatgtaaaaa aatactaagc atatTTTTga agctaaacat	240
gatgttattt aagaaaatat gttgttaaca gaataagatt aatatcgaaa tggaaacatc	300
tgtaaattag aatcatctta caagctaaga gatgttcacg ctttgagaaa cttcttcaga	360
tcatgacagt agaagtagct ctccaagact caacgaaggc tgctgcaatt ccacaaatgc	420
atgacatgca tcttgtaac cgtcgtcgcc gctataaaca cggataactc aattccctgc	480
tccatcaatt tagaaatgag caagcaagca cccgatcgct caccocatat gcaccaatct	540
gactcccaag ctctgtttcg cattagtacc gccagcactc cacctatage taccaattga	600
gacctttcca gcctaagcag atcgattgat cgttagagtc aaagagttgg tggtaggggt	660
actttaacta ccatggaatg atggggcgtg atgtagagcg gaaagcgcct ccctacgcgg	720
aacaacacc tcgccatgcc gctcgactac agcctcctcc tcgtcggcgc cacaacgagg	780
gagcccgtgg tcgcagccac cgaccagcat gtctctgtgt cctcgtccga cctcgacatg	840
tcatggcaaa cagtccgacg ccagcaccag actgacgaca tgagtctctg aagagcccgc	900
cacctagaaa gatccgagcc ctgctgctgg tagtggtaac cattttcgtc gcgctgacgc	960
ggagagcgag aggccagaaa tttatagcga ctgacgctgt ggcaggcacg ctatcggagg	1020
ttacgacgtg ggggtcact cgacgcggag ttcacaggtc ctatccttgc atcgtcggc	1080
gcgagttta cggggactta tccttacgac gtgctctaag gttgcgataa cgggcggagg	1140
aaggcgtgtg gcgtcggag acggtttata cacgtagtgt gcgggagtgt gtttcgtaga	1200
cgcgggaaa cagcagcact tacgaaggtt agtggaggag gaggacacac taaaatcagg	1260
acgcaagaaa ctctctatt atagtagtag agaagagatt ataggagtgt gggttgatto	1320

ES 2 539 110 T3

taaagaaaat cgacgcagga caaccgtcaa aacgggtgct ttaatatagt agatatatat 1380
 atatagagag agagagaaaag tacaaaggat gcattttgtgt ctgcatatga tccggagtatt 1440
 actaacggcc gtcgtaagaa ggtccatcat gcgtggagcg agcccatttg gttggttgtc 1500
 aggccgcagt taaggcctcc atatatgatt gtcgtcgggc ccataacagc atctcctcca 1560
 ccagtttatt gtaagaataa attaagtaga gatatttgct gtcgggcaga agaaacttgg 1620
 acaagaagaa gaagcaagct aggccaatth cttgcocggca agaggaagat agtggcctct 1680
 agtttatata tccggcgtgat gatgatgctc cttagctagaa atgagagaag aaaaacggac 1740
 gcgtgtttg gttgtgtcaa tggcgtccat ccttccatca gatcagaacg atgaaaaagt 1800
 caagcacggc atgcatagta tatgtatagc ttgttttagt gtggccttgc tgagacgaat 1860
 gaaagcaacg gccggcatat ttttcagtgg ctgtagcttt caggctgaaa gagacgtggc 1920
 atgcaataat tcaggaatt cgtcagccaa ttgaggtagc tagtcaactt gtacattggt 1980
 gcgagcaatt ttccgcactc aggagggcta gtttgagagt ccaaaaacta taggagatta 2040
 aagaggctaa aatcctctcc ttatttaatt taaataagt agtgtatttg tattttaact 2100
 cctccaacc ttccgatttt atggtctca aactagcatt cagtctaatt catgcatgct 2160
 tggctagagg tgcgtatgggg ttgttaatag catagctagc tacaagttaa ccgggtcttt 2220
 tatatttaat aaggacaggc aaagtattac ttacaaataa agaataaagc taggacgaac 2280
 tgctggatta ttactaaatc gaaatggacg taatattcca ggcaagaata attgttcgat 2340
 caggagacaa gtggggcatt ggaccggctc ttgcaagcaa gagcctatgg cgtggtgaca 2400
 cggcgcgttg cccatacatc atgcctccat cgatgatcca tctcacttg ctataaaaag 2460
 aggtgtccat ggtgtcaag ctcagccaag caaataagac gacttgtttc attgattcct 2520
 caagagatcg agcttctttt gcaccacaag gtcgag 2556

