(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 546 267**

(51) Int. CI.:

C12Q 1/68 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2004 E 04751097 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2015 EP 1620571**

(54) Título: **Evento de maíz TC1507 y métodos para la detección del mismo**

(30) Prioridad:

02.05.2003 US 467772 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.09.2015

(73) Titular/es:

DOW AGROSCIENCES, LLC (33.3%)
9330 Zionsville Road
Indianapolis, Indiana 46268, US;
E. I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY (33.3%) y
PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL, INC. (33.3%)

(72) Inventor/es:

BARBOUR, ERIC;
BING, JAMES W.;
CARDINEAU, GUY A.;
CRESSMAN, ROBERT F., JR.;
GUPTA, MANJU;
HARTNETT LOCKE, MARY E.;
HONDRED, DAVID;
KEASCHALL, JOSEPH W.;
KOZIEL, MICHAEL G.;
MEYER, TERRY E.;
MOELLENBECK, DANIEL;
NARVA, KENNETH E.;
NIRUNSUKSIRI, WILAS;
RITCHIE, STEVEN W.;
RUDERT, MARJORIE L.;
SANDERS, CRAIG D.;
SHAO, AIHUA;
STELMAN, STEVEN J.;
STUCKER, DAVID S.;
TAGLIANI, LAURA A. y
VAN ZANTE, WILLIAM M.

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones :

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

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

DESCRIPCIÓN

Evento de maíz TC1507 y métodos para la detección del mismo

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la biología molecular de plantas, específicamente la invención se refiere a una construcción de ADN para conferir resistencia a insectos a una planta. La invención se refiere más específicamente a una planta de maíz resistente a insectos TC1507 y a ensayos para detectar la presencia del ADN de la planta de maíz TC1507 en una muestra y composiciones de la misma.

Antecedentes de la invención

Esta invención se refiere a la planta de maíz resistente a insectos *(Zea mays)* TC1507, también mencionada como línea de maíz TC1507 o evento de maíz TC1507, y a la construcción de expresión en plantas de ADN de la planta de maíz TC1507 y a la detección del transgén/región de inserción flanqueante en la planta de maíz TC1507 y la descendencia de la misma.

El maíz es un cultivo importante y es una fuente primaria de alimento en muchas áreas del mundo. Los daños causados por plagas de insectos es un factor principal en la pérdida de los cultivos de maíz en el mundo, a pesar del uso de medidas protectoras tales como pesticidas químicos. En vista de esto, se ha diseñado por ingeniería genética la resistencia a insectos en cultivos tales como maíz para controlar los daños por insectos y para reducir la necesidad de pesticidas químicos tradicionales. Un grupo de genes que se ha utilizado para la producción de cultivos transgénicos resistentes a insectos son las delta-endotoxinas de *Bacillus thuringiensis (B.t.).* Las delta-endotoxinas se han expresado satisfactoriamente en plantas de cultivo tales como algodón, patatas, arroz, girasol, así como maíz, y han demostrado proporcionar excelente control sobre plagas de insecto. (Perlak, F.J et al. (1990) Bio/Technology 8, 939-943; Perlak, F.J. et al. (1993) PlantMol. Biol. 22: 313-321; Fujimoto H. et al. (1993) Bio/Technology 11: 1151-1155; Tu et al. (2000) Nature Biotechnology 18:1101-1104; publicación PCT número WO O1/13731; y Bing JW et al. (2000) Efficacy of CrylF Transgenic Maize, 14th Biennial International Plant Resistance to Insects Workshop, Fort Collins, CO).

