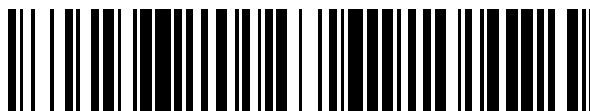


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 542 688**

51 Int. Cl.:

A01H 1/00 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)
A01H 5/10 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2004 E 04813968 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2015 EP 1708560**

54 Título: **Planta de maíz MON88017 y composiciones y procedimientos de detección de la misma**

30 Prioridad:

15.12.2003 US 529477 P

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

10.08.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BEAZLEY, KIM, A.;
COOMBE, TIMOTHY, R.;
GROTH, MARK, E.;
HINCHEY, TERRI, B.;
PERSHING, JAY, C.;
VAUGHN, TY, T. y
ZHANG, BEI**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 542 688 T3

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

DESCRIPCIÓN

Planta de maíz MON88017 y composiciones y procedimientos de detección de la misma

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la biología molecular de las plantas. Más específicamente, la invención se refiere a una planta de maíz MON88017 tolerante a glifosato y resistente a insectos y al análisis y los procedimientos para detectar la presencia del ADN de la planta de maíz MON88017 en una muestra de planta y composiciones de la misma.

Descripción de la técnica relacionada

El maíz es un cultivo importante y es una fuente principal de alimento en muchas regiones del mundo. Los procedimientos de biotecnología se han aplicado al maíz para la mejora de los rasgos agronómicos y de la calidad del producto. Uno de tales rasgos agronómicos es la tolerancia a los herbicidas, en particular, la tolerancia al herbicida glifosato. Este rasgo en el maíz se ha conferido mediante la expresión de un transgén en la planta de maíz que expresa una 5-enolpiruvil siquimato-3-fosfato sintasa (CP4 EPSPS, Patente de Estados Unidos 5.633.435) resistente a glifosato. Otro rasgo agronómico es la resistencia a insectos, por ejemplo, la resistencia de la planta del maíz genéticamente modificada al taladro del maíz y al gusano de la raíz del maíz (Patente de Estados Unidos 6.489.542 y Patente de Estados Unidos 6.620.988). Sería ventajoso ser capaz de detectar la presencia de ADN transgénico/genómico de una planta en particular con el fin de determinar si la progenie de un cruce sexual contiene el ADN transgénico/genómico de interés. Además, un procedimiento para detectar una planta en particular sería útil cuando cumple con las regulaciones que requieren la aprobación previa a la comercialización y el etiquetado de alimentos derivados de las plantas de cultivo recombinantes.

Se sabe que la expresión de genes exógenos en las plantas está influenciada por su posición cromosómica, posiblemente debido a la estructura de la cromatina (por ejemplo, la heterocromatina) o a la proximidad de elementos reguladores transcripcionales (por ejemplo, potenciadores) cerca del sitio de integración (Weising et ál., Ann. Rev. Genet 22:421-477, 1988). Por esta razón, a menudo es necesario explorar un gran número de plantas con el fin de identificar una planta que se caracterice por la expresión óptima de un gen de interés introducido. Por ejemplo, en las plantas y en otros organismos se ha observado que puede haber una amplia variación entre plantas en los niveles de expresión de un transgén introducido. También puede haber diferencias entre los patrones de expresión espacial o temporal, por ejemplo, diferencias en la expresión relativa de un transgén en diversos tejidos de la planta, que puede no corresponder a los patrones esperados a partir de elementos reguladores transcripcionales presentes en la construcción génica introducida. Por esta razón, es común producir de cientos a miles de diferentes plantas transgénicas y explorar aquellas plantas en busca de una sola planta que tenga los niveles de expresión y fenotipo del transgén que se desea con fines comerciales. Una planta que tiene niveles o patrones de expresión del transgén deseado es útil para la introgresión del transgén en otros fondos genéticos mediante cruzamiento sexual usando procedimientos de reproducción convencionales. La progenie de tales cruces mantiene las características de expresión del transgén del transformante original. Esta estrategia se usa para garantizar una expresión génica fiable en diversas variedades que están bien adaptadas a las condiciones de cultivo locales y a las demandas del mercado.

Es posible detectar la presencia de un transgén mediante cualquiera de los procedimientos de detección de ácidos nucleicos bien conocidos tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o la hibridación de ADN usando sondas de ácido polinucleico. Estos procedimientos de detección generalmente cebadores de ADN o moléculas sonda que son específicos para los elementos genéticos, tales como promotores, líderes, intrones, regiones codificantes, terminadores de transcripción 3', genes marcadores, etc., que son los componentes de los transgenes de una construcción de ADN. Como resultado, tales procedimientos no pueden ser útiles para discriminar entre diferentes eventos transgénicos, en particular los producidos usando la misma construcción de ADN transgénico a menos que se conozca la secuencia de ADN genómico adyacente al ADN del transgén insertado. Se han desarrollado procedimientos de detección de ADN específicos de evento para muchas introducciones de plantas de cultivo transgénicas, por ejemplo, la remolacha azucarera (Patente de Estados Unidos 6.531.649), el trigo (Patente de Estados Unidos publicada 20020062503), el maíz resistente a insectos (Patente de Estados Unidos publicada 20020102582), y un evento nk603 de maíz tolerante a glifosato (Patente de Estados Unidos publicada 20020013960).

La presente invención se refiere a una planta de maíz MON88017 tolerante a glifosato y resistente al gusano de la raíz del maíz, a composiciones contenidas en el presente documento, al procedimiento para la detección de la región de inserción transgénica/genómica en la planta de maíz MON88017 y a la progenie de la misma que contiene estas composiciones.

Sumario

La presente invención se refiere a una planta de maíz, a su progenie, semilla o parte de la misma, tolerante a glifosato y resistente al gusano de la raíz del maíz, al genoma de dicha planta, a la progenie, semilla o parte que comprende el inserto del transgén mostrado en la Fig. 2 y a las secuencias de unión transgénica/genómica de las

SEC ID Nos: 1 y 2, estando presente el inserto del transgén mostrado en la Fig. 2 en el evento de maíz MON88017 depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) con el número de registro PTA-5582.

La invención proporciona adicionalmente una molécula de ADN aislada, la cual

- 5 (i) es una región transgénica/genómica SEC ID N°: 5 que comprende el ADN de unión transgénico/genómico de la SEC ID N°: 1 y SEC ID N°: 2, o el complemento completo de la misma;
- (ii) es una región transgénica/región genómica SEC ID N°: 3 que comprende el ADN de unión transgénico/genómico de la SEC ID N°: 1, o el complemento completo de la misma; o
- (iii) es una región transgénica/región genómica SEC ID N°: 4 que comprende el ADN de unión transgénico/genómico de la SEC ID N°: 2, o el complemento completo de la misma.

- 10 Se proporciona una molécula de ADN aislada que es una región transgénica/genómica SEC ID N°: 3 o el complemento de la misma, en la que esta molécula de ADN está en el genoma de la planta de maíz MON88017. También se desvela una planta y una semilla de maíz que comprenden en su genoma la SEC ID N°: 3.

- 15 Además, se proporciona una molécula de ADN aislada que es una región transgénica/genómica SEC ID N°: 4, o el complemento de la misma, en la que esta molécula de ADN está en el genoma de la planta de maíz MON88017. También se desvela una planta de maíz y una semilla que comprenden en su genoma la SEC ID N°: 4.

Se proporciona una molécula de ADN aislada que es una región transgénica/genómica SEC ID N°: 5 de MON 88017 o el complemento de la misma, en la que esta molécula de ADN está en el genoma de la planta de maíz MON88017. También se desvela una planta de maíz y una semilla que comprenden en su genoma la SEC ID N°: 5.

- 20 Adicionalmente, se proporcionan dos moléculas de ADN que comprenden un par de cebadores para su uso en un procedimiento de detección de ADN, en el que la primera molécula de ADN comprende al menos 11 o más polinucleótidos contiguos de cualquier parte de la región del ADN del transgén de la molécula de ADN de SEC ID N°: 3 o el complemento de la misma, y una segunda molécula de ADN que comprende al menos 11 o más polinucleótidos contiguos de cualquier parte de una región de ADN genómica del maíz de SEC ID N°: 3 o el complemento de la misma, en la que cuando estas moléculas de ADN se usan juntas comprenden un conjunto de
- 25 cebadores de ADN en un procedimiento de amplificación de ADN que produce un amplicón. El amplicón producido usando el par de cebadores de ADN en el procedimiento de amplificación de ADN es diagnóstico para la planta de maíz MON88017 cuando el amplicón contiene la SEC ID N°: 1. El experto en la técnica reconocerá que la primera y segunda moléculas de ADN no están obligadas a consistir solamente en ADN, sino que también pueden estar compuestas exclusivamente de ARN, una mezcla de ADN y ARN, o una combinación de ADN, ARN, u otros
- 30 nucleótidos o análogos de los mismos que no actúan como moldes para una o más polimerasas. Además, el experto en la técnica reconocerá que una sonda o un cebador, como se expone en el presente documento, deberá tener una longitud de al menos aproximadamente 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20 nucleótidos consecutivos y seleccionarse del grupo de nucleótidos como se expone en la SEC ID N°: 1 (unión 5' designada arbitrariamente), SEC ID N°: 2 (unión 3' designada arbitrariamente), SEC ID N°: 3 (parte de la secuencia flanqueante 5' designada arbitrariamente), SEC ID N°: 4 (parte de la secuencia flanqueante 3' designada arbitrariamente), y SEC ID N°: 5 (toda o una parte de la secuencia de nucleótidos insertada). Son posibles sondas y cebadores de una longitud de al menos aproximadamente 21 a 50 o más nucleótidos consecutivos cuando se seleccionan del grupo de nucleótidos como se expone en la SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4 y SEC ID N°: 5.
- 35

- 40 Además, se proporcionan dos moléculas de ADN que comprenden un par de cebadores para su uso en un procedimiento de detección de ADN, en el que la primera molécula de ADN comprende al menos 11 o más polinucleótidos contiguos de cualquier parte de la región del ADN del transgén de la molécula de ADN de SEC ID N°: 4 o el complemento de la misma, y una segunda molécula de ADN que comprende al menos 11 o más polinucleótidos contiguos de cualquier parte de una región genómica del ADN del maíz de SEC ID N°: 4 o el complemento de la misma, en la que cuando estas moléculas de ADN se usan juntas comprenden un conjunto de
- 45 cebadores de ADN en un procedimiento de amplificación de ADN que produce un amplicón. El amplicón producido usando el par de cebadores de ADN en el procedimiento de amplificación de ADN es diagnóstico para la planta de maíz MON88017 cuando comprende la SEC ID N°:2.

- 50 De acuerdo con otra divulgación, se proporcionan procedimientos para detectar la presencia de ADN que corresponde específicamente al ADN de la planta de maíz MON88017 en una muestra. Tales procedimientos comprenden: (a) poner en contacto la muestra que comprende el ADN genómico MON88017 con un par de cebadores de ADN como se define anteriormente en el presente documento; y (b) realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico, produciendo de este modo un amplicón; y (c) detectar el amplicón, en el que el amplicón comprende la SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 2.

- 55 De acuerdo con otra divulgación, se proporcionan procedimientos para detectar la presencia de ADN que corresponde específicamente al ADN de la planta de maíz MON88017 en una muestra. Tales procedimientos comprenden: (a) poner en contacto la muestra que comprende el ADN MON88017 con una sonda de ADN que comprende la SEC ID N°:1 o SEC ID N°: 2, o moléculas de ADN sustancialmente homólogas a la SEC ID N°:1 o SEC ID N°: 2, que hibridan en condiciones de hibridación rigurosas con el ADN genómico de la planta de maíz

MON88017 y no hibridan en condiciones de hibridación rigurosas con la planta de maíz no MON88017; (b) someter la muestra y la sonda a condiciones de hibridación rigurosas; y (c) detectar la hibridación de la sonda con el ADN de la planta del maíz MON88017.

Lo anterior y otros aspectos de la invención se harán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Mapa del plásmido de pMON53616.

Figura 2. Organización genómica del inserto en la planta de maíz MON88017.

Figura 3. Región de ADN transgénica/genómica 5' (SEC ID N°: 3) de MON88017.

Figura 4. Región de ADN transgénica/genómica 3' (SEC ID N°: 4) de MON88017.

Figura 5. Región de ADN transgénica/genómica (SEC ID N°: 5) de MON88017.

Descripción detallada

Una planta de maíz transgénica, denominada en el presente documento, “planta MON88017” o “MON88017”, es resistente a daños por alimentación por la plaga del Coleóptero gusano de la raíz del maíz (*Diabrotica* spp.), y es tolerante a la acción fitotóxica del glifosato que contienen los herbicidas agrícolas. Este doble rasgo de la planta del maíz expresa una variante modificada de la proteína CRY3Bb1 (Patente de Estados Unidos 6.501.009) de *Bacillus thuringiensis* (subsp. *kumamotoensis*), que proporciona resistencia a daños por alimentación por la larva del gusano de la raíz del maíz, y una proteína 5-enolpiruvil siquimato-3-fosfato sintasa (CP4 EPSPS) resistente a glifosato (Patente de Estados Unidos 5.633.435) de la cepa CP4 de *Agrobacterium* sp. que confiere a la planta tolerancia a glifosato. El uso del doble rasgo del maíz proporcionará grandes beneficios a los productores de maíz: a) protección frente a pérdidas económicas debidas a la larva del gusano de la raíz del maíz, una gran plaga de insectos en los Estados Unidos y una creciente preocupación en muchas zonas del mundo de cultivo de maíz, y b) la capacidad para aplicar herbicidas agrícolas, que contienen glifosato, al cultivo de maíz para el control de malas hierbas de amplio espectro. Adicionalmente, los transgenes que codifican los rasgos de tolerancia al gusano de la raíz del maíz y al glifosato están unidos en el mismo segmento de ADN y se encuentran en un solo locus en el genoma de MON88017, eso proporciona una mejora de la eficiencia de la reproducción y permite el uso de marcadores moleculares para rastrear el inserto transgénico en las poblaciones de reproducción y en la progenie de las mismas.

La planta de cultivo MON88017 se produjo por un proceso de transformación mediada por *Agrobacterium* de una línea endogámica de maíz con la construcción del plásmido pMON53616 (Figura 1). Esta construcción plasmídica contiene los casetes de expresión de planta unidos con los elementos genéticos reguladores necesarios para la expresión de la proteína CRY3Bb1 y la proteína CP4 EPSPS en células de la planta de maíz. Las células del maíz se regeneraron en plantas de maíz intactas y se seleccionaron plantas individuales de la población de plantas que mostró integridad de los casetes de expresión de la planta y resistencia a glifosato y a daños por alimentación de la larva del gusano de la raíz del maíz. Es un aspecto de la presente invención, una planta de maíz que contiene en su genoma los casetes de expresión de planta de pMON53616 unidos.

El ADN plasmídico insertado en el genoma de la planta de maíz MON88017 se caracterizó por análisis moleculares detallados. Estos análisis incluyeron: el número de inserto (número de sitios de integración dentro del genoma del maíz), el número de copias (el número de copias del ADN-T dentro de un locus), y la integridad de los casetes genéticos insertados. Se usaron sondas moleculares de ADN que incluían las regiones codificantes intactas de CP4 EPSPS y CRY3Bb1 y sus respectivos elementos reguladores, los promotores, intrones, y secuencias de poliadenilación de los casetes de expresión de la planta, y la región de ADN estructural del plásmido pMON53616. Los datos muestran que el MON88017 contiene una sola inserción de ADN-T con una copia de los casetes tanto de CRY3Bb1 como de CP4 EPSPS. En el genoma de MON88017 no se detectaron elementos adicionales del vector de transformación pMON53616, unidos o no unidos a casetes genéticos intactos. Por último, se realizaron análisis de PCR y de secuencia de ADN para determinar las uniones 5' y 3' del genoma “de inserción a la planta”, para confirmar la organización de los elementos dentro del inserto (Fig. 2), y para determinar la secuencia completa de ADN del inserto en la planta de maíz MON88017 (SEC ID N°: 5).

Una planta tolerante a glifosato, resistente al gusano de la raíz del maíz se puede reproducir mediante un primer cruce sexual de una primera planta de maíz parental, constituida por una planta de maíz adulta de MON88017, con una segunda planta de maíz parental que carece de la tolerancia al herbicida glifosato, produciendo de este modo una pluralidad de plantas de la progenie híbrida. Las líneas de maíz endogámicas se pueden generar por un proceso que incluye, el retrocruzamiento con el padre recurrente, y la selección con tratamiento del glifosato. Las descripciones de otros procedimientos de reproducción que se usan comúnmente para diferentes rasgos y los cultivos pueden encontrarse en las referencias conocidas en la técnica, por ejemplo, Fehr, en *Breeding Methods for Cultivar Development*, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison WI (1987).

A menos que se indique lo contrario, los términos deben entenderse de acuerdo con el uso convencional por los expertos en la técnica relevante. Las definiciones de los términos más comunes en biología molecular también se pueden encontrar en Rieger et ál., *Glossary of Genetics: Classical and Molecular*, 5ª edición, Springer-Verlag: Nueva York, 1991; y Lewin, *Genes V*, Oxford University Press: Nueva York, 1994. Se usa la nomenclatura de bases de ADN como se establece en el 37 CFR § 1.822.

Tal como se usa en el presente documento, el término "maíz" significa *Zea mays* e incluye todas las variedades de plantas que se pueden reproducir con la planta de maíz MON88017.

Tal como se usa en el presente documento, el término "comprendiendo" significa "incluyendo pero sin limitarse a".