<210> 59

<211> 1797

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> gen cry3A055

<400> 59

atgacggccg acaacaacac cgaggccctg gacagcagca ccaccaagga cgtgatccag 60
 aaggcatca gcgtggtggg cgacctgctg ggcgtggtgg gcttcccctt cggcggcgcc 120
 ctggtgagct tctacaccaa cttcctgaac accatctggc ccagcgagga cccctggaag 180
 gccttcatgg agcaggtgga ggcctgatg gaccagaaga tcgccgacta cgccaagaac 240

ES 2 539 110 T3

aaggcactgg cegagctaca gggcctccag aacaacgtgg aggactatgt gagcgccctg 300
 agcagctggc agaagaacct cgetgcaccg ttccgcaacc cccacagcca gggccgcatc 360
 cgcgagctgt tcagccaggc cgagagccac ttccgcaaca gcatgcccag cttcgccatc 420
 agcggctacg aggtgctggt cctgaccacc tacgcccagg ccgccaacac ccacctgttc 480
 ctgctgaagg acgccccaat ctacggagag gagtggggct acgagaagga ggacatcgcc 540
 gagttctaca agcggcagct gaagctgacc caggagtaca ccgaccactg cgtgaagtgg 600
 tacaacgtgg gtctagacaa gctccgcggc agcagctacg agagctgggt gaacttcaac 660
 cgetaccgcc gcgagatgac cctgaccgtg ctggacctga tcgccctgtt ccccctgtac 720
 gagctgcgcc tgtaccctaa ggaggtgaag accgagctga cccgcgacgt gctgaccgac 780
 cccatcgtgg gcgtgaacaa cctgcgcggc tacggcacca ccttcagcaa catcgagaac 840
 tacatccgca agccccacct gttcgactac ctgcaccgca tccagttcca cacgcgtttc 900
 cagcccggct actacggcaa cgacagcttc aactactgga ggggcaacta cgtgagcacc 960
 cgccccagca tcggcagcaa cgacatcacc accagcccct tctacggcaa caagagcagc 1020
 gagcccgtgc agaaccttga gttcaacggc gagaaggtgt accgcgccgt ggctaacacc 1080
 aacctggccg tgtggccctc tgcagtgtac agcggcgtga ccaaggtgga gttcagccag 1140
 tacaacgacc agaccgacga ggccagcacc cagacctacg acagcaagcg caacgtgggc 1200
 gccgtgagct gggacagcat cgaccagctg cccccgaga ccaccgacga gccctggag 1260
 aagggttaca gccaccagct gaactacgtg atgtgcttcc tgatgcaggg cagccgcggc 1320
 accatccccg tgctgacctg gaccacaag agcgtogact tcttcaacat gatcgacagc 1380
 aagaagatca cccagctgcc cctggtgaag gcctacaagc tccagagcgg cgccagcgtg 1440
 gtggcaggcc cccgcttcac cggcggcgac atcatccagt gcaccgagaa cggcagcgc 1500
 gccaccatct acgtgacccc cgacgtgagc tacagccaga agtaccgcgc ccgcatccac 1560
 tacgccagca ccagccagat caccttcacc ctgagcctgg acggggcccc cttcaaccaa 1620
 tactacttcg acaagacct caacaagggc gacaccctga cctacaacag cttcaacctg 1680
 gccagcttca gcaccccttt cgagctgagc ggcaacaacc tccagatcgg cgtgaccggc 1740
 ctgagcgcgc gcgacaaggt gtacatcgac aagatcgagt tcatccccgt gaactag 1797