Se sabe que la expresión de genes foráneos en plantas está influenciada por su localización en el genoma vegetal, quizá debido a la estructura de la cromatina (por ejemplo, heterocromatina) o la proximidad de elementos reguladores de la transcripción (por ejemplo, potenciadores) cerca del sitio de integración (Weising et al., Ann. Rev. Genet 22:421-477, 1988). Al mismo tiempo la presencia del transgén en diferentes localizaciones en el genoma influirá en el fenotipo global de la planta de diferentes modos. Por esta razón, a menudo es necesario explorar una gran cantidad de eventos para identificar un evento caracterizado por la expresión óptima de un gen de interés introducido. Por ejemplo, se ha observado en plantas y en otros organismos que puede haber una amplia variación en los niveles de expresión de un gen introducido entre eventos. También puede haber diferencias en los patrones espaciales o temporales de expresión, por ejemplo, diferencias en la expresión relativa de un transgén en diversos tejidos vegetales, que pueden no corresponder a los patrones esperados de los elementos reguladores de la transcripción presentes en la construcción génica introducida. Por esta razón, es habitual producir de cientos a miles de diferentes eventos y explorar esos eventos para un único evento que tenga los niveles y patrones deseados de expresión del transgén con fines comerciales. Un evento que tenga niveles o patrones deseados de expresión del transgén es útil para la introgresión del transgén en otros fondos genéticos por cruce exogámico sexual usando métodos convencionales de reproducción. La descendencia de estos cruces mantiene las características de expresión del transgén del transformante original. Esta estrategia se usa para asegurar una expresión génica fiable en varias variedades que están bien adaptadas a condiciones locales de cultivo.

Sería ventajoso ser capaces de detectar la presencia de un evento particular para determinar si la descendencia de un cruce sexual contiene un transgén de interés. Además, sería provechoso un método para detectar un evento particular para cumplir con las regulaciones que requieren la aprobación pre-comercialización y etiquetado de alimentos derivados de plantas recombinantes de cultivo, por ejemplo, o para su uso en control medioambiental, control de rasgos en cultivos en el campo, o control de productos derivados de una recolección de cultivo, así como para su uso en asegurar la conformidad de las partes sujetas a términos normativos o contractuales.

Es posible detectar la presencia de un transgén mediante cualquier método de detección de ácido nucleico conocido en la técnica incluyendo, aunque sin limitación, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o hibridación de ADN usando sondas de ácido nucleico. Estos métodos de detección generalmente se centran en los elementos genéticos frecuentemente usados, tales como promotores, terminadores, genes marcadores, etc., porque para muchas construcciones de ADN, la región codificante es intercambiable. Como resultado, dichos métodos pueden no ser útiles para discriminar entre diferentes eventos, particularmente aquellos producidos usando la misma construcción de ADN o construcciones muy similares salvo que se conozca la secuencia de ADN del ADN flanqueante adyacente al ADN heterólogo insertado. Por ejemplo, se describe un ensayo de PCR específico de evento en la patente de Estados Unidos Nº 6.395.485 para la detección del evento selecto GAT-ZM1. Por consiguiente, sería deseable tener un método simple y discriminativo para la identificación del evento TC1507.

Sumario de la invención

Esta descripción se refiere preferiblemente a métodos para producir y seleccionar una planta de cultivo monocotiledónea resistente a insectos. Más específicamente, se proporciona una construcción de ADN que cuando se expresa en células vegetales y plantas confiere resistencia a insectos.

Por consiguiente, se proporciona una construcción de ADN, con capacidad de introducción y replicación en una célula hospedadora, que cuando se expresa en células vegetales y plantas confiere resistencia a insectos a las células vegetales y plantas. La construcción de ADN está compuesta por una molécula de ADN llamada PHI8999A e incluye dos casetes de expresión transgénica. El primer casete de expresión comprende una molécula de ADN que incluye el promotor, el exón no traducido 5', y el primer intrón del gen de la ubiquitina de maíz (Ubi-1) (Christensen et al. (1992) Plant Mol. Biol. 18:675-689 y Christensen y Quail (1996) Transgenic Res. 5:213-218) conectado de forma funcional a una molécula de ADN que codifica una δ-endotoxina de *B.t.* identificada como CrylF (patentes de Estados Unidos Nº 5.188.960 y 6.218.188) conectada de forma funcional a una molécula de ADN que comprende un terminador de la transcripción 3' ORF25 aislado de *Agrobacterium tumefaciens* (Barker et al. (1983) Plant Mol. Biol. 2:335-350). El segundo casete de expresión transgénica de la construcción de ADN comprende una molécula de ADN del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Odell J.T. et al. (1985) Nature 313: 810-812; Mitsuhara et al. (1996) Plant Cell Physiol. 37: 49-59) conectado de forma funcional a una molécula de ADN que codifica un gen de fosfinotricina acetiltransferasa (PAT) (Wohlleben W. et al. (1988) Gene 70: 25-37) conectado de forma funcional a una molécula de ADN que comprende un terminador de la transcripción 3' de 35S (CaMV) (véase Mitsuhara et al. (1996) Plant Cell Physiol. 37: 49-59). También se proporcionan plantas que contienen la construcción de ADN.