El "glifosato" se refiere a N-fosfonometilglicina y sus sales. La N-fosfonometilglicina es un herbicida bien conocido que tiene actividad en un amplio espectro de especies de plantas. El glifosato es el ingrediente activo de Roundup® (Monsanto Co.), un herbicida seguro que tiene una vida media en el medio ambiente deseablemente corta. El glifosato es el ingrediente activo del herbicida Roundup® (Monsanto Co.). Los tratamientos con el "herbicida glifosato" se refieren a los tratamientos con el herbicida Roundup®, Roundup Ultra®, Roundup Pro® o cualquier otra formulación herbicida que contiene glifosato. Ejemplos de formulaciones comerciales de glifosato incluyen, sin limitación, los vendidos por Monsanto Company como los herbicidas ROUNDUP®, ROUNDUP® ULTRA, ROUNDUP® ULTRAMAX, ROUNDUP® WEATHERMAX, ROUNDUP® CT, ROUNDUP® EXTRA, ROUNDUP® BIACTIVE, ROUNDUP® BIOFORCE, RODEO®, POLARIS®, SPARK® y ACCORD®, todos los que contienen glifosato como su sal de isopropilamonio; los vendidos por Monsanto Company como los herbicidas ROUNDUP® DRY y RIVAL®, que contienen glifosato como su sal de amonio; el vendido por Monsanto Company como ROUNDUP® GEOFORCE, que contiene glifosato como su sal de sodio; y el vendido por Syngenta Crop Protection como herbicida TOUCHDOWN®, que contiene glifosato como su sal de trimetilsulfonio. Cuando se aplica a una superficie de la planta, el glifosato se mueve sistémicamente a través de la planta, el glifosato es fitotóxico debido a su inhibición de la ruta del ácido siquímico, que proporciona un precursor para la síntesis de aminoácidos aromáticos. El glifosato inhibe la enzima 5-enolpiruvil siquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) encontrada en las plantas. La tolerancia al glifosato se puede lograr mediante la expresión de variantes bacterianas de EPSPS y variantes de planta EPSPS que tienen menor afinidad para el glifosato y por lo tanto conservan su actividad catalítica en presencia del glifosato (Patentes de Estados Unidos N°. 5.633.435, 5.094.945, 4.535.060, y 6.040.497).

Las larvas del gusano de la raíz del maíz (CRW, *Corn Rootworm*, *Diabrotica spp*) se alimentan de las raíces de las plantas de maíz en desarrollo. Se dedica un gasto y tiempo sustancial en controlar el daño económico causado por esta plaga. Los insecticidas químicos, incluyendo organofosfatos, carbamatos y piretroides se incorporan en el suelo en más de 6,5 millones de hectáreas (16 millones de acres) de maíz al año para controlar el CRW. Los beneficios de un movimiento que pasa de los insecticidas de suelo a un enfoque transgénico son impresionantes e incluyen una reducción de los posibles riesgos para la salud y la seguridad humana, la reducción de los impactos directos sobre los organismos no objetivo, la reducción de la contaminación de los suministros de agua superficial y subterránea, la disminución de los problemas de desecho de los contenedores de pesticidas, y la compatibilidad general con otros programas de gestión de plagas y agrónomos.

La presente invención proporciona plantas transgénicas que se han transformado con una construcción de ADN que contiene al menos un casete de expresión que expresa altos niveles de delta-endotoxina Cry3Bb1 y al menos un casete de expresión que expresa una enzima de tolerancia al glifosato. Las plantas de maíz transformadas de acuerdo con los procedimientos y con la construcción de ADN descritos en el presente documento son resistentes al CRW. Las mismas plantas de maíz también son resistentes al herbicida glifosato. Los rasgos agrónomos unidos proporcionan facilidad en el mantenimiento de estos rasgos juntos en una población de cultivo.

Una "planta" transgénica se produce mediante transformación de una célula de la planta con el ADN heterólogo, es decir, una construcción de ácido polinucleico que incluye un transgén de interés; la regeneración de una población de plantas resultantes de la inserción del transgén dentro del genoma de la célula de la planta, y la selección de una planta en particular caracterizada por la inserción dentro de una localización genómica particular. El término "evento" se refiere a la planta transformante original y la progenie del transformante que incluye el ADN heterólogo. El término "evento" también incluye la progenie producida mediante un cruce sexual entre el evento y otra planta en la que la progenie incluya el ADN heterólogo. Incluso después de retrocruzamientos repetidos con un padre recurrente, el ADN insertado y el ADN genómico flanqueante del evento padre transformado están presentes en la progenie del cruce en la misma localización cromosómica. El término "evento" también se refiere al ADN del transformante original que comprende el ADN insertado, y la secuencia genómica flanqueante inmediatamente adyacente al ADN insertado, que debería esperarse al transferirse a una progenie que recibe el ADN insertado incluyendo el transgén de interés como el resultado de un cruzamiento sexual de una línea parental que incluye el ADN insertado (por ejemplo, el transformante original y la progenie resultante de la autofecundación) y una línea parental que no contiene el ADN insertado. La presente invención está relacionada con el evento transgénico, la planta de maíz MON88017, la progenie de la misma, y las composiciones de ADN contenidas en el mismo.

Una "sonda" es un ácido nucleico aislado el cual se une a un marcador detectable convencional o molécula reportera, por ejemplo, un isótopo radiactivo, ligando, agente quimioluminiscente, o enzima. Una sonda tal es complementaria a una hebra de un ácido nucleico diana, en el caso de la presente invención, a una hebra de ADN

genómico del MON88017 ya sea de una planta MON88017 o de una muestra que incluye ADN MON88017. Las sondas no sólo incluyen ácidos desoxirribonucleicos o ribonucleicos, sino también poliamidas y otros materiales de sonda que se unen específicamente a una secuencia de ADN diana y pueden usarse para detectar la presencia de esa secuencia de ADN diana.

Los cebadores de ADN son ácidos polinucleicos aislados que se hibridan con una hebra de ADN diana complementaria mediante hibridación de ácidos nucleicos para formar un híbrido entre el cebador y la hebra de ADN diana, a continuación, se prolongan a lo largo de la hebra de ADN diana mediante una polimerasa, por ejemplo, una polimerasa de ADN. Un par de cebadores de ADN o un conjunto de cebadores de ADN de la presente invención se refieren a dos cebadores de ADN útiles respecto a la amplificación de una secuencia de ácido nucleico diana, por ejemplo, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otros procedimientos convencionales de amplificación de ácidos polinucleicos.

Las sondas de ADN y los cebadores de ADN son generalmente 11 polinucleótidos o más en longitud, a menudo 18 polinucleótidos o más, 24 polinucleótidos o más, o 30 polinucleótidos o más. Tales sondas y cebadores se seleccionan para ser de longitud suficiente para hibridarse específicamente a una secuencia diana en condiciones de hibridación de alta rigurosidad. Preferiblemente, las sondas y cebadores tienen similitud de secuencia completa con la secuencia diana, aunque las sondas que difieren de la secuencia diana que retienen la capacidad para hibridarse a secuencias diana se pueden diseñar mediante los procedimientos convencionales

Los procedimientos para preparar y usar sondas y cebadores se describen, por ejemplo, en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, vol. 1-3, ed. Sambrook et ál, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 (en lo sucesivo, "Sambrook et ál., 1989"); Current Protocols in Molecular Biology, ed. Ausubel et ál, Greene Publishing and Wiley-Interscience, Nueva York, 1992 (con actualizaciones periódicas) (en lo sucesivo, "Ausubel et ál., 1992"); y Innis et ál, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press: San Diego, 1990. Los pares de cebadores de ADN de PCR se pueden derivar de una secuencia conocida, por ejemplo, mediante el uso de programas de ordenador destinados a este propósito, tal como Cebador (Versión 0.5, © 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA.).

Los cebadores y las sondas basados en las secuencias flanqueantes y de inserto del ADN genómico divulgadas en el presente documento se pueden usar para confirmar (y, si es necesario, para corregir) las secuencias de ADN divulgadas mediante procedimientos convencionales, por ejemplo, mediante la reclonación y la secuenciación de tales moléculas de ADN.

Las sondas y cebadores de ácidos nucleicos hibridan en condiciones rigurosas con una molécula de ADN diana. Cualquier procedimiento de hibridación o amplificación de ácido nucleico convencional se puede usar para identificar la presencia de ADN de una planta transgénica en una muestra. Las moléculas de ácido polinucleico, se refieren también como a segmentos de ácidos nucleicos, o fragmentos de los mismos que son capaces de hibridar específicamente con otras moléculas de ácido nucleico en ciertas circunstancias. Como se usa el presente documento, se dice que dos moléculas de ácido polinucleico son capaces de hibridar específicamente entre sí si las dos moléculas son capaces de formar una estructura ácido nucleico de cadena doble, antiparalela. Se dice que una molécula de ácido nucleico es el "complemento" de otra molécula de ácido nucleico si presentan complementariedad completa. Como se usa en el presente documento, se dice que las moléculas presentan "complementariedad completa" cuando cada nucleótido de una de las moléculas es complementario con un nucleótido de la otra. Se dice que dos moléculas son "mínimamente complementarias" si pueden hibridar entre sí con suficiente estabilidad para permitirles permanecer fusionadas entre sí en al menos condiciones convencionales de "baja rigurosidad". Del mismo modo, se dice que las moléculas son "complementarias" si pueden hibridar entre sí con suficiente estabilidad para permitirles permanecer fusionadas entre sí en condiciones convencionales de "alta rigurosidad". Las condiciones de rigurosidad convencionales se describen por Sambrook et ál, 1989, y por Haymes et ál., En: Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach, IRL Press, Washington, DC (1985), son admisibles por lo tanto las desviaciones de la complementariedad completa, en tanto en cuanto tales desviaciones no impidan completamente la capacidad de las moléculas para formar una estructura de doble cadena. Con el fin de que una molécula de ácido nucleico sirva como un cebador o una sonda sólo necesita ser suficientemente complementaria en secuencia para ser capaz de formar una estructura de doble cadena estable en el disolvente y en las sales de concentraciones empleadas en particular.

Como se usa en el presente documento, una secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia de ácido nucleico que se hibridará específicamente con el complemento de la secuencia de ácido nucleico con la que se está comparando en condiciones de alta rigurosidad. Las condiciones de rigurosidad apropiadas que promueven la hibridación de ADN, por ejemplo, cloruro de sodio/citrato de sodio 6,0 X (SSC) a aproximadamente 45 °C, seguido por un lavado de SSC 2,0 X a 50 °C, se conocen por los expertos en la técnica o se pueden encontrar en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1989), 6.3.1-6.3.6. Por ejemplo, la concentración de sal en la etapa de lavado se puede seleccionar desde una rigurosidad baja de aproximadamente SSC 2,0 X a 50 °C a una rigurosidad alta de aproximadamente SSC 0,2 x a 50 °C. Además, la temperatura en la etapa de lavado se puede incrementar a partir de condiciones de baja rigurosidad a temperatura ambiente, aproximadamente 22 °C, en condiciones de alta rigurosidad a aproximadamente 65 °C. Tanto la temperatura como la sal se pueden variar, o bien la temperatura o bien la concentración de sal se pueden mantener constantes mientras la otra variable se cambia.

Un ácido nucleico descrito en el presente documento hibridará específicamente con una o más de las moléculas de ácido nucleico expuesta en SEC ID N°: 1, 2, 3, 4, o 5, o complementos de las mismas o fragmentos de cualquiera en condiciones moderadamente rigurosas, por ejemplo a aproximadamente 2,0 x SSC y aproximadamente 65 °C. Un ácido nucleico descrito en el presente documento hibridará específicamente con una o más de las moléculas de ácido nucleico expuestas en SEC ID N°: 1, 2, 3, 4, o 5 o complementos o fragmentos de cualquiera en condiciones de alta rigurosidad. Una molécula de ácido nucleico marcadora preferida tiene la secuencia de ácido nucleico expuesta en SEC ID N°: 1 o la SEC ID N°: 2 o complementos de las mismas o fragmentos de cualquiera de las dos. Una molécula de ácido nucleico marcadora preferida comparte entre el 80% y el 100% o el 90% y el 100% de la identidad de secuencia con la secuencia del ácido nucleico expuesta en SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 2 o complemento de la misma o fragmentos de cualquiera de las dos. Una molécula de ácido nucleico marcadora preferida comparte entre el 95% y el 100% de la identidad de secuencia con la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 2 o complemento de la misma o fragmentos de cualquiera. La SEC ID N°: 1 o la SEC ID N°: 2 se pueden usar como marcadores en los procedimientos de reproducción de plantas para identificar la progenie de cruces genéticos de forma similar a los procedimientos descritos para el análisis de marcador de ADN de repetición de secuencia simple, en "DNA markers: Protocols, applications, and overviews: (1997) 173-185, Cregan, et ál., eds., Wiley-Liss NY. La hibridación de la sonda a la molécula de ADN diana se puede detectar mediante cualquier número de procedimientos conocido por los expertos en la técnica, estos pueden incluir, pero sin limitarse a, marcas fluorescentes, marcas radioactivas, marcas de basadas en antibióticos, y marcas quimioluminiscentes.

En cuanto a la amplificación de una secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, mediante PCR) usando un par de cebadores de amplificación en particular, unas "condiciones rigurosas" son condiciones que permiten al par de cebadores hibridar sólo con la secuencia diana de ácido nucleico a la que se uniría un cebador que tenga la secuencia natural correspondiente (o su complemento) y que permiten producir preferiblemente un único producto de amplificación, el amplicón, en una reacción de amplificación térmica del ADN.

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

Como se usa en el presente documento, el "ADN amplificado" o "amplicón" se refiere al procedimiento de amplificación de ácidos polinucleicos dirigido a una molécula de ácido polinucleico diana que es parte de un molde de ácido polinucleico. Por ejemplo, para determinar si una planta de maíz resultante de un cruce sexual contiene ADN genómico transgénico de planta a partir de la planta MON88017 de maíz de la presente invención, el ADN que se extrae de una muestra de tejido de la planta de maíz se puede someter a un procedimiento de amplificación de ácidos polinucleicos usando un par de cebadores que incluye un cebador derivado de la secuencia de ADN en el genoma de la planta MON88017 adyacente al sitio de inserción del ADN heterólogo insertado (ADN transgén), y un segundo cebador derivado del ADN heterólogo insertado para producir un amplicón que es diagnóstico respecto a la presencia del ADN de la planta MON88017. El amplicón de diagnóstico es de una longitud y tiene una secuencia de ADN que también es diagnóstico para el ADN genómico de la planta, la secuencia de ADN del amplicón que comprende la SEC ID N°: 1 o la SEC ID N°: 2. El amplicón puede variar en longitud desde la longitud combinada del par de cebadores además de un par de bases nucleotídicas, preferiblemente más aproximadamente cincuenta pares de bases nucleotídicas, más preferiblemente más aproximadamente doscientos cincuenta pares de bases nucleotídicas, e incluso más preferiblemente más aproximadamente cuatrocientos cincuenta pares de bases nucleotídicas o más. Alternativamente, un par de cebadores se pueden derivar de la secuencia genómica en ambos lados del ADN heterólogo insertado para producir un amplicón que incluye la secuencia nucleotídica del inserto entera (por ejemplo, un cebador directo aislado de la porción genómica de la SEC ID N°: 3 y un cebador inverso aislado de la porción genómica de la SEC ID N°: 4 que amplifica una molécula de ADN que comprende los dos casetes de expresión del fragmento de ADN del pMON53616 que se insertó en el genoma MON88017, el inserto que comprende aproximadamente 7125 nucleótidos de la SEC ID N°: 5, Figura 2 y Figura 5). Un miembro de un primer par derivado de la secuencia genómica de la planta adyacente al inserto del transgén de ADN se encuentra a una distancia de la secuencia de ADN insertado, esta distancia puede variar de un par de bases de nucleótidos hasta aproximadamente veinte mil pares de bases de nucleótidos. El uso del término "amplicón" excluye específicamente dímeros de cebador que se pueden formar en la reacción de amplificación térmica de ADN.

La amplificación de ácidos polinucleicos se puede llevar a cabo mediante cualquiera de los diversos procedimientos de amplificación de ácidos polinucleicos conocidos en la técnica, incluyendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los procedimientos de amplificación se conocen en la técnica y se describen, entre otras cosas, en la patente de Estados Unidos N°: 4.683.195 y 4.683.202 y en los PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, ed. Innis et ál., Academic Press, San Diego, 1990. Los procedimientos de amplificación de PCR se han desarrollado para amplificar hasta 22 kb (kilobases) de ADN genómico y hasta 42 kb de ADN de bacteriófago (Cheng et ál., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 91: 5695- 5699, 1994). Estos procedimientos así como otros procedimientos conocidos en la técnica de amplificación de ADN pueden usarse en la práctica de la presente invención. La secuencia del inserto de ADN heterólogo o secuencia ADN genómico flanqueante del MON88017 se puede verificar (y corregir si es necesario) mediante la amplificación de tales moléculas de ADN de la semilla del MON88017 o plantas cultivadas a partir de la semilla depositada en la ATCC con el acceso número PTA-5582, usando cebadores derivados de las secuencias proporcionadas en el presente documento, seguidas por secuenciación de ADN estándar del amplicón de PCR o fragmentos de ADN clonados de los mismos.

Los kits de detección de ADN que se basan en procedimientos de amplificación de ADN contienen las moléculas de cebador de ADN que se hibridan específicamente a un ADN diana y amplifica un amplicón de diagnóstico en las condiciones de reacción apropiadas. El kit puede proporcionar un procedimiento de detección basado en el gel de agarosa o cualquier número de procedimientos para detectar el amplicón de diagnóstico que se conocen en la técnica. Es un objeto de la invención un kit que contiene los cebadores de ADN que son homólogos o complementarios a cualquier parte de la región genómica de maíz de SEC ID N°: 3 o SEC ID N°: 4 y a cualquier parte de la región del inserto del transgén de SEC ID N°: 5. Identificados específicamente como un par de cebadores útil en unos procedimientos de amplificación del ADN es SEC ID N°: 6 y SEC ID N°: 7 que amplifican un amplicón de diagnóstico homólogo a una parte de la región 5' del transgén/genoma del MON88017, en la que el amplicón comprende SEC ID N°: 1. Otras moléculas de ADN útiles como cebadores de ADN se pueden seleccionar entre la secuencia de ADN transgénica/genómica del MON88017 (SEC ID N°: 5) divulgada por los expertos en la técnica de amplificación del ADN.