<210> 60

<211> 253

<212> ADN

5 <213> Agrobacterium tumifaciens

<220>

<221> característica diversa

<222> (1)..(253)

<223> terminador NOS

10 <400> 60

ES 2 539 110 T3

gatcgttcaa acatttgga ataaagtffc ttaagattga atcctgttgc cggctctgcg 60
atgattatca tataatttct gttgaattac gttaagcatg taataattaa catgtaatgc 120
atgacgttat ttatgagatg ggtttttatg attagagtcc cgcaattata catttaatac 180
gcgatagaaa acaaaatata gcgcgcaaac taggataaat tatcgcgcgc ggtgtcatct 240
atgttactag atc 253

<210> 61

<211> 1993

<212> ADN

5 <213> Zea mays

<220>

<221> característica diversa

<222> (1)..(1993)

<223> promotor ZmUblnt

10 <400> 61

ctgcagtgca gcgtgacccg gtcgtgcccc tctctagaga taatgagcat tgcattgtcta 60
agttataaaa aattaccaca tatttttttt gtcacacttg tttgaagtgc agtttatcta 120
tctttataca tatattttaa ctttactcta cgaataatat aatctatagt actacaataa 180
tatcagtggt ttagagaatc atataaatga acagttagac atggtctaaa ggacaattga 240
gtattttgac aacaggactc tacagtttta tctttttagt gtgcattgtt tctccttttt 300
ttttgcaaat agcttcacct atataaactc tcaccattt tattagtaca tccatttagg 360
gtttaggggt aatggttttt atagactaat ttttttagta catctatttt attctatttt 420
agcctctaaa ttaagaaaac taaaactcta ttttagtttt tttatttaat aatttagata 480
taaaatagaa taaaataaag tgactaaaaa ttaacaaaat accctttaag aaattaaaaa 540
aactaaggaa acatttttct tgtttcgagt agataatgcc agcctgtaa acgccgtcga 600
cgagtctaac ggacaccaac cagcgaacca gcagcgtcgc gtcgggcaa gcgaagcaga 660
cggcacggca tctctgtcgc tgcctctgga cccctctcga gagttccgct ccaccgttgg 720
acttgctcgg ctgtcggcat ccagaaattg cgtggcggag cggcagacgt gagccggcac 780
ggcaggcggc ctcctctcc tctcaggca cggcagcta cgggggatc ctttcccacc 840
gctccttcgc tttccctcc tcgcccgcg taataaatag acacccctc cacaccctc 900
ttcccacc tcgtgtgtt cggagcgcac acacacaaa ccagatctcc cccaaatcca 960

ES 2 539 110 T3

cccgtcggca cctccgcttc aaggtagcc gctcgtcctc ccccccccc cctctctacc 1020
 ttctctagat cggcgttccg gtccatgggt agggccccgt agttctactt ctgttcatgt 1080
 ttgtgttaga tccgtgtttg tgtagatcc gtgctgctag cgttcgtaca cggatcgcac 1140
 ctgtacgtca gacacgttct gattgctaac ttgccagtgt ttctctttgg ggaatcctgg 1200
 gatggctcta gccgttccgc agaocgggac gatttcatga ttttttttgg ttcgttgcat 1260
 agggtttggg ttgccctttt cctttatttc aatatatgcc gtgcacttgt ttgtcgggtc 1320
 atcttttcat gctttttttt gtcttggttg tgatgatgtg gtctggttgg gcggtcgttc 1380
 tagatcggag tagaattctg tttcaaacta cctgggtggat ttattaattt tggatctgta 1440
 tgtgtgtgcc atacatattc atagttacga attgaagatg atggatggaa atacgatct 1500
 aggataggta tacatgttga tgcgggtttt actgatgcat atacagagat gctttttggt 1560
 cgcttggttg tgatgatgtg gtgtggttgg gcggtcgttc attcgttcta gatcggagta 1620
 gaatactggt tcaaactacc tgggtgattt attaattttg gaactgtatg tgtgtgtcat 1680
 acatcttcat agttacgagt ttaagatgga tggaaatata gatctaggat aggtatacat 1740
 gttgatgtgg gttttactga tgcataata tgatggcata tgcagcatct attcatatgc 1800
 tctaaccttg agtacctatc tattataata aacaagtatg ttttataatt attttgatct 1860
 tgatatactt ggatgatggc atatgcagca gctatatgtg gattttttta gccctgcctt 1920
 catacgtat ttatttgett ggtactgttt cttttgtcga tgctcaccct gttgtttggg 1980
 gttacttctg cag 1993