Se proporcionan composiciones y métodos para identificar una nueva planta de maíz denominada TC1507, estando basados los métodos en cebadores o sondas que reconocen específicamente la secuencia flanqueante 5' y/o 3' de TC1507. Se proporcionan moléculas de ADN que comprenden secuencias cebadoras que cuando se utilizan en una reacción de PCR producirán amplicones únicos para el evento transgénico TC1507. Estas moléculas pueden seleccionarse entre el grupo que consiste en:

5'-GTAGTACTATAGATTATATTATTCGTAGAG-3' (SEC ID Nº 1);
5'-GCCATACAGAACTCAAAATCTTTTCCGGAG-3' (SEC ID Nº 2);
5'-CTTCAAACAAGTGTGACAAA-3' (SEC ID Nº 23);
5'-TGTGGTGTTTGTGGCTCTGTCCTAA-3' (SEC ID Nº 3);
5'-AGCACCTTTTCATTCTTTCATATAC-3' (SEC ID Nº 4);
5'-GACCTCCCCACAGGCATGATTGATC-3' (SEC ID Nº 5);

y complementos de las mismas. La planta y semilla de maíz que comprende estas moléculas es un aspecto de esta invención. Además, se proporcionan kits que utilizan estas secuencias cebadoras para la identificación del evento TC1507.

Un aspecto de la invención se refiere a las secuencias flanqueantes específicas de TC1507 descrito en este documento, que pueden usarse para desarrollar métodos de identificación específica para TC1507 en muestras biológicas. Más particularmente, la invención se refiere a las regiones flanqueantes 5' y/o 3' de TC1507, SEC ID Nº 21 y SEC ID Nº 22, respectivamente, que pueden usarse para el desarrollo de cebadores y sondas específicos. La invención se refiere adicionalmente a métodos de identificación para la presencia de TC1507 en muestras biológicas en base al uso de dichos cebadores o sondas específicos.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporcionan métodos para detectar la presencia de ADN correspondiente al evento de maíz TC1507 en una muestra. Dichos métodos comprenden: (a) poner en contacto la muestra que comprende el ADN con un conjunto de cebadores de ADN, que cuando se usa en una reacción de amplificación de ácido nucleico con ADN genómico extraído del evento de maíz TC1507 produce un amplicón que es diagnóstico para el evento de maíz TC1507; (b) realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico, produciendo de ese modo el amplicón; y (c) detectar el amplicón.

Las moléculas de ADN que comprenden el nuevo transgén/región de inserción flanqueante, SEC ID Nº 26 y SEC ID Nº 27 y son homólogas o complementarias a las SEC ID Nº 26 y SEC ID Nº 27 son un aspecto de esta invención.

Las secuencias de ADN que comprenden el nuevo transgén/región de inserción flanqueante, SEC ID Nº 26 son un aspecto de esta invención. Se incluyen secuencias de ADN que comprenden una longitud suficiente de polinucleótidos de la secuencia de inserto transgénico y una longitud suficiente de polinucleótidos de secuencia genómica y/o flanqueante de maíz de la planta de maíz TC1507 de la SEC ID Nº 26 que son útiles como secuencias cebadoras para la producción de un producto de amplicón diagnóstico para la planta de maíz TC1507.