El amplicón de diagnóstico producido mediante estos procedimientos se puede detectar mediante una pluralidad de técnicas. Uno de tales procedimientos es el Análisis de Bits Genéticos (Nikiforov, et ál. Nucleic Acid Res. 22:4167-4175, 1994), donde se diseña un oligonucleótido de ADN el cual se solapa tanto con la secuencia de ADN genómico flanqueante adyacente como con la secuencia de ADN insertado. El oligonucleótido se inmoviliza en pocillos de una placa microtituladora. Después de la PCR de la región de interés (usando un cebador en la secuencia insertada y uno en la secuencia genómica flanqueante adyacente), un producto de la PCR de cadena simple se puede hibridar con el oligonucleótido inmovilizado y servir como una molde para una reacción de extensión de base única usando una ADN polimerasa y dideoxinucleótidos trifosfatos (ddNTPs) señalados específicos para la siguiente base esperada. La lectura puede ser fluorescente o basada en ELISA. Una señal indica la presencia de la secuencia transgénica/genómica debida a la amplificación, hibridación y extensión de base única exitosa.

Otro procedimiento es la técnica de Pirosecuenciación como se describe por Winge (Innov Pharma Tech 00:18-24, 2000). En este procedimiento se diseña un oligonucleótido que solapa con el ADN genómico adyacente y la unión de ADN del inserto. El oligonucleótido se hibrida a un producto de PCR de cadena simple a partir de la región de interés (un cebador insertado en la secuencia y uno en la secuencia genómica flanqueante) y se incuba en presencia de una ADN polimerasa, ATP, sulfurilasa, luciferasa, apirasa, adenosina 5' fosfosulfato y luciferina. Se añaden de forma individual los dNTPs y la incorporación da como resultado una señal ligera la cual se mide. Una señal ligera indica la presencia de la secuencia del inserto transgénica/genómica debida a la amplificación, hibridación y extensión de base única o multibase exitosas.

La Polarización de Fluorescencia como se describe por Chen, et ál, (Genome Res. 9:492-498, 1999) es un procedimiento el cual se puede usar para detectar el amplicón de la presente invención. Usando este procedimiento se diseña un oligonucleótido el cual se solapa con el ADN genómico flanqueante y la unión del ADN insertado. El oligonucleótido se hibrida a un producto de PCR de cadena simple a partir de la región de interés (un cebador en el ADN insertado y uno en la secuencia de ADN genómica flanqueante) y se incuba en presencia de una ADN polimerasa y un ddNTP señalado fluorescentemente. La extensión de base individual da como resultado la incorporación de los ddNTP. La incorporación se puede medir como un cambio en la polarización usando un fluorómetro. Un cambio en la polarización indica la presencia de la secuencia de la secuencia del inserto transgénica/secuencia genómica debida a la amplificación, hibridación y extensión de base única exitosa.

Se describe el TaqMan® (PE Applied Biosystems, Foster City, Calif.) como un procedimiento para detectar y cuantificar la presencia de una secuencia de ADN y se entiende completamente en las instrucciones proporcionadas por el fabricante. En pocas palabras, se diseña una sonda oligonucleotídica FRET la cual solapa con el flanqueo genómico y la unión de ADN del inserto. La sonda FRET y los cebadores de PCR (un cebador en la secuencia del inserto de ADN y uno en la secuencia genómica flanqueante) se pasan en ciclos en presencia de una polimerasa termoestable y dNTP. La hibridación de la sonda FRET da como resultado escisión y liberación del resto fluorescente lejos del resto desactivador de la sonda FRET. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia del transgén/secuencia genómica debido al éxito de la amplificación y la hibridación.

Se han descrito Balizas Moleculares para usar en la detección de la secuencia como se describe en Tyangi, et ál. (. Nature Biotech 14: 303-308, 1996) En pocas palabras, se diseña una sonda oligonucleotídica FRET que se solapa con la unión de ADN del inserto y la región flanqueante genómico. La estructura única de la sonda FRET dio como resultado estructuran de contención secundaria que mantiene en proximidad cercana los restos fluorescente y el desactivador. La sonda FRET y los cebadores de PCR (un cebador en la secuencia del inserto de ADN y uno en la secuencia genómica flanqueante) se pasan en ciclos en presencia de una polimerasa termoestable y dNTP. Después de la amplificación de PCR exitosa, la hibridación de la sonda FRET a la secuencia diana da como resultado la eliminación de la estructura de sonda secundaria y la separación espacial de los restos fluorescentes y desactivadores. Da como resultado una señal fluorescente. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia del inserto flanqueante/transgénico debido a la amplificación y la hibridación exitosa.

Los kits de detección de ADN se pueden desarrollar usando las composiciones divulgadas en el presente documento y los procedimientos bien conocidos en la técnica de detección de ADN. Los kits son útiles respecto a la identificación en una muestra del ADN MON88017 de la planta de maíz y se pueden aplicar a procedimientos respecto a la reproducción de plantas de maíz que contienen el ADN MON88017. Un kit contiene moléculas de ADN

que son útiles como cebadores o sondas y que son homólogas o complementarias de al menos una porción de SEC ID N°: 1, 2, 3, 4, o 5. Las moléculas de ADN se pueden usar en procedimientos de amplificación de ADN (PCR) o como sondas en procedimientos de hibridación de ácidos polinucleicos, es decir, el análisis southern, análisis northern. El vector plásmido pMON53616 usado para producir el evento de maíz MON88017 contiene dos casetes de expresión: el casete de expresión uno comprende el promotor CaMV 35S con potenciador duplicado unido al líder CAB 5' del trigo unida al intrón de actina 1 de arroz unida a la región de codificación 1 de Cry3Bb unido a la secuencia de poliadenilación Hsp17 3' del trigo; y unido al casete de expresión dos que comprende el promotor de actina 1 de arroz unido al intrón de actina 1 de arroz que conduce la transcripción de un péptido de tránsito al cloroplasto fusionado a la región de codificación CP4 EPSPS y unido a la región de poliadenilación 3' NOS, la secuencia de los casetes de expresión unidos están contenidos en la SEC ID N°: 5.

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar ejemplos de ciertas divulgaciones preferidas. Se debería apreciar por los expertos en la técnica que las técnicas divulgadas en los ejemplos que siguen representan enfoques que los inventores han encontrado que funcionan bien en la práctica de la divulgación, y por lo tanto se puede considerar para constituir ejemplos de modos preferidos para su práctica.

Ejemplos

Ejemplo 1

La planta de maíz transgénico MON88017 se generó mediante una transformación mediada por un *Agrobacterium* de células de maíz con un fragmento de ADN derivado de pMON53616 (Fig. 1). La construcción de transformación de la planta, pMON53616 se acopló en *Agrobacterium* usando un procedimiento de apareamiento triparental (Ditta et ál, Proc Natl Acad Sci 77:7347-7351, 1980). El fragmento de ADN de pMON53616 que contiene dos casetes de expresión de la planta transgén se insertó en el genoma de una célula vegetal de maíz, la célula de la planta de maíz se regeneró en la planta de maíz MON88017. La configuración del inserto en el genoma de MON88017 se muestra en la (Figura 2). El MON88017 y su progenie tienen tolerancia al glifosato y son resistentes al daño por la alimentación de las larvas del gusano de la raíz del maíz. La transformación del maíz se realizó esencialmente como se describe en el presente documento.

Los cultivos líquidos de *Agrobacterium* que contiene pMON53616 se inician a partir de los caldos de glicerol o de una placa recién rayada y se cultivan durante la noche a 26 °C-28 °C con agitación (aproximadamente 150 revoluciones por minuto, rpm) a la fase semilogarítmica de crecimiento en medio líquido LB, pH 7,0, que contiene 50 mg/l (miligramos por litro) de kanamicina, y, o bien 50 mg/l de estreptomicina o 50 mg/l de espectinomicina, y 25 mg/l de cloranfenicol con 200 µM de acetosiringona (AS). Las células de *Agrobacterium* se resuspenden en el medio de inoculación (CM4C líquido, tal como se describe en la Tabla 8 de la Patente de Estados Unidos N°. 6.573.361) y la densidad celular se ajusta de tal manera que las células resuspendidas tienen una densidad óptica de 1 cuando se mide en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 660 nm (es decir, OD₆₆₀). Embriones inmaduros de maíz de tipo II HillxLH198 y Hill recién aislados se inoculan con *Agrobacterium* y se cocultivan durante 2-3 días en la oscuridad a 23 °C. Después, los embriones se transfieren a medios de retardo (N6 1-100-12; como se describe en la Tabla 1 de la patente de Estados Unidos. N°. 5.424.412), complementados con 500 mg/l de carbenicilina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) y 20 µM de AgNO₃ y se incuban a 28 °C durante 4 a 5 días. Todos los cultivos posteriores se mantienen a esta temperatura.

Los coleóptilos del maíz se extraen una semana después de la inoculación. Los embriones se transfieren al primer medio de selección (N61-0-12, como se describe en la Tabla 1 de la Patente de Estados Unidos N°. 5.424.412), complementado con 500 mg/l de carbenicilina y 0,5 mM de glifosato. Dos semanas más tarde, los tejidos supervivientes se transfieren al medio de la segunda selección (N61-0-12) complementado con 500 mg/l de carbenicilina y 1,0 mM de glifosato. Los callos supervivientes se subcultivan cada 2 semanas en aproximadamente 3 subcultivos en 1,0 mM de glifosato. Cuando se identifican los tejidos tolerantes a glifosato, se aumenta el peso del tejido respecto a la regeneración. Respecto a la regeneración, los tejidos de los callos se transfieren al medio de regeneración (MSOD, como se describe en la Tabla 1 de la patente de Estados Unidos N°. 5.424.412.) complementado con 0,1 µM de ácido abscísico (ABA; Sigma-Aldrich, St Louis, MO) y se incuban durante dos semanas. Los callos regenerados se transfieren a un medio alto en sacarosa y se incuban durante dos semanas. Las plántulas se transfieren al medio MSOD (sin ABA) en un recipiente de cultivo y se incuban durante dos semanas. Después, las plantas con raíces se transfieren al suelo. Los expertos en la técnica de procedimientos de transformación de células de maíz pueden modificar este procedimiento para proporcionar plantas de maíz transgénicas que contienen la construcción de ADN de la presente invención, o usar otros procedimientos, tales como, la pistola de partículas, que se sabe que proporcionan plantas monocotiledóneas transgénicas.

La planta y la semilla MON88017 tiene partes regenerables. Las partes regenerables de la semilla incluyen, pero no se limitan al embrión, al cotiledón, y al meristemo del brote o la raíz. La invención también incluye partes de la planta de la planta de maíz MON88017 que incluyen, pero no se limitan a polen, óvulo, brotes, raíces, y hojas. La invención también incluye componentes extraíbles de la semilla MON88017 que incluyen, pero no se limitan a proteína, maicena, harina y aceite.

Ejemplo 2

La planta de maíz MON88017 se seleccionó de entre muchas plantas de maíz transgénicas por la tolerancia al glifosato vegetativo y al daño reproductivo. Actualmente el éxito de la producción, de una planta transgénica de calidad comercial requiere producir un gran número de plantas transgénicas. En la presente invención, MON88017 fue una planta de entre aproximadamente 472 R₀ eventos que se habían transformado con diferentes construcciones de ADN que incluyeron pMON53616. El evento MON88017 se seleccionó de los muchos eventos por una serie de análisis moleculares, exploraciones de tolerancia al glifosato, exploraciones de resistencia a insectos, y exploraciones de análisis de expresión.

Las plantas de maíz transgénicas se ensayaron respecto a la resistencia a los daños por la alimentación del gusano de la raíz del maíz mediante exploraciones en invernadero y campo. Los daños de la raíz se clasificaron usando la Escala Daño-Nudo (NIS, *Node-Injury Scale*) desarrollada por Oleson y Tollefson de la Universidad Estatal de Iowa, esta escala clasifica el daño hecho a las raíces de maíz usando de 0-3 valores. El valor 0,00 describe ningún daño por alimentación y es la clasificación más baja, 1,00 describe un nudo o el equivalente de un nudo completo comido aproximadamente en 5 cm (2 pulgadas) de tallo, 2,00 describe dos nudos completamente comidos, y 3,00 describe tres o más nudos comidos y es la clasificación más alta. Se anota el daño en los nudos completamente comidos como el porcentaje del nudo que falta, es decir, 1,50 describe 1 1/2 de nudos comidos, 0,25 describe 1/4 de nudo comido. Las parcelas de campo se infestaron artificialmente con larvas de gusano de la raíz del maíz mediante la aplicación de 4921-6562 huevos por metro lineal (1500-2000 huevos por pie lineal) de fila en la etapa de crecimiento V3-V4. Las filas tratadas con insecticida se trataron con insecticida teflutrín (Force® 3G, Zeneca Ag Products) a una proporción de 0,465 kg por kilómetro (5 onzas por 1000 pies) de fila. MON88017 demostró una clasificación de daños a las raíces (RDR, *Root Damage Rating*) de entre 0,08 y 0,11 en múltiples ensayos. La isolínea tratada sin insecticida mostró un promedio de 1,28 RDR. La proteína no insecticida tratada con insecticida que contenían las plantas de maíz mostró un RDR promedio de 0,44.

Las plantas de maíz transgénicas se trataron con herbicida glifosato para determinar el nivel de tolerancia al herbicida. Las parcelas de ensayo se pulverizaron con glifosato (Roundup® WeatherMax, Monsanto Co, St Louis, MO) que se aplicó dos veces durante la estación de crecimiento una vez en la etapa de crecimiento V4 y una vez en la V8 a una proporción de 1,261 y 2,522 kg de ingrediente activo por hectárea (1,125 y 2,25 libras por acre). El rendimiento de las semillas de maíz se midió en la cosecha como el porcentaje de rendimiento en relación a las parcelas MON88017 sin pulverizar (WeatherMax O). Los resultados mostrados en la Tabla 1 demuestran que el MON88017 es altamente tolerante al glifosato y no se redujeron en rendimiento, sorprendentemente las parcelas tratadas promediaron más alto en rendimiento que las parcelas tratadas.

Tabla 1. Porcentaje de rendimiento de MON88017 tratado con glifosato comparado con el no tratado

Tratamiento	Reproducción					Promedio
WeatherMax 0 - V4	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
WeatherMax 1,125 + 1,125 - V4/V8	99,2	118,5	102,1	100,4	107,7	105,1
WeatherMax 2,25 + 2,25 - V4/V8	99,5	118,8	107,0	97,4	115,5	105,7

Leyenda de la Tabla 1: El porcentaje de rendimiento para cada tratamiento WeatherMax en las etapas de las hojas de V4 a V8 se compararon con un porcentaje rendimiento para los tratamientos WeatherMax en las etapas de las hojas de 0 a V4, con los resultados de los tratamientos 0-V4 que establecieron la línea base del 100 por ciento de rendimiento para cada repetición del tratamiento.

Ejemplo 3

El ADN genómico de MON88017 y las sustancias de control se extrajeron del grano de maíz mediante un primer procesamiento del grano a un polvo fino. Aproximadamente 6 gramos del grano procesado se transfirieron a un tubo cónico de 50 ml (mililitros), después se añadieron al grano procesado ~ 16 ml de tampón de extracción CTAB [1,5% (p/v) CTAB, 75 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM EDTA pH 8,0, 1,05M NaCl, y 0.75% (p/v) de PVP (MM 40.000)] y 8 microlitro de RNasa (10 mg/ml, Roche). Las muestras se incubaron a 65 °C durante 30-60 minutos con mezclados intermitente y luego se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se añadió a las muestras aproximadamente 15 ml de cloroformo: alcohol isoamílico (24: 1 (v/v)). La suspensión se mezcló durante 5 minutos y las dos fases se separaron mediante centrifugación a ~16.000 × g durante 5 minutos a temperatura ambiente. La capa acuosa (superior) se transfirió a un tubo cónico limpio de 50 ml. Aproximadamente 1/10 del volumen (~ 1,5 ml) del 10% del tampón CTAB [10% (p/v) CTAB y NaCl 0,7 M] y un volumen igual de cloroformo: alcohol isoamílico [24: (v/v) 1] se añadió a la fase acuosa, que después se mezcló durante 5 minutos. Las muestras se centrifugaron a ~16.000 × g durante 5 minutos para separar las fases. Se separó la capa acuosa (superior), se mezcló con un volumen igual (~ 15 ml) de tampón de precipitación CTAB [1% (p/v) CTAB, 50 mM Tris pH 8,0, y 10 mM EDTA pH 8,0] y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1-2 horas. Las muestras se centrifugaron a ~10.000 × g durante 10 minutos a temperatura ambiente para sedimentar el ADN. Se desechó el sobrenadante, y el sedimento se disolvió en aproximadamente 2 ml de tampón TE de alta salinidad (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA pH 8,0, y 1 M NaCl). Se llevó a cabo una

agitación suave a 37 °C para ayudar en la disolución del sedimento. Si fue necesario, las muestras se centrifugaron a ~23.000 × g a temperatura ambiente durante 2 minutos para sedimentar y eliminar los residuos. Se añadieron aproximadamente un volumen 1/10 (~ 150 µl) de 3 M NaOAc (pH 5,2) y 2 volúmenes (~ 4 ml relativa al sobrenadante) de 100% etanol enfriado para precipitar el ADN. El ADN precipitado se agregó en un tubo de microcentrífuga que contenía 70% de etanol. El ADN se sedimentó en una microcentrífuga a velocidad máxima (~14.000 rpm) durante ~ 5 minutos, se secó a vacío, y se redisolvió en tampón TE (pH 8,0). Después el ADN se almacenó en un refrigerador a 4 °C.