<210> 62

<211> 1176

<212> ADN

5 <213> E. coli

<220>

<221> característica diversa

<222> (1)..(1176)

<223> gen pmi

10 <400> 62

atgcaaaaac tcattaactc agtgcaaaaac tatgcctggg gcagcaaaaac ggcgttgact 60
 gaactttatg gtatggaaaa tccgtccagc cagccgatgg ccgagctgtg gatgggcgca 120
 catccgaaaa gcagttcacc agtgcagaat gccgccggag atatcgtttc actgcgtgat 180
 gtgattgaga gtgataaate gactctgctc ggagaggccg ttgccaaaac ctttggcgaa 240
 ctgcctttoc tgttcaaagt attatgcgca gcacagccac tctccattca ggttcatcca 300
 aacaaacaca attctgaaat cggttttgcc aaagaaaatg ccgcaggtat cccgatggat 360

ES 2 539 110 T3

gcccgcgagc gtaactataa agatcctaac cacaagccgg agctggtttt tgcgctgacg 420
 cctttccttg cgatgaacgc gtttcgtgaa ttttccgaga ttgtctccct actccagccg 480
 gtcgcagggtg cacatccggc gattgctcac tttttacaac agcctgatgc cgaacgttta 540
 agcgaactgt tcgccagcct gttgaatatg caggggtgaag aaaaatcccg cgcgctggcg 600
 attttaaaat cggccctcga tagccagcag ggtgaaccgt ggcaaacgat tcgtttaatt 660
 tctgaatfff acccggaaga cagcggctctg ttctcccgcg tattgctgaa tgtggtgaaa 720
 ttgaaccctg gcgaagcgat gttcctgttc gctgaaacac cgcacgetta cctgcaaggc 780
 gtggcgctgg aagtgatggc aaactccgat aacgtgctgc gtgcgggtct gacgcctaaa 840
 tacattgata ttccggaact ggttgccaat gtgaaattcg aagccaaaacc ggctaaccag 900
 ttgttgacct agccggtgaa acaagggtgca gaactggact tcccgatcc agtggatgat 960
 tttgccttct cgtgcgatga ccttagtgat aaagaaacca ccattagcca gcagagtgcc 1020
 gccatfffgt tctgcgtcga aggcgatgca acgttgtgga aaggttctca gcagttacag 1080
 cttaaaccgg gtgaatcagc gtttattgcc gccaacgaat caccgggtgac tgtcaaaggc 1140
 cacggccggt tagcgcgtgt ttacaacaag ctgtaa 1176

<210> 63

<211> 323

<212> ADN

5 <213> Agrobacterium tumifaciens

<220>

<221> característica diversa

<222> (1)..(323)

<223> Región de frontera izquierda

10 <400> 63

gatcgttcaa acatttgcca ataaagtttc ttaagattga atcctgttgc cggctctgcg 60
 atgattatca tataatffct gttgaattac gtttaagcatg taataattaa catgtaatgc 120
 atgacgttat ttatgagatg ggtttttatg atttagagtc cgcaattata catttaatac 180
 gcgatagaaa acaaaatata gcgcgcaaac taggataaat tatcgcgcgc ggtgtcatct 240
 atgttactag atctgctagc cctgcaggaa atttaccggt gcccgggcgg ccagcatggc 300
 cgtatccgca atgtgttatt aag 323