Además, se proporcionan secuencias de ADN que comprenden el nuevo transgén/región de inserción flanqueante, SEC ID Nº 27. Se incluyen secuencias de ADN que comprenden una longitud suficiente de polinucleótidos de secuencia de inserto transgénico y una longitud suficiente de polinucleótidos de secuencia genómica y/o flanqueante

de maíz de la planta de maíz TC1507 de la SEC ID Nº 27 que son útiles como secuencias cebadoras para la producción de un producto de amplicón diagnóstico para la planta de maíz TC1507.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, las secuencias de ADN que comprenden nucleótidos de la parte transgénica de la secuencia de ADN de la SEC ID Nº 26 o complementos de la misma, y una longitud similar de la secuencia de ADN de maíz flanqueante 5' de la SEC ID Nº 26 o complementos de la misma son útiles como cebadores de ADN en métodos de amplificación de ADN. Los amplicones producidos usando estos cebadores son diagnósticos para el evento de maíz TC1507. Por lo tanto, la invención también incluye los amplicones producidos por cebadores de ADN homólogos o complementarios a la SEC ID Nº 26.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, las secuencias de ADN que comprenden nucleótidos de la parte transgénica de la secuencia de ADN de la SEC ID Nº 27 o complementos de la misma, y una longitud similar de la secuencia de ADN de maíz flanqueante 3' de la SEC ID Nº 27 o complementos de la misma son útiles como cebadores de ADN en métodos de amplificación de ADN. Los amplicones producidos usando estos cebadores son diagnósticos para el evento de maíz TC1507. Por lo tanto, la invención también se refiere a los amplicones producidos por cebadores de ADN homólogos o complementarios a la SEC ID Nº 27.

Más específicamente, un par de moléculas de ADN que comprenden un conjunto de cebadores de ADN, donde las moléculas de ADN se identifican como SEC ID Nº 1 o complementos de la misma y SEC ID Nº 2 o complementos de la misma; SEC ID Nº 2 o complementos de la misma y SEC ID Nº 23 o complementos de la misma; SEC ID Nº 3 o complementos de la misma y SEC ID Nº 5 o complementos de la misma; SEC ID Nº 4 o complementos de la misma y SEC ID Nº 5 o complementos de la misma son aspectos de la invención.

La invención también se refiere al amplicón que comprende las moléculas de ADN de la SEC ID Nº 1 y SEC ID Nº 2; el amplicón que comprende las moléculas de ADN de la SEC ID Nº 2 y SEC ID Nº 23; el amplicón que comprende las moléculas de ADN de la SEC ID Nº 3 y SEC ID Nº 5; y el amplicón que comprende las moléculas de ADN de la SEC ID Nº 4 y SEC ID Nº 5.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporcionan métodos para detectar la presencia de una molécula de ADN correspondiente al evento TC1507 en una muestra.

Además, se proporcionan un kit y métodos para identificar el evento TC1507 en una muestra biológica.

En dichos kits, se proporcionan moléculas de ADN que comprenden al menos una secuencia de unión de TC1507 seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID Nº 45, 46, 47, 49, 50, 51, 52, 54, 55, 56 y 57 y complementos de las mismas; donde una secuencia de unión abarca la unión entre el ADN heterólogo insertado en el genoma y el ADN de la célula de maíz que flanquea el sitio de inserción, es decir el ADN flanqueante, y es diagnóstico para el evento TC1507.

También se describen métodos para producir una planta de maíz resistente a insectos que comprende las etapas de: (a) cruzar de forma sexual una primera línea de maíz parental que comprende los casetes de expresión de la presente invención, que confiere resistencia a insectos, y una segunda línea de maíz parental que acrece de resistencia a insectos, produciendo de este modo una pluralidad de plantas descendientes; y (b) selecciona una planta descendiente que sea resistente a insectos. Dichos métodos pueden comprender opcionalmente la etapa adicional de retro-cruzar la descendencia con la segunda línea de maíz parental para producir una planta de maíz de pura raza que es resistente a insectos.

También se describe un método para producir una planta de maíz que es resistente a insectos que comprende transformar una célula de maíz con la construcción de ADN PHI8999A (SEC ID Nº 25), cultivar la célula de maíz transformada en una planta de maíz, seleccionar la planta de maíz que muestre resistencia a insectos, y cultivar adicionalmente la planta de maíz en una planta de maíz fértil. La planta de maíz fértil puede auto-polinizarse o cruzarse con variedades compatibles de maíz para producir descendencia resistente a insectos.