Se digirieron diez µg de ADN genómico con una enzima de restricción seleccionada, por ejemplo, Sspl, EcoRV, Scal y SmaI, en 200 µl de tampón de restricción de la enzima a 37 °C durante más de 4 horas, y después la enzima se inactiva a 70-80 °C durante 15 minutos. El ADN se extrajo con fenol y cloroformo, y se precipitó con EtOH y se disolvió en 200 µl. Después el ADN se autoligó en 1 ml de tampón de ligación y ADN ligasa T4 a 4 °C durante toda la noche. La reacción de ligación se inactivó a 70-80 °C durante 15 minutos, y se precipitó con EtOH y se disolvió en 200 µl. El ADN se usó como molde para PCR con cebadores específicos dentro de las regiones codificantes CP4 EPSPS o Cry3Bb usando Expand High Fidelity System (Roche), siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. Se usó una PCR secundaria con cebadores anidados respecto a la amplificación específica. Se clonó a continuación el producto de PCR para el análisis de secuenciación. Se usó un kit universal GenomeWalker (número de catálogo # K1807-1, Clontech, Palo Alto, Calif.) para el aislamiento del ADN de la región transgénica/genómica 5' y 3' usando cebadores adaptadores AP1 y AP2 incluidos en el presente documento y el protocolo proporcionado por el fabricante.

Se aísla el ADN de la región transgénica/genómica 5' (SEC ID N°: 3, Figura 3) y 3' (SEC ID N°: 4, Figura 4) del ADN genómico MON88017 usando PCR. El ADN genómico total (~ 10 µg) se digiere con las enzimas de restricción. Las columnas de purificación QIAquick PCR se usan para purificar el ADN después de la digestión durante la noche a 37 °C. El ADN se eluye de las columnas con 50 µl de agua y después se diluye a 1 ml. El eluato diluido (85 µl) se combina con 10 µl de tampón (10 X) y 5 µl de Ligasa T4 para cerrar en círculos los fragmentos. Después de una noche de incubación a 16 °C, la ligasa se inactiva por calor a 70 °C. Las muestras se amplifican por PCR con una serie de cebadores anidados. Las combinaciones de cebadores para el aislamiento de la región transgénica/genómica 3' incluyó SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 9, y AP1 como cebadores primarios, SEC ID N°: 10 y AP2 como cebadores secundarios, y SEC ID N°: 11 para su uso como un cebador de secuenciación; el aislamiento de la región 5' del transgén/genoma incluyó SEC ID N°: 12, SEC ID N°: 14 y AP1 como cebadores primarios, SEC ID N°: 13, SEC ID N°: 15 y AP2 como cebadores secundarios.

Las condiciones para la PCR incluyen: PCR primaria = 7 ciclos de 94 °C durante 2 segundos, 72 °C durante 10 minutos; 37 ciclos de 94 °C durante 2 segundos, 67 °C durante 10 minutos; 1 ciclo de 67 °C durante 10 minutos; PCR secundaria y terciaria = 5 ciclos de 94 °C durante 2 segundos, 72 °C durante 10 minutos; 24 ciclos de 94 °C durante 2 segundos, 67 °C durante 10 minutos; 1 ciclo de 67 °C durante 10 minutos.

Alternativamente, la amplificación de ADN mediante PCR de las regiones 5' y 3' del inserto del transgén/genoma del evento MON88017 se pueden realizar con condiciones que incluyen: 7 ciclos de 94 °C durante 25 segundos, 72°C durante 3 minutos; 37 ciclos de 94 °C durante 25 segundos, 67 °C durante 3 minutos; 1 ciclo de 67 °C durante 7 minutos. Todas las amplificaciones posteriores se llevan a cabo con las siguientes condiciones: 7 ciclos de 94 °C durante 2 segundos, 72 °C durante 4 minutos; 37 ciclos de 94 °C durante 2 segundos, 67 °C durante 4 minutos; 1 ciclo de 67 °C durante 7 minutos. Todos los amplicones se visualizan en geles de agarosa al 0,8% teñidos con bromuro de etidio. El ADN se prepara para la secuenciación ya sea mediante la purificación de las muestras de PCR directamente con el kit de purificación QIAquick de PCR (número de catálogo # 28104, Qiagen Inc., Valencia, Calif.) o mediante la extracción del fragmento apropiado del gel y usando el kit de extracción de gel QIAquick (número de catálogo # 28704, Qiagen Inc.). El fragmento de ADN de las regiones flanqueantes del inserto transgénico/genómico MON88017 se subclonaron usando un kit TOPO TA Cloning® (Invitrogen, Carlsbad, Calif.). La secuencia de ADN de la región transgénica/genómica 5' se muestra en la Figura 3, la secuencia de ADN de la región transgénica/genómica 3' se muestra en la Figura 4 y el inserto del transgén completo y unido al ADN genómico flanqueante se muestra en la Figura 5.

La secuencia de longitud completa del inserto transgénico/genómico (SEC ID NO: 5, Figura 5) se aisló de ADN genómico MON88017 mediante el solapamiento de los productos de la PCR. Una serie de cebadores de ADN se diseñaron para producir amplicones que contienen fragmentos de ADN del inserto del transgén y una parte de las regiones genómicas flanqueantes adyacentes del genoma MON88017. Los fragmentos de ADN se secuenciaron, las secuencias se combinaron para crear un cóntigo de las secuencias de los fragmentos que es SEC ID N°: 5. Las combinaciones del par de cebadores de ADN fueron: SEC ID N°: 16 y SEC ID N°: 17, SEC ID N°: 18 y SEC ID N°: 17, SEC ID N°: 19 y SEC ID N°: 20, SEC ID N°: 21 y SEC ID N°: 22, SEC ID N°: 23 y SEC ID N°: 24, SEC ID N°: 25 y SEC ID N°: 26, SEC ID N°: 25 y SEC ID N°: 27. El ADN genómico total se usó para todas las reacciones de PCR. Todos los amplicones se visualizaron en geles de agarosa al 0,8% teñidos con bromuro de etidio. El ADN se preparó para la secuenciación ya fuese mediante la purificación de las muestras de PCR directamente con el kit de purificación QIAquick PCR o mediante la extracción del fragmento apropiado del gel y usando el kit de extracción de gel QIAquick. La secuencia de ADN se produjo usando equipos de análisis de secuencia de ADN (ABI Prism® 377, PE Biosystems, Foster City, Calif.) Y el software de análisis de secuencia DNASTAR (DNASTAR Inc., Madison, WI.).

Ejemplo 4

Los pares de cebadores del evento de ADN se usan para producir un amplicón de diagnóstico para el evento de maíz MON88017. Un amplicón de diagnóstico para MON88017 comprende al menos una secuencia de unión, SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 2. Los pares de cebadores del evento que producirán un amplicón de diagnóstico para MON88017, en el que los pares de cebadores incluyen, pero sin limitarse a SEC ID N°: 6 y SEC ID N°: 7 para la secuencia amplicón 5' como se indica en la Tabla 2. La ubicación del cebador SEC ID N°: 6 está en el genoma de maíz como se muestra en la Figura 3 comenzando en la posición del nucleótido 952. La ubicación del cebador SEC ID N°: 7 está en el inserto del transgén como se muestra en la Figura 5 comenzando en la posición del nucleótido 450. El tamaño del amplicón esperado usando SEC ID N°: 6 y SEC ID N°: 7 en un procedimientos de amplificación de ADN con ADN MON88017 es aproximadamente de 550 bps. Además de estos pares de cebadores, es un aspecto de la presente invención cualquier par de cebadores derivado de la SEC ID N°: 3 o SEC ID N°: 4 que en una reacción de amplificación de ADN que produce un amplicón de diagnóstico para el MON88017 o progenie del mismo. Se describe cualquier única molécula de cebador del polinucleótido ADN aislado que comprende al menos 11 nucleótidos contiguos de SEC ID N°: 3, o su complemento que es útil en un procedimiento de amplificación de ADN para producir un amplicón de diagnóstico para MON88017. Se describe cualquier única molécula de cebador del polinucleótido ADN aislado que comprende al menos 11 nucleótidos contiguos de SEC ID N°: 4, o su complemento que es útil en un procedimiento de amplificación de ADN para producir un amplicón de diagnóstico para MON88017. Un ejemplo de las condiciones de amplificación para este análisis se ilustra en la Tabla 2 y la Tabla 3, sin embargo, está dentro de la técnica cualquier modificación de estos procedimientos o el uso de cebadores de ADN homólogos o complementarios a SEC ID N°: 3 o SEC ID N°: 4 o secuencias de ADN de los elementos genéticos contenidos en el inserto del transgén (SEC ID N°: 5) de MON88017 que producen un amplicón de diagnóstico para MON88017. Un amplicón de diagnóstico comprende una molécula de ADN homóloga o complementaria de al menos un ADN de unión transgénico/genómico (SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 2) o una parte sustancial del mismo.

Un análisis de la muestra del tejido de la planta para el evento MON88017 debe incluir un control positivo del tejido del evento MON88017, un control negativo de una planta de maíz que no es el evento MON88017, y un control negativo que no contiene ADN genómico de maíz. Un par de cebadores que amplificarán una molécula de ADN de maíz endógena servirá como un control interno respecto a las condiciones de amplificación de ADN, un ejemplo de estos son SEC ID N°: 28 y SEC ID N°: 29 que amplifica un fragmento de ADN de aproximadamente 239 pb. Las secuencias de los cebadores adicionales se pueden seleccionar de SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, o SEC ID N°: 5 por los expertos en la técnica de procedimientos de amplificación de ADN, y las condiciones seleccionadas para la producción de un amplicón mediante los procedimientos mostrados en la Tabla 2 y la Tabla 3 pueden ser diferentes, pero dan lugar a un amplicón de diagnóstico para el ADN del evento MON88017. Están dentro del alcance de la invención el uso de estas secuencias de cebador de ADN con modificaciones a los procedimientos de la Tabla 2 y 3. Se describe el amplicón producido por al menos una secuencia del cebador del ADN derivado de SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, o SEC ID N°: 5 que es el diagnóstico para el MON88017.

Se describen los kits de detección de ADN que contienen al menos un cebador de ADN derivado de la SEC ID N°: 3 o SEC ID N°: 4, o SEC ID N°: 5 que cuando se usa en un procedimiento de amplificación de ADN produce un amplicón de diagnóstico para el MON88017. Se describe una planta de maíz o semilla, en la que su genoma producirá un amplicón de diagnóstico para el MON88017 cuando se ensaya en un procedimiento de amplificación de ADN. El ensayo para el amplicón MON88017 puede realizarse mediante el uso de un termociclador Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700, o Eppendorf Mastercycler Gradient como se muestra en la Tabla 3, o mediante procedimientos y aparatos conocidos por los expertos en la técnica.

Tabla 2. Procedimiento y condiciones de la mezcla de reacción de la PCR respecto a la identificación de la región 5' de unión del inserto transgénico/genómico del MON88017

Paso	Reactivo	Cantidad	Comentarios
1	Nucleasa sin agua	Añadir al volumen final de 20 µl	
2	Tampón de reacción 10X (con MgCl ₂)	2,0 µl	concentración final 1X de tampón, 1,5 mM de concentración final de MgCl ₂
3	Disolución 10 mM de dATP, dCTP, dGTP, y dTTP	0,4 µl	200 µM de concentración final de cada dNTP
4	Cebador del evento 1 (SEC ID N°:6) (resuspendido en tampón TE1X o nucleasa sin agua a una concentración de 10 µM)	0,4 µl	0,2 µM de concentración final

(continuación)

Paso	Reactivo	Cantidad	Comentarios
5	Cebador del evento 2 (SEC ID N°:7) (resuspendido en tampón TE1X o nucleasa sin agua a una concentración de 10 µM)	0,4 µl	0,2 µM de concentración final
6	RNasa, DNasa libre (500 ng/µl)	0,1 µl	50 ng/reacción
7	ADN polimerasa REDTaq (1 unidad/µl)	1,0 µl (recomendado cambiar pipetas antes de la siguiente etapa)	1 unidad/reacción
8	ADN extraído (molde): • Muestras a analizarse * hojas individuales * hojas agrupadas (máximo de 20 hojas/grupo) • Control negativo • Control negativo • Control positivo	• 10-200 ng de ADN genómico • 200 ng de ADN genómico • 50 ng de ADN genómico (no MON88017) • ADN sin molde • 50 ng de ADN genómico MON88017	-
9	Mezclar suavemente y añadir 1-2 gotas de aceite mineral en la parte superior de cada reacción		

Tabla 3. Parámetros de PCR sugeridos para diversos termocicladores disponibles en el mercado

Nº de ciclo	Ajustes: Stratagene Robocycler
1	94°C 3 minutos
38	94°C 30 segundos 59°C 1 minuto 72°C 1 minuto
1	72°C 10 minutos
Nº de ciclo	Ajustes: MJ Engine, Perkin-Elmer 9700 or Eppendorf Mastercycler Gradient
1	94°C 3 minutos
38	94°C 15 segundos 59°C 30 segundos 72°C 1 minuto
1	72°C 10 minutos

- 5 Continuar con la amplificación de ADN en un termociclador Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700 o Eppendorf Mastercycler Gradient usando los siguientes parámetros de ciclación. El termociclador MJ Engine o Eppendorf Mastercycler Gradient se pondría en funcionamiento en el modo calculado. Poner en funcionamiento el termociclador Perkin-Elmer 9700 con la escala de velocidad fija al máximo.

Ejemplo 5

- 10 El análisis de transferencia Southern se realizó en el ADN genómico que se aisló a partir del MON88017 y del tejido del maíz de control como se describe en el Ejemplo 3. La cuantificación de muestras de ADN se realizó usando un Fluorómetro Hoefer DyNA Quant 200 (Pharmacia, Uppsala, Suecia) con el marcador de tamaño molecular IX de Roche como un patrón de calibración de ADN.

- 15 Aproximadamente se usaron 20 µg de ADN genómico de la sustancia de ensayo y 10 µg de ADN genómico de la sustancia de control para las digestiones con enzimas de restricción. Para el análisis de la estabilidad del inserto, se usaron aproximadamente 10 µg de ADN genómico de la sustancia de ensayo. La digestión durante la noche se

realizó a 37 °C en un volumen total de ~ 500 µl usando 100 unidades de la enzima de restricción apropiada. Después de la digestión, las muestras se precipitaron mediante la adición de un volumen 1/10 (50 µl) de NaOAc 3 M (pH 5,2) y 2 volúmenes (1 ml relativo al volumen de digestión original) de etanol al 100%, seguido de incubación en un congelador a -20 °C durante al menos 30 minutos. El ADN digerido se sedimentó a la máxima velocidad en una microcentrífuga, se lavó con etanol al 70%, se secó, y se redisolvió en tampón TE.

Las sondas de ADN se prepararon mediante amplificación por PCR de la parte del casete de expresión de la planta de la molde de ADN pMON53616. Aproximadamente 25 ng de cada sonda (excepto las secuencias de poliadenilación 3' NOS y 3'Tahsp17) se marcaron con ³²P-dCTP (6000 Ci/mmol) mediante un procedimiento de cebado aleatorio (RadPrime DNA Labeling System, Life Technologies). Las secuencias de poliadenilación 3' NOS y 3' Tahsp17 se marcaron mediante PCR usando 25 ng de la molde de la sonda de ADN de la siguiente manera: cebadores sentido y antisentido específicos para la molde (0,25 mM cada uno); 1,5 mM MgCl₂; 3 mM de cada dATP, dGTP y dTTP; ~ 100 mCi de 32P-dCTP (6000 Ci/mmol); y 2,5 unidades de ADN polimerasa Taq en un volumen final de 20 µl. Las condiciones del ciclo fueron las siguientes: 1 ciclo a 94 °C durante 3 minutos; 2 ciclos a 94 °C durante 45 segundos, 52 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 2 minutos; y 1 ciclo a 72 °C durante 10 minutos. Todas las sondas radiomarcadas se purificaron usando una columna de Sephadex G-50 (Roche, Indianapolis, Ind.).

Las moléculas de ADN sintéticas para su uso como sondas para procedimientos de replicación asistida por marcadores o para la detección del ADN MON88017 en una muestra pueden hacerse comprendiendo la secuencia de ADN de la molécula de ADN de unión transgénica/genómica descrita en SEC ID N°: 1 y SEC ID N°: 2 o una parte sustancial de la misma.

Ejemplo 6

Los procedimientos usados para identificar los heterocigotos de la progenie homocigótica que contiene el evento MON88017 se describen en un ensayo de cigosidad para los que se describen ejemplos de condiciones en la Tabla 4 y Tabla 5. Los cebadores de ADN usados en el ensayo de cigosidad son cebadores (SEC ID N°: 30), (SEC ID N°: 31), (SEC ID N°: 32), el cebador marcado con 6FAM® (SEC ID N°: 33) y el cebador marcado con VIC® (SEC ID N°: 34), 6FAM y Vic son productos colorantes fluorescentes de Applied Biosystems (Foster City, Calif) unidos al cebador de ADN.

Cuando las SEC ID N°: 30, SEC ID N°: 31 y SEC ID N°: 32 se usan en estos procedimientos de reacción producen un amplicón de ADN para el maíz no transgénico, dos amplicones de ADN para los heterocigotos de maíz que contienen el ADN del evento MON88017, y un amplicón de ADN para los homocigotos de maíz MON88017 que es distinto de cualquier otra planta de maíz no MON88017. Los controles para este análisis deberían incluir un control positivo de maíz homocigoto y heterocigoto que contiene el ADN del evento MON88017, un control negativo de maíz no transgénico, y un control negativo que no contiene molde de ADN. Este ensayo se optimiza para su uso con un termociclador Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700, o Eppendorf Mastercycler Gradient. Están dentro de la experiencia de la técnica otros procedimientos y aparatos conocidos por los expertos en la técnica que producen amplicones que identifican la cigosidad de la progenie de cruces realizados con las plantas MON88017.