REIVINDICACIONES

1. Un método para caracterizar una planta de raíz, o una parte de la misma, que comprende un inserto heterólogo que comprende un gen *cry3A055* de SEC ID NO: 59 flanqueado por secuencias nucleotídicas expuestas en SEC ID NO: 1 y SEC ID NO: 3, y SEC ID NO: 2, y SEC ID NO: 4, respectivamente, o por sus complementos, que comprende digerir el ADN genómico de la planta con la endonucleasa de restricción *KpnI* y sondar el ADN digerido con una sonda que comprende al menos una molécula de ácido nucleico de longitud suficiente de nucleótidos contiguos homólogos o complementarios a una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 3, y SEC ID NO: 4, que funciona como una sonda de ADN específica para dicho ADN.
2. El método de la reivindicación 2, en el que dicha sonda comprende la secuencia nucleotídica expuesta en SEC ID NO: 56 o SEC ID NO: 59.
3. El método de la reivindicación 1, en el que dicha planta de maíz comprende además dentro del inserto heterólogo la secuencia nucleotídica como se expone en SEC ID NO: 62.
4. El método de la reivindicación 1, en el que dicha planta de maíz comprende dentro del inserto heterólogo las secuencias nucleotídicas como se exponen en SEC ID NOs: 57-63.
5. El método de la reivindicación 1, en el que dicha planta de maíz es una semilla de una planta de maíz según la reivindicación 1, que comprende el inserto heterólogo de cualquiera de las reivindicaciones 1, 4 ó 5.
6. El método de la reivindicación 5, en el que dicha semilla es una semilla tratada con sustancias químicas para tratamiento de semillas.
7. El método de la reivindicación 5, en el que dicha semilla es una semilla híbrida.
8. Un método para detectar la presencia de un ADN que corresponde a una planta de maíz que comprende un inserto heterólogo que comprende un gen *cry3A055* de SEC ID NO: 59 flanqueado por secuencias nucleotídicas expuestas en SEC ID NO: 1 y SEC ID NO: 3, y SEC ID NO: 2, y SEC ID NO: 4, respectivamente, o por sus complementos, en una muestra, que comprende
- poner en contacto la muestra que comprende ADN con una sonda que se hibrida en condiciones muy restrictivas con ADN genómico procedente de una planta de maíz que comprende un inserto heterólogo que comprende un gen *cry3A055* de SEC ID NO: 59 flanqueado por secuencias nucleotídicas expuestas en SEC ID NO: 1 y SEC ID NO: 3, y SEC ID NO: 2, y SEC ID NO: 4, respectivamente, o por sus complementos, y que no se hibrida en condiciones muy restrictivas con ADN de una planta de maíz de control;
 - someter la muestra y la sonda a condiciones de hibridación muy restrictivas; y
 - detectar la hibridación de la sonda al ADN;
- en el que dicha sonda comprende al menos una molécula de ácido nucleico de longitud suficiente de nucleótidos contiguos homólogos o complementarios a una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 3, y SEC ID NO: 4.
9. Un kit para la detección de un ADN que corresponde a una planta de maíz que comprende un inserto heterólogo que comprende un gen *cry3A055* de SEC ID NO: 59 flanqueado por secuencias nucleotídicas expuestas en SEC ID NO: 1 y SEC ID NO: 3, y SEC ID NO: 2, y SEC ID NO: 4, respectivamente, o por sus complementos, en una muestra biológica, en el que el kit comprende al menos una molécula de ácido nucleico de longitud suficiente de nucleótidos contiguos homólogos o complementarios a una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 3, y SEC ID NO: 4, que funciona como una sonda de ADN específica para dicho ADN.