La invención se refiere adicionalmente a un kit de detección de ADN para identificar el evento de maíz TC1507 en muestras biológicas. Preferiblemente el kit de la invención comprende un primer cebador que reconoce específicamente la región flanqueante 5' o 3' de TC1507, y un segundo cebador que reconoce específicamente una secuencia dentro del ADN foráneo de TC1507, o dentro del ADN flanqueante, para su uso en un protocolo de identificación por PCR. La invención también se refiere a un kit para identificar el evento TC1507 en muestras biológicas, comprendiendo dicho kit una sonda específica que tiene una secuencia que corresponde o es complementaria a, una secuencia que tiene entre el 80% y el 100% de identidad de secuencia con una región específica del evento TC1507. Preferiblemente la secuencia de la sonda corresponde a una región específica que comprende parte de la región flanqueante 5' o 3' del evento TC1507.

Los métodos y kits abarcados por la presente invención pueden usarse para diferentes propósitos tales como, aunque sin limitación, los siguientes: para identificar el evento TC1507 en plantas, material vegetal o en productos tales como, aunque sin limitación, productos alimenticios o de forraje (frescos o procesados) que comprenden, o

derivados de material vegetal; adicionalmente o como alternativa, los métodos y kits de la presente invención pueden usarse para identificar material vegetal transgénico con fines de segregación entre material transgénico y no transgénico; adicionalmente o como alternativa, los métodos y kits de la presente invención pueden usarse para determinar la calidad del material vegetal que comprende el evento de maíz TC1507. Los kits también pueden contener los reactivos y materiales necesarios para la ejecución del método de detección.

Esta descripción se refiere adicionalmente a la planta de maíz TC1507 o sus partes, incluyendo, aunque sin limitación, polen, óvulos, células vegetativas, los núcleos de células de polen, y los núcleos de óvulos de la planta de maíz TC1507 y la descendencia derivada de la misma. También se describen la planta y semilla de maíz TC1507 a partir de la cual las moléculas cebadoras de ADN de la presente invención proporcionan un producto de amplicón específico.

La invención por lo tanto proporciona una molécula de ADN aislada que comprende una secuencia de nucleótidos identificada como SEC ID Nº 21, 22, 24, 26 o 27.

La invención también proporciona un kit para identificar el evento TC1507 en una muestra biológica que detecta una región específica de TC1506, comprendiendo dicho kit un primer cebador que reconoce la SEC ID Nº 21 o SEC ID Nº 22, y un segundo cebador que reconoce la SEC ID Nº 25.

La invención también proporciona un kit de detección de ADN que comprende al menos una molécula de ADN que es homóloga o complementaria a la SEC ID Nº 26 o 27, donde la molécula de ADN es específica para el ADN de unión del evento de maíz TC1507 y es de longitud suficiente de polinucleótidos de ADN contiguo para funcionar en un método de detección de ADN.

La invención también proporciona un kit para identificar el evento TC1507 en una muestra biológica, comprendiendo dicho kit: una sonda específica que comprende una secuencia que hibrida con la SEC ID Nº 21 y SEC ID Nº 25, contigua con la misma.

La invención también proporciona un kit para identificar el evento TC1507 en una muestra biológica, comprendiendo dicho kit: una sonda específica que comprende una secuencia que hibrida con la SEC ID Nº 22 y SEC ID Nº 25, contigua con la misma.

La invención también proporciona un kit que comprende una sonda polinucleotídica que hibrida en condiciones rigurosas de hibridación con una o más secuencias de ADN seleccionadas entre el grupo que consiste en las SEC ID Nº 45, 46, 47, 49, 50, 51, 52, 54, 55, 56 y 57 y complementos de las mismas.

La invención también proporciona un kit de detección de ADN que comprende un par de cebadores comprendiendo cada uno al menos 10 nucleótidos de la SEC ID Nº 26 o SEC ID Nº 27, donde cada uno está en lados opuestos de una secuencia diagnóstica para la inserción del evento TC1507.