Tabla 4. Soluciones de reacción del ensayo de cigosidad

Paso	Reactivo	Cantidad	Comentarios
1	Nucleasa sin agua	añadir a 10 ml de volumen final	-
2	Universal Master Mix 2X (número de catálogo 4304437 de Applied Biosystems)	5 µl	concentración final 1X
3	Cebadores SEC ID N°: 30, 31, y 32 (resuspendidos en nucleasa sin agua a una concentración de 20 µM)	0,5 µl	concentración final de 0,25 µM
4	Cebador 6FAM™ (resuspendido en nucleasa sin agua a una concentración de 10 µM)	0,2 µl	concentración final de 0,4 µM
5	Cebador VIC™ (resuspendido en nucleasa sin agua a una concentración de 10 µM)	0,2 µl	concentración final de 0,15 µM

(continuación)

Paso	Reactivo	Cantidad	Comentarios
6	Polimerasa de ADN REDTaq (1 unidad/ μ l)	1.0 μ l (recommended to switch pipets prior to next step)	1 unidad/reacción
7	ADN extraído (molde): • Muestras a analizarse (hojas individuales) • Control negativo • Control negativo • Control positivo • Control positivo	3,0 μ l • 4-80 ng de ADN genómico • 4 ng de ADN genómico no transgénico del maíz • molde sin ADN (solución en la que el ADN se resuspendió) • 4 ng de ADN genómico de un evento conocido de maíz heterocigoto MON88017 • 4 ng de ADN genómico de un evento conocido de maíz homocigótico MON88017	Diluido en agua
8	Mezclar suavemente y añadir 1-2 gotas de aceite mineral en la parte superior de cada reacción		

Tabla 5. Condiciones del termociclador del ensayo de cigosidad

Nº de ciclo	Ajustes: Stratagene Robocycler	
1	94°C	3 minutos
38	94°C	1 minuto
	60°C	1 minuto
	72°C	1 minuto y 30 segundos
1	72°C	10 minutos
Nº de ciclo	Ajustes: MJ Engine o Perkin-Elmer 9700	
1	94°C	3 minutos
38	94°C	30 segundos
	60°C	30 segundos
	72°C	1 minuto y 30 segundos
1	72°C	10 minutos
Nº de ciclo	Ajustes: Eppendorf Mastercycler Gradient	
1	94°C	3 minutos
38	94°C	15 segundos
	60°C	15 segundos
	72°C	1 minuto y 30 segundos
1	72°C	10 minutos

- 5 Continuar con la amplificación del ADN en un termociclador Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700 o Eppendorf Mastercycler Gradient usando los siguientes parámetros de ciclación. Cuando se ejecuta la PCR en el Eppendorf Mastercycler Gradient o MJ Engine, el termociclador se debe ejecutar en el modo calculado. Cuando se ejecuta la PCR en el Perkin-Elmer 9700, ejecute el termociclador con la escala de velocidad ajustada al máximo.

- 10 Se realizó un depósito de semillas de maíz MON88017, descrito anteriormente y enumerado en las reivindicaciones, en el marco del Tratado de Budapest con la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110. El número de acceso es ATCC PTA-5582. El depósito se mantendrá en el depósito por un período de 30 años, o 5 años después de la última solicitud, o durante la vida efectiva de la patente, lo que sea más tiempo, y será reemplazado según sea necesario durante ese período.

Ejemplo 7

Los productos, tales como los productos alimenticios y las materias primas, pueden producirse a partir del evento del maíz MON88017, y tales productos alimenticios y materias primas se espera que contengan secuencias de nucleótidos que, si se detectan en niveles suficientes en dichos productos alimenticios y materias primas, pueden ser diagnóstico para detectar la presencia de materiales del evento del maíz MON88017 dentro de tales materias primas y productos alimenticios. Ejemplos de tales productos alimenticios y materias primas incluyen pero no se limitan a aceite de maíz, maicena de maíz, harina de maíz, gluten de maíz, tortas de maíz, almidón de maíz, y cualquier otro producto alimenticio destinado para el consumo como fuente de alimento para un animal o en otro caso, destinados como un agente aumentador de tamaño, o un componente destinado como en un componente en una composición de maquillaje para uso cosmético, etc. Puede desarrollarse un procedimiento de detección de ácido nucleico y/o kit basado en una sonda o un par de cebadores en el que la secuencia de la sonda o la secuencia de los cebadores se seleccionan de entre el grupo de secuencias como se establece en SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, y SEC ID N°: 5 que permite la detección de una secuencia de nucleótidos de MON88017 tales como SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 2 en una muestra biológica, y tal detección sería de diagnóstico para el evento de maíz MON88017 en tal muestra.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Monsanto Technology LLC Beazley, Kim Coombe, Tim Groth, Mark Hinchey, Terri Pershing, Jay Vaughn, Ty Zhang, Bei

<120> Planta de maíz MON88017 y composiciones y procedimientos de detección de la misma

<130> 38-15(53143)

<150> 60/529.477

<151> 15-12-2003

<160> 34

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> ADN quimérico del genoma de *Zea mays* e inserto transgénico que no es de *Zea mays*

<400> 1

tgacggtgac gatatttca 20

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> ADN quimérico del genoma de *Zea mays* y ADN de inserto transgénico que no es de *Zea mays*

<400> 2

cagtttaaag agagtcgggt 20

<210> 3

<211> 1461

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> ADN quimérico del genoma de *Zea mays* y ADN de inserto transgénico que no es de *Zea mays*,

<400> 3

ES 2 542 688 T3

gaccagcgte tcccgcgcga cccgcagtct gcaccgtaga gatcggatgt acaggcatgt 60
 agcattaggg tattcagogg ctctcgtatc ttattcccta ccatctatct tatctacact 120
 gtataatact cctccggttt attgtttatt tgcgttgaa tagttcaata tttgcaactgt 180

ccagcgacaa ctaaaatgaa acggagttag gtagtgtttt gtacaaccat atatagaggt 240
 gcccaaacgg gcggcccgcc ccgggcccggt caggcccgac ggttaatcgg gcggtgcccg 300
 gccggcccg tgccgtagcc gtggcccgagg caggcggtgc cgggccagcc gtttaactgg 360
 tcacgtttct ccgcctaact gaaggacact aaccaatata actcgtgagc atttgttgta 420
 aatagctaata ataaaatgta aatatatata ctatgtttta taaaataaaa aatatataat 480
 cgtgccggcc aggcgggcac tgcgggcaa gacagcgcc caagcacgtc acggttctcg 540
 tgcggggccg gccccggcat cgtgtttcag gccggtccgt taggcacggc tcatttgccc 600
 ctctataacc atatataata ttcacgagc accttgggct aaggcagacc gacggccgcc 660
 ctaggccccca gatctataga ggcttaatgc taaatataaa ttcagtagtt agactatcaa 720
 tgtatgatat aatagtttag caacaaaata ctaaagaatt tatggctacg atgttttcat 780
 aatccgatct tatctaaaca tgtagaagg aaatttttaa gtaatattat aatatgtatc 840
 tttttattta cttattgctt gatatagata ttttgatct atcttaagtg ttttatattg 900
 ataataattta tgtatataaa gaattagaat agtcctattt taaattttgt cctgaacccc 960
 taaaatccca ggaccgcac ctatcatata catacatgat cttctaaata ccgatcaga 1020
 gcgctaagca gcagaatcgt gtgacaacgc tagcagctct cctccaacac atcatcgaca 1080
 agcacctttt ttgcggagt atgacggtga cgatatatto aattgtaaat ggcttcatgt 1140
 ccgggaaatc tacatggatc agcaatgagt atgatggtca atatggagaa aaagaaagag 1200
 taattaccaa ttttttttca attcaaaaat gtagatgtcc gcagcgttat tataaatga 1260
 aagtacattt tgataaaacg acaaattacg atccgtcgta tttataggcg aaagcaataa 1320
 acaaattatt ctaattcgga aatctttatt tcgacgtgtc tacattcacg tccaaatggg 1380
 ggcttagatg agaaaacttca cgatttggcg cgccaaagct tactcgaggt cattcatatg 1440
 cttgagaaga gactcgggat a 1461

<210> 4

<211> 3525

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> ADN quimérico del genoma de *Zea mays* y ADN de inserto transgénico que no es de *Zea mays*

<400> 4

ES 2 542 688 T3

caaactccac atgggcttct cgggcgacaa gaatgaactg atcattggtg ctgagtcctt	60
cgtctccaac gagaagatct acatcgacaa gatcgagttc atccccgtcc agctgtgata	120
ggaactctga ttgaattctg catgcgtttg gacgtatgct cattcagggtt ggagccaatt	180
tggttgatgt gtgtgcgagt tcttgcgagt ctgatgagac atctctgtat tgtgtttctt	240
tccccagtgt tttctgtact tgtgtaatcg gctaataccc aacagattcg gcgatgaata	300

aatgagaaat aaattgttct gattttgagt gcaaaaaaaaa aggaattaga tctgtgtgtg	360
ttttttggat ccccggggcg gccgctcgag caggacctgc agaagctage ttgatgggga	420
tcagattgtc gtttcccgcc ttcagtttaa acagagtcgg gtttggatgg tcaactccgg	480
catactgccg aaaacaaacc aatccgtcac cgtcaaggcc ccgcaccgct ggccgcacgc	540
aggaaaaata agttgcgacc gcgagcgggc gaatcagaaa gggcgtccgg ccttggtcag	600
acacgacagc gacgcggaaa ggctgcgcc gccgtgccat ctacaagggt ccacgccat	660
ccaaaaagag cggtgccctg gaattctccc tcgtgttcct acttcctacg cgaagggaagc	720
caggcagggtg cgcagctttt ccaaccttcc accctccccg tgcggcgctc ccacgctgag	780
tcgctgaccg ctgcgcctc tottgcctc ctctcactc gccgcgtcct ccgcagcaca	840
gcccactcgc atcggatcgc gcgcggggag cggcatggcc ggcgacgacg gcagcggcgg	900
gagcggaggc ggcaacaggg aggacgaggt ccacgtgcag atcgcaggtc agtgtcagtc	960
ctccgctcgt tctctctctc tccgacggac agtgtgaact atgtcgggtc gtcgttgagg	1020
atgcgatgag aggagcgcgg gaaggactgt cgtagattgg atttgctctg cagtgcgtgg	1080
gtagccccga gtccccgaca catgttcttt tttctcgggt tatgtcagcg gcggtacgtc	1140
gttggaacgc tcaagcgcga gaggtgttcg atgaattacc ttctgggtgtg tggcgtaccg	1200
gtgggtcagt ggggtttttg gttcgtgtac gggatttggg gttgggggtc atctcccttc	1260
ttcagtgcgc gcgtcacga gtcacggctg tcttgtgatt gctgcactc tgccatgtgc	1320
tcgtgcgtgc gttttcagtt actggccatt gacactgagt gaatgttcgg ttggtcgtcc	1380
gatagggttg gttcagctgt taattacgac tccaagtatc tgaaacattt catgaggatg	1440
tgtagggaac ctactttat gaacttcaat ggccaggcca ggctgtatt atctttttct	1500
tgtttgggaa taatgatgtg agctttaggg gagcagcgtc gcttcttctt tttttttct	1560
ccagaaaaag tcatagatat accgtggaca atttctttgt gtgcggtaat tttagagcac	1620
tgtgggtttg tgccctgttc gtcaggaaaa gtacccaagc tgggatttca cttgggtcta	1680
agaaaccagc gtttcagttt ggggggtctc ctggtaccct gaagtgccta ccatttatag	1740
ttcccgatg acctgttcat aatgccttct gtatgttgtt tgcaggatca tccaaacctg	1800
aaacctcatc taccaacgaa acagctctc aaaaactctca taccaagcat tggcattggt	1860
ggctgatggt aactctgaac attttcttcc tcgttgctgg tcagacagca tcgacactcc	1920
ttggcagggt ctactacaac caagggtgaa atagcaagtg gatgtccaca tttgtccaaa	1980
ccgctggctt tcagtgctg ttcgtgcgcc tatatctgtt ccgttcaaaa tcgccttcta	2040
cacaaacaac caccagtaac cctgagactt ctgtccacaa aattactctt atatatgttg	2100
tcttgggcct catcattgct gccgatgact tgatgtattc ctatggcctg ttgtaccttc	2160
ctgtatcaac atattcgtc atttgcgcta gtcagctggc cttcaatgct gtcttctcat	2220

atgtcctaaa tgctcaaaag ttcaccccat tcattttcaa ctcagtaatt ctcccttactt 2280
 ttcccgctgc gcttcttgga gttgaogaag attctcaggg taccaatggg ttatogcgtg 2340
 ggaagtacat attgggtttc gcattgaccc taggagcctc ggccacatac tcaactaattc 2400
 tctctctaata gcaagtcgca ttogagaagg ttattaagaa ggaaactttc tcagtcgtgt 2460
 tgaatatgca gatataata gcaactagtg caacagtagc ttctcttatac ggttttatttg 2520
 caagcggoga gtggaagact ttagagggag agatgcatgc cttcagctca gggagggtgt 2580
 cctatgtgat gacacttcta tggactgctg tatcttgga gatagcttcc gtaggagtgg 2640
 tgggtttgat ctttgttggt tcatcaactct tttcaaagt gataagcaca ctggctctac 2700
 ccatcattcc gatttttggc gtgattttct tccacgacaa gatggatgga gtgaagatta 2760
 ttgctatggt gatggccatc tggggattcg tttcatatgg atatcaatta tatgtcagtg 2820
 acaagaaggc taggaagact tcagtcagtg tggaggagaa ttctaagcg cttgttggcc 2880
 tgttacattg gtcttttggt ctccataacc actttaagtt gctggatttg aggaggtact 2940
 agttattgac ttattgtatc caaaaggagc tcagttgaga atctcaggtt tacacaattc 3000
 ataggtatat acttctgtta gtattgtcat atcatcatat gtaccgatgt acggttgtgt 3060
 tgtcctttaa aataaaaaaga ttagcatttc cagaggcatg ctctctagat ttctaattgc 3120
 cttaaatatt ttcttgccct tgttttggtt tttttttttt gctattaact gtgatttgtg 3180
 attctatggg ttgacatata gtatttctag gtgggtgtgca tgcctgacct gcttattcta 3240
 ctatgaatta aatgcagtat aggtccatta acttttgcat gcgagcttct tggtgaaagc 3300
 cctgcgtggg ttggttttga taactgagtg acagttagta aagggttttt gtgtaccaca 3360
 ttttcttagt gttcttcact ccaaatttga taggogaggc tcgatcttat tcagttgctt 3420
 ggctttcctt gttataacgc ctcagctaata ctggctttgt ttccttatgc ataccttctg 3480
 taatctaaca ccaaaccaca gatgttgcac gtccattctc catgg 3525

<210> 5

<211> 7450

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> ADN quimérico del genoma de *Zea mays* y ADN de inserto transgénico que no es de *Zea mays*

<400> 5

taccgatca gagcgctaag cagcagaatc gtgtgacaac gctagcagct ctccccaac 60
 acatcatoga caagcacctt ttttgccgga gtatgacggg gacgatatat tcaattgtaa 120
 atggcttcat gtcgggaaa tctacatgga tcagcaatga gtatgatggg caatatggag 180
 aaaaagaaag agtaattacc aatttttttt caattcaaaa atgtagatgt ccgcagcgtt 240

attataaaat gaaagtacat tttgataaaa cgacaaatta cgatccgtcg tatttatagg	300
cgaaagcaat aaacaaatta ttctaattcg gaaatcttta tttcgacgtg tctacattca	360
cgtccaaatg ggggcttaga tgagaaactt cactgatttg cgcgccaaag cttactcgag	420
gtcattcata tgcttgagaa gagagtcggg atagtccaaa ataaaacaaa ggtaagatta	480
cctggtcaaa agtgaaaaca tcagttaaaa ggtggtataa agtaaaatat cggtataaaa	540
aggtggccca aagtgaattt tactcttttc tactattata aaaattgagg atgtttttgt	600
cggtactttg atacgtcatt tttgtatgaa ttgggtttta agttttattcg cttttggaaa	660
tgcatactcg tatttgagtc gggttttaag ttcgtttgct ttigttaaata cagagggatt	720
tgtataagaa atatcttttag aaaaacccat atgctaattt gacataattt ttgagaaaaa	780
tatatattca ggcgaattct cacaatgaac aataataaga ttaaaatagc tttccccgt	840
tgacgagcat gggatattttt tctagtataa ataaaagata aacttagact caaacattt	900
acaaaaacaa cccctaaagt tcttaaagcc caaagtgcta tccacgatcc atagcaagcc	960
cagcccaacc caacccaacc caaccaccc cagtccagcc aactggacaa tagtctccac	1020
acccccccac tatcacgtg agttgtccgc acgcaccgca cgtctcgag ccaaaaaaaa	1080
aaagaaagaa aaaaaagaaa aagaaaaaac agcaggtggg tccgggtcgt gggggccgga	1140
aacgogagga ggatcgcgag ccagcgacga ggccggccct cctccgctt ccaaagaaac	1200
gccccccatc gccactatat acataccccc cctctctctc ccatccccc aacctacca	1260
ccaccaccac caccacctc acctctctcc cctctcgtgc cggacgacga gctctctccc	1320
cctccccctc cgcgcgcgc gcgcggtaa ccaccccgcc cctctctctt ttctttctcc	1380
gttttttttt cgtctcggg ctcgatcttt ggccttggtg gtttggtgg gcgagaggcg	1440
gcttcgtgcg cgcacagatc ggtgcgcggg aggggcggga tctcgcggt ggggtctctg	1500
cggcggtgga tccggcccg atctcgcggg gaatggggct ctcggatgta gatctcgat	1560
cgcgcgttgt tgggggagat gatggggggg ttaaaatttc cgcggtgcta aacaagatca	1620
ggaagagggg aaaagggcac tatggtttat atttttatat atttctgctg cttcgtcagg	1680
cttagatgtg ctagatcttt ctttctctt tttgtgggta gaatttgaat cctcagcat	1740
tgttcacogg tagtttttct tttcatgatt tgtgacaaat gcagcctcgt gcggagcttt	1800
tttgtaggta gaagtgatca accatggcgc aagttagcag aatctgcaat ggtgtgcaga	1860
acccatctct tatctccaat ctctcgaaat ccagtcaacg caaatctccc ttatcggttt	1920
ctctgaagac gcagcagcat ccacgagctt atccgatttc gtcgtcgtgg ggattgaaga	1980
agagtgggat gacgttaatt ggctctgagc ttcgtctct taaggtcatg tcttctgttt	2040
ccaaggcgtg catgcttcac ggtgcaagca gccggccgc aaccgcccgc aaatctctg	2100
gcctttccgg aaccgtccgc attccggcg acaagtcgat ctcccacgg tccttcattg	2160