La invención también proporciona un método para identificar el evento TC1507 en una muestra biológica, que comprende detectar una región específica de TC1507 con una sonda o primer cebador que reconoce específicamente una secuencia dentro de la SEC ID Nº 21 o SEC ID Nº 22.

La invención también proporciona un método para detectar la presencia del evento de maíz TC1507 o descendencia del mismo en una muestra biológica, que comprende:

(a) extraer una muestra de ADN de dicha muestra biológica;
(b) proporcionar las moléculas cebadoras de ADN SEC ID Nº 1 y SEC ID Nº 2, SEC ID Nº 2 y SEC ID Nº 23, SEC ID Nº 3 y SEC ID Nº 5, o SEC ID Nº 4 y SEC ID Nº 5;
(c) proporcionar condiciones de reacción de amplificación de ADN;
(d) realizar dicha reacción de amplificación de ADN, produciendo de ese modo una molécula de amplicón de ADN; y
(e) detectar dicha molécula de amplicón de ADN, donde la detección de dicha molécula de amplicón de ADN en dicha reacción de amplificación de ADN indica la presencia del evento de maíz TC1507.

La invención también proporciona una molécula de ADN aislada que comprende el amplicón producido por dicho método.

La invención también proporciona un método para detectar la presencia de ADN correspondiente al evento TC1507 en una muestra, comprendiendo el método:

(a) poner en contacto la muestra que comprende ADN de maíz con una sonda polinucleotídica que hibrida en condiciones rigurosas de hibridación con ADN del evento de maíz TC1507 y no hibrida en dichas condiciones rigurosas de hibridación con un ADN de planta de maíz no TC1507;
(b) someter la muestra y la sonda a condiciones rigurosas de hibridación; y

(c) detectar la hibridación de la sonda al ADN, donde la detección de hibridación indica la presencia del evento TC1507.

La invención también proporciona una secuencia cebadora nucleotídica de ADN aislada que comprende una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID Nº 45, 46, 47, 49, 50, 51, 52, 54, 55, 56 y 57 o su complemento.

La invención también proporciona un par de moléculas de ADN que comprenden: una primera molécula de ADN y una segunda molécula de ADN, donde las moléculas de ADN son de una longitud suficiente de nucleótidos contiguos de la SEC ID Nº 26 o su complemento, o de la SEC ID Nº 27 o su complemento, para funciona como cebadores de ADN o sondas diagnósticas para el ADN extraído de una planta de maíz TC1507 o descendencia de la misma.

La invención también proporciona una molécula de ADN aislada que comprende una secuencia de unión que comprende una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID Nº 45, 46, 47, 49, 50, 51, 52, 54, 55, 56 y 57 y complementos de las mismas.

La invención también proporciona un método para confirmar la pureza de las semillas, que comprende la detección de una región específica de TC1507 con un cebador o sonda específico que reconoce específicamente una secuencia dentro de la SEC ID Nº 21 o SEC ID Nº 22, en una muestra de semilla.

La invención también proporciona un método para explorar semillas para la presencia del evento TC1507, que comprende la detección de una región específica de TC1507 con un cebador o sonda específico que reconoce específicamente una secuencia dentro de la SEC ID Nº 21 o SEC ID Nº 22 en una muestra de un lote de semillas.

La invención también proporciona una secuencia de ADN aislada que comprende una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en ADN que tiene al menos una secuencia de nucleótidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID Nº 45, 46, 47, 49, 50, 51, 52, 54, 55, 56 y 57 y complementos de las mismas.

La invención también proporciona un par de secuencias de ADN aisladas, comprendiendo cada una al menos diez nucleótidos y que cuando se usan juntas en un procedimiento de amplificación de ADN producirán un amplicón diagnóstico para el evento TC1507.

La invención también proporciona un método para detectar la presencia de la inserción del evento TC1507 en tejido de maíz que comprende:

(a) seleccionar un par de cebadores que comprenden cada uno al menos diez nucleótidos de la SEC ID Nº 26 o SEC ID Nº 27 donde cada miembro del par está en lados opuestos de una secuencia diagnóstica para dicha inserción del evento TC1507;
(b) poner en contacto una muestra de dicho tejido de maíz con dicho par de cebadores;
(c) realizar amplificación de ADN y analizar para la presencia de amplicones.

La invención también proporciona un método para detectar la presencia de la inserción del evento TC1507 en tejido de maíz que comprende:

(a) poner en contacto una muestra de dicho tejido de maíz con una sonda polinucleotídica que hibrida en condiciones rigurosas de hibridación con una o más secuencias de ADN seleccionadas entre el grupo que consiste en las SEC ID Nº 45, 46, 47, 49, 50, 51, 52, 54, 55, 56 y 57 y complementos de las mismas;
(b) someter dicha muestra y sonda a condiciones rigurosas de hibridación; y
(c) analizar para la hibridación de la sonda.

La invención también proporciona un método para identificar TC1507 en una muestra biológica que detecta una región específica de TC1507 dentro de la SEC ID Nº 24.

Breve descripción de los dibujos

FIG. 1. Mapa lineal que muestra el inserto transgénico PHI8999A, así como las secuencias que flanquean el inserto transgénico.

Descripción detallada

Las siguientes definiciones y métodos se proporcionan para definir mejor la presente invención y para guiar a los especialistas en la técnica en la práctica de la presente invención. Salvo que se indique de otro modo, los términos deben entenderse de acuerdo con el uso convencional por los especialistas en la técnica relevante. También pueden encontrarse definiciones de términos comunes en biología molecular en Rieger et al., 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 para las bases de ADN expuesta en 37 CFR 1.822.

Como se usa en este documento, el término "comprender" significa "incluir aunque sin limitación".

Como se usa en este documento, el término "maíz" significa *Zea mays* o maíz e incluye todas las variedades vegetales que pueden reproducirse con el maíz, incluyendo especies silvestres de maíz.

Como se usa en este documento, la expresión "específica de TC1507" se refiere a una secuencia de nucleótidos que es adecuada para identificar de forma discriminatoria el evento TC1507 en plantas, material vegetal, o en productos tales como, aunque sin limitación, productos alimenticios o de forraje (frescos o procesados) que comprenden, o derivad de material vegetal.

Como se usa en este documento, las expresiones "resistente a insectos" y "que afecta a las plagas de insectos" se refiere a realizar cambios en la alimentación, crecimiento, y/o comportamiento de los insectos en cualquier fase de desarrollo incluyendo, aunque sin limitación: eliminación del insecto; retardo del crecimiento; prevención de la capacidad reproductora; y similares.

Como se usa en este documento, las expresiones "actividad pesticida" y "actividad insecticida" se usan de forma sinónima para hacer referencia a la actividad de un organismo o una sustancia (tal como, por ejemplo, una proteína) que puede medirse por numerosos parámetros incluyendo, aunque sin limitación, mortalidad de la plaga, pérdida de peso de la plaga, atracción de la plaga, repelencia de la plaga, y otros cambios de comportamiento y físicos de una plaga después de alimentarla con y/o exponerla al organismo o sustancia durante un periodo apropiado de tiempo. Por ejemplo las "proteínas pesticidas" son proteínas que presentan actividad pesticida por sí mismas o en combinación con otras proteínas.

"Secuencia codificante" se refiere a una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia específica de aminoácidos. Como se usa en este documento, las expresiones "codificante" o "codificada" cuando se usan en el contexto de un ácido nucleico especificado significan que el ácido nucleico comprende la información necesaria para guiar la traducción de la secuencia de nucleótidos en una proteína especificada. La información mediante la cual está codificada una proteína se especifica mediante el uso de codones. Un ácido nucleico que codifica una proteína puede comprender secuencias no traducidas (por ejemplo, intrones) dentro de regiones traducidas del ácido nucleico o puede carecer de dichas secuencias no traducidas intermedias (por ejemplo, como en ADNc).