toggcggtct	cgcgagcgg	gaaacgcgca	tcaccggcct	tctggaaggc	gaggacgtca	2220
tcaatacggg	caaggccatg	caggcgatgg	gcgcccgcct	cogtaaggaa	ggcgacacct	2280
ggatcatcga	tggcgctcgg	aatggcggcc	tcttggcgcc	tgaggcgccg	ctcgatttcg	2340
gcaatgcgcg	cacgggctgc	cgctgaacga	tgggcctcgt	cggggtctac	gatttcgaca	2400
gcaccttcac	cggcgacgcc	tcgtcacaaa	agcgcccgat	ggcgccgctg	ttgaaccgcg	2460
tgcgcgaaat	gggcgtgcag	gtgaaatcgg	aagacggtga	cogtcttccc	gttaccttgc	2520
gggggcggaa	gacgcgcagc	cgatcacct	accgcgtgcc	gatggcctcc	gcacaggtga	2580
agtcgcgcgt	gctgctcgcc	ggcctcaaca	cgcccgccat	cacgacggtc	atcgagccga	2640
tcatgacgcg	cgatcatacg	gaaaagatgc	tgcagggctt	tggcgccaac	cttacgctcg	2700
agacggatgc	ggacggcgtg	cgcaccatcc	gcctggaagg	cgcgggcaag	ctcaccggcc	2760
aagtcacaga	cgtgcggggc	gacccgtcct	cgaaggcctt	cccgctgggt	gcggccctgc	2820
ttgttcgggg	ctccgacgtc	accatcctca	acgtgctgat	gaaccccacc	cgcaccggcc	2880
tcatcctgac	gctgcaggaa	atgggcgcgc	acatcgaagt	catcaaccgc	cgccttgccg	2940
ggggcgaaga	cgtggcggac	ctgcgcgttc	gctcctccac	gctgaagggc	gtcacggtgc	3000
cggaagaccg	cgcgccttcg	atgatcgacg	aatatccgat	tctcgctgtc	gcgcgcgcct	3060
tgcggaagg	ggcgaccgtg	atgaacggtc	tggagaact	cgcgtcaag	gaaagcgacc	3120
gcctctcggc	cgtcgccaat	ggcctcaagc	tcaatggcgt	ggattgcgat	gagggcgaga	3180
cgtcgctcgt	cgtgcgtggc	cgccctgacg	gcaaggggct	cggaacgcc	tcgggcgcgc	3240
cgtcgccac	ccatctcgat	caccgcatcg	ccatgagctt	cctcgtcacg	ggcctcgtgt	3300
cggaaaaccc	tgtcacggtg	gacgatgcc	cgatgatcgc	cacgagcttc	cgggagttca	3360
tggacctgat	ggcggggctg	ggcggaaga	togaactctc	cgatacgaag	gctgcctgat	3420
gagctcgaat	tcccgatcgt	tcaaacattt	ggcaataaag	tttcttaaga	ttgaatcctg	3480
ttgcgggtct	tgcgatgatt	atcatataat	ttctgttgaa	ttacgttaag	catgtaataa	3540
ttaacatgta	atgcatgacg	ttatttatga	gatgggtttt	tatgattaga	gtcccgaat	3600
tatacattta	atacgcgata	gaaaacaaaa	tatagcgcg	aaactaggat	aaattatcgc	3660
gcggggtgtc	atctatgtta	ctagatcggg	gatttgcggc	cgcgttaaca	agcttctgca	3720
ggtccgattg	agacttttca	acaaagggtg	atatccggaa	acctcctcgg	attccattgc	3780
ccagctatct	gtcactttat	tgtgaagata	gtggaaaagg	aaggtggctc	ctacaaatgc	3840
catcattgcg	ataaaggaaa	ggccatcgtt	gaagatgcct	ctgccgacag	tggtcccaaa	3900
gatggacccc	caccacagag	gagcatcgtg	gaaaaagaag	acgttccaac	cacgtcttca	3960
aagcaagtgg	attgatgtga	tggtccgatt	gagacttttc	aacaaagggt	aatatccgga	4020
aacctcctcg	gattccattg	cccagctatc	tgtcaacttta	ttgtgaagat	agtggaaaag	4080

gaaggtggct cctacaaatg ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc	4140
tctgccgaca gtggtcccaa agatggaccc ccacccaaga ggagcatcgt ggaaaaagaa	4200
gacgttccaa ccacgtcttc aaagcaagtg gattgatgtg atatctccac tgacgtaagg	4260
gatgacgcac aatcccacta tccttcgcaa gacccttctt ctatataagg aagttcattt	4320
catttgagaga ggacacgctg acaagctgac tctagcagat cctotagaac catcttccac	4380
acactcaagc cacactattg gagaacacac agggacaaca caccataaga tccaagggag	4440
gcctccgccc cgcgcggtaa ccaccccgcc cctctctctt ttctttctcc gttttttttt	4500
ccgtctcggt ctgatcttt ggcttggtta gtttggttg gcgagaggcg gcttcgtgcg	4560
cgcccagatc ggtgcgcggg aggggcggga tctcgcggtt ggggctctcg ccggcgtgga	4620
tccggcccgg atctcgcggg gaatggggct ctcgatgta gatctgcgat ccgcggttgt	4680
tgggggagat gatggggggt ttaaaatttc cgcctgcta aacaagatca ggaagagggg	4740
aaaagggcac tatggtttat atttttatat atttctgtg ctctgtcagg cttagatgtg	4800
ctagatcttt ctttcttctt tttgtgggta gaatttgaat cctcagcat tgttcacgg	4860
tagtttttct tttcatgatt tgtgacaaat gcagcctcgt gcggagcttt tttgtaggta	4920
gaagtgatca accatggcca accccaacaa tcgctccgag caagacaga tcaaggtcac	4980
ccccaactcc gagctccaga ccaaccacaa ccagtaccgg ctggccgaca accccaactc	5040
caccctggaa gagctgaact acaaggagtt cctgcgcagt accgaggact cctccacgga	5100
ggtcctggac aactccaccg tcaaggacgc cgtcgggacc ggcatctccg tcgttgggca	5160
gatcctgggc gtcgttggcg tccccttcgc aggtgtcttc acctccttct accagtcctt	5220
cctgaacacc atctggcctt ccgacgccga cccttggaa gcttccatgg cccaagtcga	5280
agtctgatc gacaagaaga tcgaggagta cgcgaagtc aaggccctgg ccgagctgca	5340
aggcctgcaa aacaacttcg aggactacgt caacgcgctg aactcctgga agaagacgcc	5400
tctgtccctg cgtccaagc gctcccagga ccgcctccg gagctgttct ccagggccga	5460
gtcccacttc cgcaactcca tgccgtcctt cgcgctctcc aagttcgagg tctgttctt	5520
gcccaccta gcccaggctg ccaacaccca cctcctgttg ctgaaggacg cccaggtctt	5580
cggcgaggaa tggggctact cctcggagga cgtcgcgag ttctacgct gccagctgaa	5640
gctgacccaa cagtacaccg accactgcgt caactggtac aacgtgggc tgaacggcct	5700
gaggggctcc acctacgac catgggtcaa gttcaaccgc ttccgcaggg agatgacct	5760
gaccgtcctg gacctgatc tctgttccc cttctacgac atccgcctgt actccaagg	5820
cgtcaagacc gagctgatc gcgacatctt caccgacccc atcttctgc tcacgacct	5880
ccagaagtac ggtccacct tctgtccat cgagaactcc atccgcaagc cccacctgtt	5940
cgactaccto cagggcatcg agttccacac gcgcctgagg ccaggctact tcggcaagga	6000

ctccttcaac tactggtecg gcaactacgt cgagaccagg cctccatcg gctcctcgaa 6060
gacgatcacc tcccccttct acggcgacaa gtccaccgag cccgtccaga agctgtcctt 6120
cgacggccag aagggtctacc gcaccatcgc caacaccgac gtcgcggtt ggccgaacgg 6180
caagggtctac ctggggctca cgaaggctga cttctcccag tacgatgacc agaagaacga 6240
gacctccacc cagacctacg actccaagcg caacaatggc cacgtctcgg cccaggactc 6300
catcgaccag ctgccgcctg agaccactga cgagcccctg gagaaggcct actcccacca 6360
gctgaactac gcggagtgtt tcttgatgca agaccgcagg ggcaaccatc ccttcttcac 6420
ctggaccacac cgctccgtcg acttcttcaa caccatcgac gccgagaaga tcaccagct 6480
gcccggtggtc aaggcctacg cctgtcctc ggggtgcctc atcattgagg gtccaggctt 6540
caccggtggc aacctgctgt tcttgaagga gtccctgaac tccatcgcca agttcaaggt 6600
caccctgaac tccgctgcct tgctgcaacg ctaccgcgtc cgcctccgtc accctccac 6660
cacgaacctg cgctgttcg tccagaactc caacaatgac ttctggtca tctacatcaa 6720
caagaccatg aacaaggacg atgacctgac ctaccagacc ttcgacctcg ccaccacgaa 6780
ctccaacatg ggcttctcgg ggcacaagaa tgaactgac attggtgctg agtcttctgt 6840
ctccaacgag aagatctaca tcgacaagat cgagttcatc cccgtccagc tgtgataggc 6900
actctgattg aattctgcat gcgtttggac gtatgctcat tcagggttga gccaatgtg 6960
ttgatgtgtg tgcgagttct tgcgagtctg atgagacatc tctgtattgt gtttctttcc 7020
ccagtgtttt ctgtacttgt gtaatcggct aatcgccaac agattcggcg atgaataaat 7080
gagaaataaa ttgttctgat tttgagtgc aaaaaaaagg aattagatct gtgtgtgttt 7140
tttgatccc cgggcgggc gctcgagcag gacctgcaga agctagcttg atggggatca 7200
gattgtcgtt tccgccttc agtttaacaa gagtcgggtt tggatggtca actccggcat 7260
actgccgaaa acaaaccaat ccgtcaccgt caaggccccg caccgctggc cgcacgcagg 7320
aaaaataagt tgcgaccgcg agcgggcgaa tcagaaaggg cgtccggcct tggtcagaca 7380
cgacagcgac gcggaaaggc tgcgcccgcg gtgccatcta caagggtcca cgtccatcca 7440
aaaagagcgg 7450

<210> 6
<211> 21
<212> ADN
<213> *Zea mays*

<400> 6
ctgaaccct aaaatcccag g 21

<210> 7
<211> 30
<212> ADN
<213> *Oryza sativa*

<400> 7
cctttgttt atttggact atcccagctc 30

	<210> 8		
	<211> 40		
	<212> ADN		
	<213> <i>Triticum aestivum</i>		
5	<400> 8		
	ctgatgagac atctctgtta ttgtgtttct ttcccagtg	40	
	<210> 9		
10	<211> 30		
	<212> ADN		
	<213> <i>Triticum aestivum</i>		
	<400> 9		
15	tgtaatcggc taatcgccaa cagattcggc	30	
	<210> 10		
	<211> 32		
	<212> ADN		
20	<213> <i>Triticum aestivum</i> .		
	<400> 10		
	cggccgctcg agcaggacct gcagaagcta gc	32	
25	<210> 11		
	<211> 33		
	<212> ADN		
	<213> <i>Triticum aestivum</i>		
	<400> 11		
30	gatggggatc agattgtcgt ttccgcctt cag	33	
	<210> 12		
	<211> 27		
35	<212> ADN		
	<213> <i>Oryza sativa</i>		
	<400> 12		
40	cactttgggc caccttttat taccgat	27	
	<210> 13		
	<211> 29		
	<212> ADN		
	<213> <i>Oryza sativa</i>		
45	<400> 13		
	ctgatgttt cactttgac caggtaatc	29	
	<210> 14		
50	<211> 28		
	<212> ADN		
	<213> <i>Oryza sativa</i>		
	<400> 14		
55	taattactct ttcttttct ccatattg	28	
	<210> 15		
	<211> 26		
	<212> ADN		
60	<213> <i>Oryza sativa</i>		
	<400> 15		
	catactcatt gctgatccat gtagat	26	
65	<210> 16		
	<211> 24		

	<212> ADN	
	<213> <i>Zea mays</i>	
5	<400> 16 cctattttaa atttgcct gaac	24
	<210> 17	
	<211> 27	
10	<212> ADN	
	<213> <i>Oryza sativa</i>	
	<400> 17 gatcgtggat agcactttgg gctttag	27
15	<210> 18	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> <i>Zea mays</i>	
20	<400> 18 accgccacct atcatataca tacatgatc	29
	<210> 19	
25	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> <i>Oryza sativa</i>	
	<400> 19 aggtagccca aagtgaatt tactctt	27
30	<210> 20	
	<211> 28	
	<212> ADN	
35	<213> <i>Arabidopsis thaliana</i>	
	<400> 20 gcagatctac atccgagagc cccattcc	28
40	<210> 21	
	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> <i>Oryza sativa</i>	
45	<400> 21 tcgatcttg gccttgtag ttgggtg	28
	<210> 22	
	<211> 28	
50	<212> ADN	
	<213> <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	
	<400> 22 gctcatcagg cagccttcgt atcgggag	28
55	<210> 23	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	
60	<400> 23 ctcgatcacc gcatcgccat gagcttc	27
	<210> 24	
65	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> <i>Bacillus thuringiensis</i>	

	<400> 24 aagacctggg cgtccttcag caacagga	28
5	<210> 25 <211> 28 <212> ADN <213> <i>Bacillus thuringiensis</i>	
10	<400> 25 cctggaaggc cttcatggcc caagtcga	28
15	<210> 26 <211> 27 <212> ADN <213> <i>Zea mays</i>	
20	<400> 26 aacagaggcg tgaccggtca gcgactc	27
25	<210> 27 <211> 28 <212> ADN <213> <i>Zea mays</i>	
30	<400> 27 tccttcgct aggaagtagg cacacgag	28
35	<210> 28 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Zea mays</i>	
40	<400> 28 cgtggtgatc acaaacagta	20
45	<210> 29 <211> 21 <212> ADN <213> <i>Zea mays</i>	
50	<400> 29 ctatatgaca gacccatcgt t	21
55	<210> 30 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Zea mays</i>	
60	<400> 30 cacatcatcg acaagcacct	20
65	<210> 31 <211> 22 <212> ADN <213> <i>Zea mays</i>	
	<400> 31 gtatgccgga gttgaccatc ca	22
	<210> 32 <211> 24 <212> ADN <213> <i>Oryza sativa</i>	
	<400> 32	

	ggacatgaag ccattacaa ttga	24
	<210> 33	
	<211> 15	
5	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> cebador marcado para su uso en un ensayo de cigosidad	
	<400> 33	
	tgacggtgac gatat	15
	<210> 34	
15	<211> 15	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> cebador marcado para su uso en un ensayo de cigosidad	
	<400> 34	
	agaaggccgg agtcg	15
25		

REIVINDICACIONES

1. Una planta de maíz, progenie, semilla o parte de la misma, tolerante a glifosato y resistente al gusano de la raíz del maíz, el genoma de dicha planta, progenie, semilla o parte que comprende el inserto transgénico mostrado en la Figura 2 y las secuencias de unión transgénica/genómica de SEC ID Nos: 1 y 2, el inserto transgénico mostrado en la Figura 2 que está presente en el evento de maíz MON88017 depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) con número de acceso PTA-5582.
2. La planta de maíz, progenie, semilla o parte de la misma de la reivindicación 1, en la que el inserto transgénico tiene la secuencia mostrada en la SEC ID N°:5.
3. La planta de maíz, progenie, semilla o parte de la misma de la reivindicación 1 o 2, que son polen, óvulo, semilla, raíces u hojas.
4. La semilla de la planta de maíz de la reivindicación 1, que es una semilla de maíz híbrido en la que al menos un parental es una planta de maíz como se define en las reivindicaciones 1-3.
5. Una molécula de ADN aislada, que
 - (i) es una región transgénica/genómica SEC ID N°: 5 que comprende el ADN de unión transgénico/genómico de SEC ID N°: 1 y SEC ID N°: 2, o el complemento completo de la misma;
 - (ii) es una región transgénica/genómica SEC ID N°: 3 que comprende el ADN de unión transgénico/genómico de SEC ID N°: 1, o el complemento completo de la misma; o
 - (iii) es una región del transgénica/genómica SEC ID N°: 4 que comprende el ADN de unión transgénico/genómico de SEC ID N°: 2, o el complemento completo de la misma.
6. Una molécula de ADN para su uso como una sonda de ADN útil para detectar en una muestra el evento del ADN de maíz MON88017, en la que dicha sonda comprende
 - (i) al menos 16 nucleótidos contiguos de SEC ID N°: 1, o el complemento completo de los mismos, o
 - (ii) al menos 16 nucleótidos contiguos de SEC ID N°: 2, o el complemento completo de los mismos
 e hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con ADN MON88017 y no hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con ADN genómico de la planta de maíz que no es ADN MON88017
7. Un procedimiento para detectar la presencia de una secuencia de nucleótidos del evento de maíz MON88017 en una muestra biológica, comprendiendo el procedimiento:
 - (a) poner en contacto la muestra con un par de cebadores de ADN que comprende una primera molécula de ADN que tiene 11 o más nucleótidos contiguos de la región de ADN transgénica de SEC ID N°: 3 y una segunda molécula de ADN que tiene 11 o más nucleótidos contiguos de la región de ADN genómico del maíz de SEC ID N°: 3, o que comprende una primera molécula de ADN que tiene 11 o más nucleótidos contiguos de la región de ADN transgénica de SEC ID N°: 4 y una segunda molécula de ADN que tiene 11 o más nucleótidos contiguos de la región de ADN genómico del maíz de SEC ID N°: 4, en la que cuando el primer par se usa en una reacción de amplificación de ADN con ADN genómico del evento de maíz MON88017, produce un amplicón que comprende la SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 2, respectivamente;
 - (b) realizar una reacción de amplificación de un ácido nucleico, produciendo de este modo un amplicón, y
 - (c) detectar dicho amplicón,
 en el que dicho amplicón comprende la SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 2.
8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que dicho par de cebadores de ADN comprende la secuencia de nucleótidos como se expone en la SEC ID N°: 6 y SEC ID N°: 7
9. Un procedimiento para detectar la presencia del ADN del evento de maíz MON88017 en una muestra biológica,
 - (I) comprendiendo el procedimiento:
 - (a) poner en contacto la muestra con una sonda que hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con el ADN MON88017 y no hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con el ADN genómico de la planta de maíz que no es ADN MON88017, en la que dicha sonda es, o es completamente complementaria, a una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en la SEC ID N°: 1 y SEC ID N°: 2;
 - (b) someter la muestra y la sonda a condiciones de hibridación rigurosas; y
 - (c) detectar la hibridación de la sonda con el ADN de MON88017, o
 - (II) comprendiendo el procedimiento:
 - (a) poner en contacto la muestra con una sonda en condiciones de hibridación rigurosas, en la que dicha sonda comprende una secuencia de nucleótidos contiguos que es, o es completamente complementaria, a

una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID N°: 1 y SEC ID N°: 2; y
(b) detectar la hibridación de dicha sonda con dicha muestra, en la que la hibridación de dicha sonda con dicha muestra es diagnosticada por la presencia de dicho polinucleótido del evento de maíz MON88017 en dicha muestra.

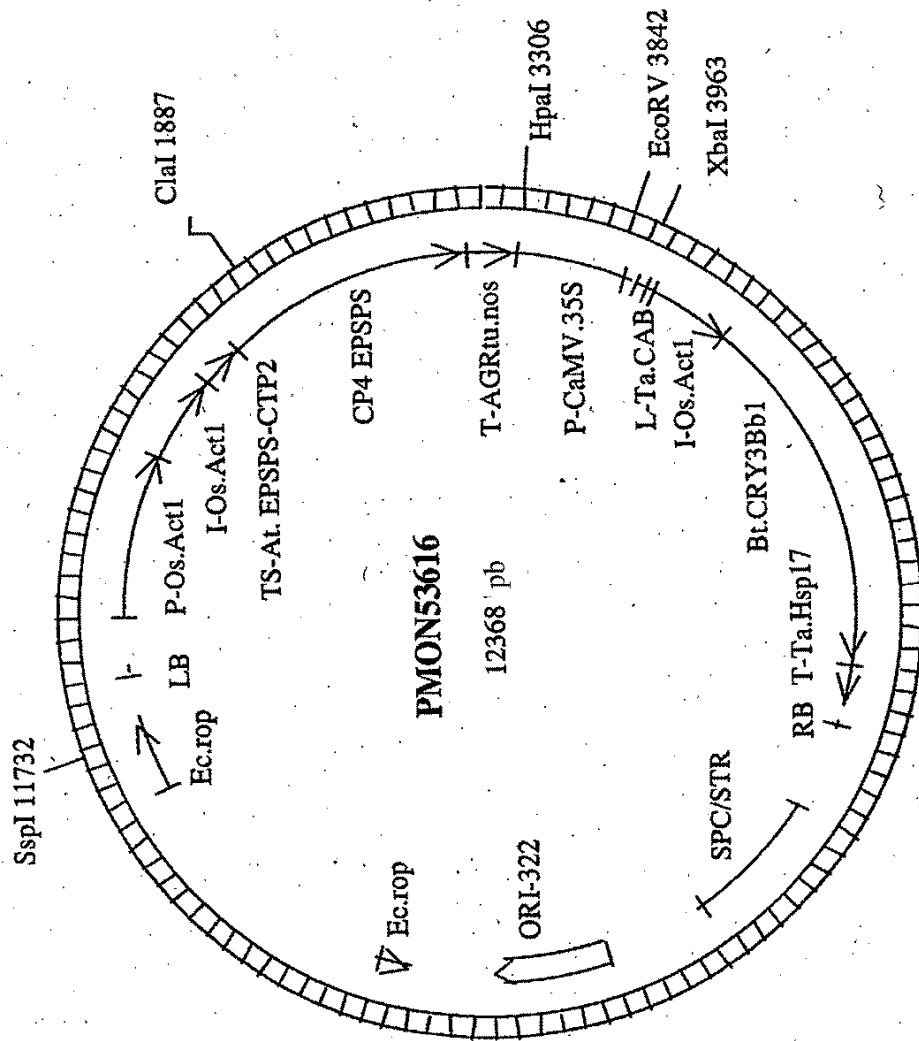


Figura 1

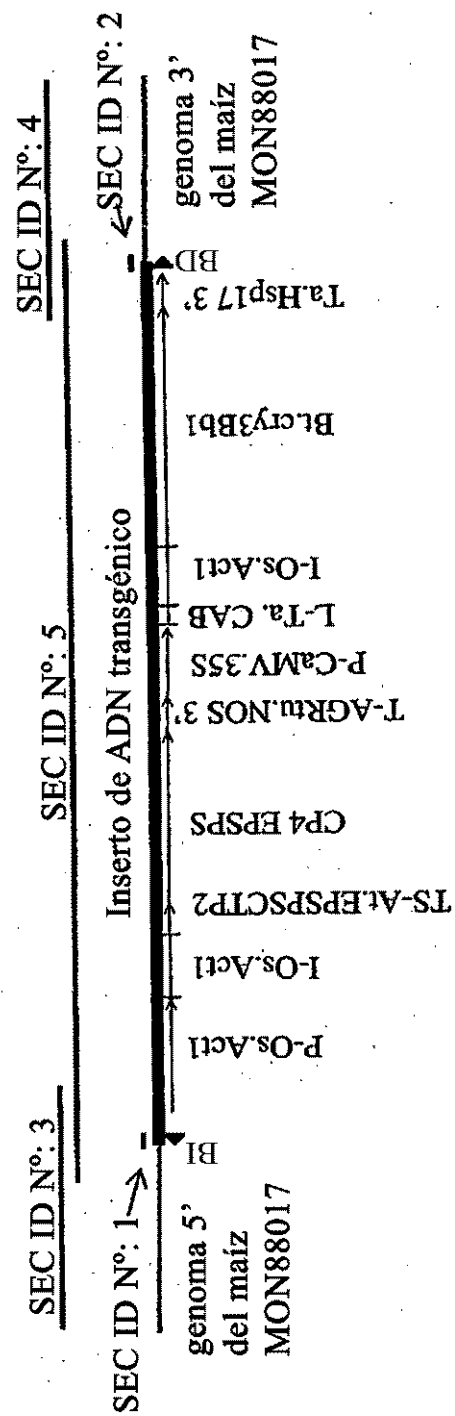


Figura 2

GACCAGCGTCTCCCGCCGCACCCGCAGTCTGCACCGTAGAGATCGGATGTACAGGCA
 TGTAGCATTAGGCTATTCAGCGGCTCTCGTATCTTATTCCTACCATCTATTTTATC
 TACACTGTATAATACTCCCTCCGTTTATTGTTTATTTGTCGTTGAATAGTTCAATAT
 TTGCACTGTCCAGCGACAACATAAATGAAACGGAGTGAGGTAGTGTTTTGTACAACC
 ATATATAGAGGTGCCCAAACGGGCGGCCCGGCCCGGCCCGTCAGGCCCGACGGTTA
 ATCGGGCCGTTGCCCGGCCCGGCCCGTGCCTAGCCGTGGCCAGGCACGGCGTGCCG
 GGCCAGCCGTTTAACTGGTCACGTTCTCCCGCCTAACTGAAGGACACTAACCAATAT
 AACTCGTGAGCATTGTTGTAAATAGCTAATATAAAATGTAAATATATATACTATGT
 TTTATAAAATAAAAAATATATAATCGTGCCGGCCAGGCCGGCACTGCGGGCCAAGAC
 AGCGGCCCAAGCACGTCACGGTTCTCGTGCCGGGCCGGGCCCGGCATCGTGTTCAG
 GCCGGTCCGTTAGGCACGGCTCATTTGGCCCTCTATAACCATATATCATATTCATCG
 ACGACCTTGGGCTAAGGCAGACCGACGGCCGCCCTAGGCCCCAGATCTATAGAGGCT
 TAATGCTAAATATAAATTCAGTAGTTAGACTATCAATGTATGATATAATAGTTTAGC
 AACAAAATACTAAAGAATTTATGGCTACGATGTTTTTCATAATCCGATCTTATCTAAA
 CATGTTAGAAGGAAATTTTAAAGTAATATTATAATATGTATCTTTTTTATTACTTAT
 TGCTTGATATAGATATTTTTTGATCTATCTTAAGTGTTTTATATTGATAATATTTATG
 TATATAAAGAATTAGAATAGTCCTATTTTAAATTTTGTCT**GAACCCCTAAATCCC**
AGGACCGCCACCTATCATATACATACATGATCTTCTAAATACCCGATCAGAGCGCTA
 AGCAGCAGAATCGTGTGACAACGCTAGCAGCTCTCCTCCAACACATCATCGACAAGC
 ACCTTTTTTTGCCGGAGTATGACGGTGACGATATATTCAATTGTAAATGGCTTCATGT
 CCGGGAAATCTACATGGATCAGCAATGAGTATGATGGTCAATATGGAGAAAAAGAAA
 GAGTAATTACCAATTTTTTTTCAATTCAAAAATGTAGATGTCCGCAGCGTTATTATA
 AAATGAAAGTACATTTTGTATAAAACGACAAATTACGATCCGTCGTATTTATAGGCGA
 AAGCAATAAACAAATTATCTAATTCGGAAATCTTTATTTTCGACGTGTCTACATTCA
 CGTCCAAATGGGGGCTTAGATGAGAACTTCACGATTTGGCGCGCCAAAGCTTACTC
 GAGGTCATTCATATGCTTGAGAAGAGAGTCGGGATA

Figura 3

CAAACTCCACATGGGCTTCTCGGGCGACAAGAATGAACTGATCATTGGTGCTGAGTC
 CTTTCGTCTCCAACGAGAAGATCTACATCGACAAGATCGAGTTCATCCCCGTCCAGCT
 GTGATAGGAACCTCTGATTGAATTCTGCGATGCGTTTGGACGTATGCTCATTCAGGTTG
 GAGCCAATTTGGTTGATGTGTGTGCGAGTTCTTGGAGTCTGATGAGACATCTCTGT
 ATTTGTGTTTTCTTTCCCCAGTGTTTTCTGTACTTGTGTAATCGGCTAATCGCCAACAG
 ATTCGGCGATGAATAAATGAGAAATAAATTGTTCTGATTTTGAGTGCAAAAAAAG
 GAATTAGATCTGTGTGTGTTTTTTGGATCCCCGGGGCGGCCGCTCGAGCAGGACCTG
 CAGAAGCTAGCTTGATGGGGATCAGATTGTCTGTTTCCCGCCTTCAGTTTAAACAGAG
 TCGGGTTTTGGATGGTCAACTCCGGCATACTGCCGAAAACAAACCAATCCGTCACCGT
 CAAGGCCCCGCACCGCTGGCCGCACGCAGGAAAAATAAGTTGCGACCGCGAGCGGGC
 GAATCAGAAAGGGCGTCCGGCCTTGGTCAGACACGACAGCGACGCGGAAAGGCTGCG
 CCCGCGGTGCCATCTACAAGGGTCCACGTCCATCCAAAAGAGCGGTGCCCTGGACT
 TCTCCCTCGTGTTCTTACTTCTACGCGAAGGAAGCCAGGCAGGTGCGCAGCTTTTC
 CAACCTTCCACCCCCCGTGCGGCGCTCCACGCTGAGTCGCTGACCGCTCGCGCC
 TCTCTTCGCCTCCTCCTCACTCGCCGCGTCTCCGCAGCACAGCCCACTCGCATCGG
 ATCGCGCGCGGGGAGCGGCATGGCCGGCGACGACGGCAGCGCGGGAGCGGAGGCGG
 CAACAGGGAGGACGAGGTCCACGTGCAGATCGCAGGTGAGTGTGAGTCCTCCGCTCG
 TTCTCTCTCTCTCCGACGGACAGTGTGAACATATGTCGGGTCTGCTTGAGGATGCGA
 TGAGAGGAGCGCGGGAAGGACTGTCTGATAGATTGGATTTGCTCTGCAGTGCCTGGGTA
 GCCCGAGTCCCCGACACATGTTCTTTTTTCTCGGGTTATGTCAGCGCGGTACGTC
 GTTGGAACGCTCAAGCGCGAGAGGTGTTGATGAATTACCTTCTGGTGTGTGGCGTA
 CCGGTGGGTGAGTGGGGTTTTTGGTTCTGTGTACGGGATTTGGGGTTGGGGGTATCT
 CCCTTCTTCAAGTGCAGCGCTCACGAGTACGGCTGTCTTGTGATTGCTGCATCTGT
 GCCATGTGCTCGTGCCTGCGTTTTTCAGTTACTGGCCATTGACACTGAGTGAATGTTT
 GGTGGTCTGTCGATAGGGTTGGTTTCAAGTGTGTAATTACGACTCCAAGTATCTGAAA
 CATTTTCATGAGGATGTGTAGGGAACCTTACTTTATGCACTTCAATGGCCAGGCCAGG
 CCTGTATTATCTTTTTTCTTGTGTTGGGAATAATGATGTGAGCTTTAGGGGAGCAGCGC
 TGCTTCTTCTTTTTTTTTTCTCCAGAAAAAGTCATAGATATACCGTGGACAATTTCT
 TTGTGTGCGGTAATTTTAGAGCACTGTGGGTTTGTGCCCTGTTCTGTCAGGAAAAGTA
 CCAAGCTGGGATTTCACTTGGGTCTAAGAAACCAGCGTTTCAAGTTGGGGGGTCTC
 CTGGTACCCTGAAGTGCTTACCATTATAGTTCCCGGATGACCTGTTTATAATGCCT
 TCTGTATGTTGTTTGCAGGATCATCAAACCTGAAACCTCATCTACCAACGAAACAG
 CTCCTCAAACTCTCATACCAAGCATTGGCATTGGTGGCTGATGGTAACTCTGAACA
 TTTTCTTCTCGTTGCTGGTCAGACAGCATCGACACTCCTTGGCAGGTCTACTACA
 ACCAAGGTGGAAATAGCAAGTGGATGTCCACATTTGTCCAAACCGCTGGCTTTCCAG
 TGCTGTTCTGTCGCCCTATATCTGTTCCGTTCAAAAATCGCCTTCTACACAAACAACCA
 CCAGTAACCTTGAGACTTCTGTACCAAAATTAATCTTATATATGTTGTCTTGGGCC
 TCATCATTTGCTGCCGATGACTTGATGTATTCCTATGGCCTGTTGTACCTTCTGTAT
 CAACATATTCGCTCATTGCGCTAGTCAGCTGGCCTTCAATGCTGTCTTCTCATATG
 TCCTAAATGCTCAAAAGTTACCCCATTCATTTTCAACTCAGTAATTCTCCTTACTT
 TTCCCGCTGCGCTTCTTGGAGTTGACGAAGATTCTCAGGGTACCAATGGTTTATCGC
 GTGGGAAGTACATATTGGGTTTCGCATTGACCCTAGGAGCCTCGGCCACATACTCAC
 TAATTCTCTCTCTAATGCAAGTCGCATTGAGAAAGGTTATTAAGAAGGAAACTTTCT
 CAGTCGTGTTGAATATGCAGATATATACAGCACTAGTGGCAACAGTAGCTTCTCTTA
 TCGGTTTTATTGCAAGCGGCGAGTGGAAG

Figura 4A

ACTTTAGAGGGAGAGATGCATGCCTTCAGCTCAGGGAGGGTGTCCCTATGTGATGACA
CTTCTATGGACTGCTGTATCTTGGCAGATAGCTTCCGTAGGAGTGGTGGGTTTGATC
TTTG
TTGTGTCATCACTCTTTTCAAATGTGATAAGCACACTGGCTCTACCCATCATTC CGA
TTTTTGCTGTGATTTCTTCCACGACAAGATGGATGGAGTGAAGATTATTGCTATGT
TGATGGCCATCTGGGGATTTCGTTTCATATGGATATCAATTATATGTCAGTGACAAGA
AGGCTAGGAAGACTTCAGTCAGTGTGGAGGAGAATTCCTAAGCGCTTGTTGGCCTGT
TACATTGGTCTTTGTGGCTCCTATACCACTTTAAGTTGCTGGTATTGAGGAGGTACT
AGTTATTGACTTATTGTATCCAAAAGGAGCTCAGTTGAGAATCTCAGGTTTACACAA
TTCATAGGTATATACTTCTGTTAGTATTGTCATATCATATGTACCGATGTACGG
TTGTGTTGTCCTTTAAATAAAAAGATTAGCATTTCAGAGGCATGCTCTCTAGATT
TCTAATTGCCTTAAATATTTCTTGCCTTTGTTTTGTTTTTTTTTTTTTGCTATTAA
CTGTGATTTGTGATTCTATGGTTTGACATATAGTATTTCTAGGTGGTGTGCATGCTG
ATCCTGCTTATTCTACTATGAATTAAATGCAGTATAGGTCCATTAACTTTTGCATGC
GAGCTTCTTGGTGAAAGCCCTGCGTGGTTTGGTTTTGATAACTGAGTGACAGTTAGT
AAAGGTTTTTTGTGTACCACATTTTCTTAGTGTTCTTCACTCCAAATTTGATAGGCG
AGGCTCGATCTTATTCAGTTGCTTGGCTTTCCTTGTTATAACGCCTCAGCTAATCTG
GCTTTGTTTCCTTATGCATACCTTCTGTAATCTAACACCAAACCACAGATGTTGCAT
GTCCATTCTCCATGG

Figura 4B

1 TACCCGATCA GAGCGCTAAG CAGCAGAATC GTGTGACAAC GCTAGCAGCT
 51 CTCCTCCAAC ACATCATCGA CAAGCACCTT TTTTGCCGGA GTATGACGGT
 101 GACGATATAT TCAATTGTAA ATGGCTTCAT GTCCGGGAAA TCTACATGGA
 151 TCAGCAATGA GTATGATGGT CAATATGGAG AAAAAGAAAG AGTAATTACC
 201 AATTTTTTTT CAATTCAAAA ATGTAGATGT CCGCAGCGTT ATTATAAAAT
 251 GAAAGTACAT TTTGATAAAA CGACAAATTA CGATCCGTCG TATTTATAGG
 301 CGAAAGCAAT AAACAAATTA TTCTAATTCG GAAATCTTTA TTTTCGACGTG
 351 TCTACATTCA CGTCCAAATG GGGGCTTAGA TGAGAAACTT CACGATTTGG
 401 CGCGCCAAAAG CTTACTCGAG GTCATTCATA TGCTTGAGAA **GAGAGTCGGG**
 451 **ATAGTCCAAA ATAAACAAA** GGTAAGATTA CCTGGTCAAA AGTGAAAACA
 501 TCAGTTAAAA GGTGGTATAA AGTAAAATAT CGGTAATAAA AGGTGGCCCA
 551 AAGTGAAATT TACTCTTTTC TACTATTATA AAAATTGAGG ATGTTTTTGT
 601 CGGTACTTTG ATACGTCATT TTTGTATGAA TTGGTTTTTA AGTTTATTCG
 651 CTTTTGGAAG TGCATATCTG TATTTGAGTC GGGTTTTAAG TTCGTTTGCT
 701 TTTGTAATAA CAGAGGGATT TGTATAAGAA ATATCTTTAG AAAAACCCAT
 751 ATGCTAATTT GACATAATTT TTGAGAAAAA TATATATTCA GCGGAATTCT
 801 CACAATGAAC AATAATAAGA TTAAATAGC TTTCCCCCGT TGCAGCGCAT
 851 GGGTATTTTT TCTAGTAAAA ATAAAGATA AACTTAGACT CAAAACATTT
 901 ACAAAAACAA CCCCTAAAGT TCCTAAAGCC CAAAGTGCTA TCCACGATCC
 951 ATAGCAAGCC CAGCCCAACC CAACCAACC CAACCCACCC CAGTCCAGCC
 1001 AACTGGACAA TAGTCTCCAC ACCCCCCCAC TATCACCCTG AGTTGTCCCG
 1051 ACGCACCGCA CGTCTCGCAG CCAAAAAAAA AAAGAAAGAA AAAAAAGAAA
 1101 AAGAAAAAAC AGCAGGTGGG TCCGGGTCTG GGGGGCCGGA AACGCGAGGA
 1151 GGATCGCGAG CCAGCGACGA GGCCGGCCCT CCCTCCGCTT CCAAAGAAAC
 1201 GCCCCCATC GCCACTATAT ACATACCCCC CCCTCTCCTC CCATCCCCCC
 1251 AACCCCTACCA CCACCACCAC CACCACCTCC ACCTCCTCCC CCCTCGCTGC
 1301 CGGACGACGA GCTCCTCCCC CCTCCCCCTC CGCCGCCGCG GCGCCGGTAA
 1351 CCACCCCGCC CCTCTCCTCT TTCTTTCTCC GTTTTTTTTT CCGTCTCGGT
 1401 CTCGATCTTT GGCTTTGGTA GTTTGGGTGG GCGAGAGGCG GCTTCGTGCG
 1451 CGCCCAGATC GGTGCGCGGG AGGGGCGGGA TCTCGCGGCT GGGGCTCTCG

Figura 5A

```

1501 CCGGCGTGGA TCCGGCCCGG ATCTCGCGGG GAATGGGGCT CTCGGATGTA
1551 GATCTGCGAT CCGCCGTTGT TGGGGGAGAT GATGGGGGGT TTAAAAATTTC
1601 CGCCGTGCTA AACAAGATCA GGAAGAGGGG AAAAGGGCAC TATGGTTTAT
1651 ATTTTATAT ATTTCTGCTG CTTCTCAGG CTTAGATGTG CTAGATCTTT
1701 CTTTCTTCTT TTTGTGGGTA GAATTGAAT CCCTCAGCAT GTTTCATCGG
1751 TAGTTTTTCT TTTTCATGATT TGTGACAAAT GCAGCCTCGT GCGGAGCTTT
1801 TTTGTAGGTA GAAGTGATCA ACCATGGCGC AAGTTAGCAG AATCTGCAAT
1851 GGTGTGCAGA ACCCATCTCT TATCTCCAAT CTCTCGAAAT CCAGTCAACG
1901 CAAATCTCCC TTATCGGTTT CTCTGAAGAC GCAGCAGCAT CCACGAGCTT
1951 ATCCGATTTT GTCGTCGTGG GGATTGAAGA AGAGTGGGAT GACGTTAATT
2001 GGCTCTGAGC TTCGTCCTCT TAAGGTCATG TCTTCTGTTT CCACGGCGTG
2051 CATGCTTCAC GGTGCAAGCA GCCGGCCCGC AACC GCCCGC AAATCCTCTG
2101 GCCTTTCCGG AACCGTCCGC ATTCCCGGCG ACAAGTCGAT CTCCCACCGG
2151 TCCTTCATGT TCGGCGGTCT CGCGAGCGGT GAAACGCGCA TCACCGGCCT
2201 TCTGGAAGGC GAGGACGTCA TCAATACGGG CAAGGCCATG CAGGCGATGG
2251 GCGCCCGCAT CCGTAAGGAA GGCGACACCT GGATCATCGA TGGCGTCGGC
2301 AATGGCGGCC TCCTGGCGCC TGAGGCGCCG CTCGATTTCTG GCAATGCCGC
2351 CACGGGCTGC CGCCTGACGA TGGGCCTCGT CGGGGTCTAC GATTTGACA
2401 GCACCTTCAT CGGCGACGCC TCGCTCACAA AGCGCCCGAT GGGCCGCGTG
2451 TTGAACCCGC TGC GCGAAAT GGGCGTG CAG GTGAAATCGG AAGACGGTGA
2501 CCGTCTTCCC GTTACCTTGC GCGGGCCGAA GACGCCGACG CCGATCACCT
2551 ACCGCGTGCC GATGGCCTCC GCACAGGTGA AGTCCGCCGT GCTGCTCGCC
2601 GGCCTCAACA CGCCGGCAT CACGACGGTC ATCGAGCCGA TCATGACGGC
2651 CGATCATACG GAAAAGATGC TGCAGGGCTT TGGCGCCAAC CTTACCGTCG
2701 AGACGGATGC GGACGGCGTG CGCACCATCC GCCTGGAAGG CCGCGGCAAG
2751 CTCACCGGCC AAGTCATCGA CGTGCCGGGC GACCCGTCCT CGACGGCCTT
2801 CCCGCTGGTT GCGGCCCTGC TTGTTCCGGG CTCCGACGTC ACCATCCTCA
2851 ACGTGCTGAT GAACCCACC CGCACCGGCC TCATCCTGAC GCTGCAGGAA
2901 ATGGGCGCCG ACATCGAAGT CATCAACCCG CGCCTTGCCG GCGGCGAAGA
2951 CGTGGCGGAC CTGCGCGTTC GCTCCTCCAC GCTGAAGGGC GTCACGGTGC

```

Figura 5B

```

3001  CGGAAGACCG  CGCGCCTTCG  ATGATCGACG  AATATCCGAT  TCTCGCTGTC
3051  GCCGCCGCCT  TCGCGGAAGG  GGCGACCGTG  ATGAACGGTC  TGGAAGAACT
3101  CCGCGTCAAG  GAAAGCGACC  GCCTCTCGGC  CGTCGCCAAT  GGCCTCAAGC
3151  TCAATGGCGT  GGATTGCGAT  GAGGGCGAGA  CGTCGCTCGT  CGTGCGTGGC
3201  CGCCCTGACG  GCAAGGGGCT  CGGCAACGCC  TCGGGCGCCG  CCGTCGCCAC
3251  CCATCTCGAT  CACCGCATCG  CCATGAGCTT  CCTCGTCATG  GGCCTCGTGT
3301  CGGAAAACCC  TGTACCGGTG  GACGATGCCA  CGATGATCGC  CACGAGCTTC
3351  CCGGAGTTCA  TGGACCTGAT  GGCCGGGCTG  GCGCGAAGA  TCGAACTCTC
3401  CGATACGAAG  GCTGCCTGAT  GAGCTCGAAT  TCCCGATCGT  TCAAACATTT
3451  GGCAATAAAG  TTTCTTAAGA  TTGAATCCTG  TTGCCGGTCT  TGCATGATT
3501  ATCATATAAT  TTCTGTTGAA  TTACGTTAAG  CATGTAATAA  TTAACATGTA
3551  ATGCATGACG  TTATTTATGA  GATGGGTTTT  TATGATTAGA  GTCCCGCAAT
3601  TATACATTTA  ATACGCGATA  GAAACAAAA  TATAGCGCGC  AACTAGGAT
3651  AAATTATCGC  GCGCGGTGTC  ATCTATGTTA  CTAGATCGGG  GATTTGCGGC
3701  CGCGTTAACA  AGCTTCTGCA  GGTCCGATTG  AGACTTTTCA  ACAAAGGGTA
3751  ATATCCGGAA  ACCTCCTCGG  ATTCCATTGC  CCAGCTATCT  GTCACTTTAT
3801  TGTGAAGATA  GTGGAAGAG  AAGGTGGCTC  CTACAAATGC  CATCATTGCG
3851  ATAAAGGAAA  GGCCATCGTT  GAAGATGCCT  CTGCCGACAG  TGGTCCCAA
3901  GATGGACCCC  CACCCACGAG  GAGCATCGTG  GAAAAAGAAG  ACGTTCCAAC
3951  CACGTCTTCA  AAGCAAGTGG  ATTGATGTGA  TGGTCCGATT  GAGACTTTTC
4001  AACAAAGGGT  AATATCCGGA  AACCTCCTCG  GATTCCATTG  CCCAGCTATC
4051  TGTCACTTTA  TTGTGAAGAT  AGTGAAAAG  GAAGGTGGCT  CCTACAAATG
4101  CCATCATTGC  GATAAAGGAA  AGGCCATCGT  TGAAGATGCC  TCTGCCGACA
4151  GTGGTCCCAA  AGATGGACCC  CCACCCACGA  GGAGCATCGT  GGAAAAAGAA
4201  GACGTTCCAA  CCACGTCTTC  AAAGCAAGTG  GATTGATGTG  ATATCTCCAC
4251  TGACGTAAGG  GATGACGCAC  AATCCCACTA  TCCTTCGCAA  GACCCTTCCT
4301  CTATATAAGG  AAGTTCATTT  CATTTGGAGA  GGACACGCTG  ACAAGCTGAC
4351  TCTAGCAGAT  CCTCTAGAAC  CATCTTCCAC  AACTCAAGC  CACTATTTG
4401  GAGAACACAC  AGGGACAACA  CACCATAAGA  TCCAAGGGAG  GCCTCCGCCG
4451  CCGCCGGTAA  CCACCCCGCC  CCTCTCCTCT  TTCTTTCTCC  GTTTTTTTTT

```

Figura 5C

```

4501  CCGTCTCGGT CTCGATCTTT GGCCTTGGTA GTTTGGGTGG GCGAGAGGCG
4551  GCTTCGTGCG CGCCCAGATC GGTGCGCGGG AGGGGCGGGA TCTCGCGGCT
4601  GGGGCTCTCG CCGGCGTGGA TCCGGCCCGG ATCTCGCGGG GAATGGGGCT
4651  CTCGGATGTA GATCTGCGAT CCGCCGTTGT TGGGGGAGAT GATGGGGGGT
4701  TTAAAATTTC CGCCGTGCTA AACAAGATCA GGAAGAGGGG AAAAGGGCAC
4751  TATGGTTTAT ATTTTATAT ATTTCTGCTG CTTCGTCAGG CTTAGATGTG
4801  CTAGATCTTT CTTTCTTCTT TTTGTGGGTA GAATTTGAAT CCCTCAGCAT
4851  TGTTCATCGG TAGTTTTTCT TTTCATGATT TGTGACAAAT GCAGCCTCGT
4901  GCGGAGCTTT TTTGTAGGTA GAAGTGATCA ACCATGGCCA ACCCCAACAA
4951  TCGCTCCGAG CACGACACGA TCAAGGTCAC CCCCAACTCC GAGCTCCAGA
5001  CCAACCACAA CCAGTACCCG CTGGCCGACA ACCCCAACTC CACCCTGGAA
5051  GAGCTGAACT ACAAGGAGTT CCTGCGCATG ACCGAGGACT CCTCCACGGA
5101  GGTCTTGAC AACTCCACCG TCAAGGACGC CGTCGGGACC GGCATCTCCG
5151  TCGTTGGGCA GATCCTGGGC GTCGTTGGCG TCCCCTTCGC AGGTGCTCTC
5201  ACCTCCTTCT ACCAGTCCTT CCTGAACACC ATCTGGCCCT CCGACGCCGA
5251  CCCCTGGAAG GCCTTCATGG CCCAAGTCGA AGTCCTGATC GACAAGAAGA
5301  TCGAGGAGTA CGCCAAGTCC AAGGCCCTGG CCGAGCTGCA AGGCCTGCAA
5351  AACAACTTCG AGGACTACGT CAACGCGCTG AACTCCTGGA AGAAGACGCC
5401  TCTGTCCCTG CGCTCCAAGC GCTCCCAGGA CCGCATCCGC GAGCTGTTCT
5451  CCCAGGCCGA GTCCCACTTC CGCAACTCCA TGCCGTCTCT CGCCGTCTCC
5501  AAGTTGAGG TCCTGTTCTT GCCACCTAC GCCCAGGCTG CCAACACCCA
5551  CCTCCTGTTG CTGAAGGACG CCCAGGTCTT CGGCGAGGAA TGGGGCTACT
5601  CCTCGGAGGA CGTCGCCGAG TTCTACCGTC GCCAGCTGAA GCTGACCCAA
5651  CAGTACACCG ACCACTGCGT CAACTGGTAC AACGTCGGCC TGAACGGCCT
5701  GAGGGGCTCC ACCTACGACG CATGGGTCAA GTTCAACCGC TTCCGCAGGG
5751  AGATGACCCT GACCGTCCTG GACCTGATCG TCCTGTTCCC CTTCTACGAC
5801  ATCCGCCTGT ACTCCAAGGG CGTCAAGACC GAGCTGACCC GCGACATCTT
5851  CACGGACCCC ATCTTCTTGC TCACGACCTT CCAGAAGTAC GGTCCCACCT
5901  TCCTGTCCAT CGAGAACTCC ATCCGCAAGC CCCACCTGTT CGACTACCTC
5951  CAGGGCATCG AGTTCCACAC GCGCCTGAGG CCAGGCTACT TCGGCAAGGA

```

Figura 5D

6001 CTCCTTCAAC TACTGGTCCG GCAACTACGT CGAGACCAGG CCCTCCATCG
 6051 GCTCCTCGAA GACGATCACC TCCCCTTTCT ACGGCGACAA GTCCACCAGG
 6101 CCCGTCCAGA AGCTGTCTT CGACGGCCAG AAGGTCTACC GCACCATCGC
 6151 CAACACCGAC GTCGCGGCTT GGCCGAACGG CAAGGTCTAC CTGGGCGTCA
 6201 CGAAGGTCGA CTTCTCCCAG TACGATGACC AGAAGAACGA GACCTCCACC
 6251 CAGACCTACG ACTCCAAGCG CAACAATGGC CACGTCTCCG CCCAGGACTC
 6301 CATCGACCAG CTGCCGCCTG AGACCACTGA CGAGCCCCTG GAGAAGGCCT
 6351 ACTCCCACCA GCTGAACTAC GCGGAGTGCT TCCTGATGCA AGACCGCAGG
 6401 GGCACCATCC CCTTCTTCAC CTGGACCCAC CGCTCCGTCG ACTTCTTCAA
 6451 CACCATCGAC GCCGAGAAGA TCACCCAGCT GCCCCTGGTC AAGGCCTACG
 6501 CCCTGTCTCT GGGTGCCTCC ATCATTGAGG GTCCAGGCTT CACCGGTGGC
 6551 AACCTGCTGT TCCTGAAGGA GTCCTCGAAC TCCATCGCCA AGTTCAAGGT
 6601 CACCCTGAAC TCCGCTGCCT TGCTGCAACG CTACCGCGTC CGCATCCGCT
 6651 ACGCCTCCAC CACGAACCTG CGCCTGTTCTG TCCAGAACTC CAACAATGAC
 6701 TTCCTGGTCA TCTACATCAA CAAGACCATG AACAAGGACG ATGACCTGAC
 6751 CTACCAGACC TTCGACCTCG CCACCACGAA CTCCAACATG GGCTTCTCGG
 6801 GCGACAAGAA TGAACGATC ATTGGTGCTG AGTCCTTCGT CTCCAACGAG
 6851 AAGATCTACA TCGACAAGAT CGAGTTCATC CCCGTCCAGC TGTGATAGGA
 6901 ACTCTGATTG AATTCTGCAT GCGTTTGGAC GTATGCTCAT TCAGGTTGGA
 6951 GCCAATTTGG TTGATGTGTG TGCGAGTTCT TGCGAGTCTG ATGAGACATC
 7001 TCTGTATTGT GTTCTTTTCC CCAGTGTTTT CTGTACTTGT GTAATCGGCT
 7051 AATCGCCAAC AGATTGCGCG ATGAATAAAT GAGAAATAAA TTGTTCTGAT
 7101 TTTGAGTGCA AAAAAAAGG AATTAGATCT GTGTGTGTTT TTTGGATCCC
 7151 CGGGGCGGCC GCTCGAGCAG GACCTGCAGA AGCTAGCTTG ATGGGGATCA
 7201 GATTGTGCTT TCCCGCCTTC AGTTTAAACA GAGTCGGGTT TGGATGGTCA
 7251 ACTCCGGCAT ACTGCCGAAA ACAAACCAAT CCGTCACCGT CAAGGCCCCG
 7301 CACCGCTGGC CGCACGCAGG AAAAAATAAGT TGCGACCGCG AGCGGGCGAA
 7351 TCAGAAAGGG CGTCCGGCCT TGGTCAGACA CGACAGCGAC GCGGAAAGGC
 7401 TGCGCCCGCG GTGCCATCTA CAAGGGTCCA CGTCCATCCA AAAAGAGCGG

Figura 5E