"Gen" se refiere a un fragmento de ácido nucleico que expresa una proteína específica, incluyendo secuencias reguladoras que preceden (secuencias no codificantes 5') y siguen (secuencias no codificantes 3') a la secuencia codificante. "Gen nativo" se refiere a un gen encontrado en la naturaleza con sus propias secuencias reguladoras. "Gen quimérico" se refiere a cualquier gen que no es un gen nativo, que comprende secuencias reguladoras y codificantes que no se encuentran juntas en la naturaleza. Por consiguiente, un gen quimérico puede comprender secuencias reguladoras y secuencias codificantes que se obtienen de diferentes fuentes, o secuencias reguladoras y secuencias codificantes obtenidas de la misma fuente, pero dispuestas de un modo diferente al encontrado en la naturaleza. "Gen endógeno" se refiere a un gen nativo en su localización natural en el genoma de un organismo. "Foráneo" se refiere a material no encontrado normalmente en la localización de interés. Por tanto "ADN foráneo" puede comprender tanto ADN recombinante así como ADN reordenado recién introducido de la planta. Un gen "foráneo" se refiere a un gen no encontrado normalmente en el organismo hospedador, pero que se introduce en el organismo hospedador por transferencia génica. Los genes foráneos pueden comprender genes nativos insertados en un organismo no nativo, o genes quiméricos. Un "transgén" es un gen que se ha introducido en el genoma mediante un procedimiento de transformación. El sitio en el genoma de la planta donde se ha insertado un ADN recombinante puede mencionarse como el "sitio de inserción" o "sitio diana".

Como se usa en este documento, "ADN inserto" se refiere al ADN heterólogo dentro de los casetes de expresión usados para transformar el material vegetal mientras que el "ADN flanqueante" puede existir de ADN genómico presente de forma natural en un organismo tal como una planta, o ADN foráneo (heterólogo) introducido mediante el proceso de transformación que es ajeno a la molécula de ADN inserto original, por ejemplo fragmentos asociados con el evento de transformación. Una "región flanqueante" o "secuencia flanqueante" como se usa en este documento se refiere a una secuencia de al menos 20 pares de bases, preferiblemente al menos 50 pares de bases, y hasta 5000 pares de bases que está localizada inmediatamente cadena arriba de y contigua con o inmediatamente cadena abajo de y contiguas con la molécula de ADN inserto foráneo original. Los procedimientos de transformación que conducen a integración aleatoria del ADN foráneo producirán transformantes que contienen diferentes regiones flanqueantes características y únicas para cada transformante. Cuando se introduce ADN recombinante en una planta a través de cruce tradicional, sus regiones flanqueantes generalmente no se cambiarán. Los transformantes también contendrán uniones únicas entre un trozo de ADN inserto heterólogo y ADN genómico, o 2 trozos de ADN genómico, o 2 trozos de ADN heterólogo. Una "unión" es un punto donde se unen 2 fragmentos específicos de ADN. Por ejemplo, existe una unión donde se une el ADN inserto al ADN flanqueante. También existe un punto de unión en un organismo transformado donde 2 fragmentos de ADN se unen juntos de un modo que está modificado del encontrado en el organismo nativo. "ADN de unión" se refiere a ADN que comprende un punto de unión.

Como se usa en este documento, "heterólogo" en referencia a un ácido nucleico es un ácido nucleico que se origina a partir de una especie foránea, o, si es de la misma especie, se modifica sustancialmente a partir de su forma nativa en composición y/o locus genómico por intervención humana deliberada. Por ejemplo, un promotor unido de forma funcional a una secuencia heteróloga de nucleótidos puede ser de una especie diferente de la que se obtuvo la secuencia de nucleótidos, o, si es de la misma especie, el promotor no se encuentra de forma natural unido de forma funcional a la secuencia de nucleótidos. Una proteína heteróloga puede originarse a partir de una especie foránea, o, si es de la misma especie, se modifica sustancialmente de su forma original por intervención humana deliberada.

"Secuencias reguladoras" se refiere a secuencias de nucleótidos localizadas cadena arriba (secuencias no codificantes 5'), dentro, o cadena abajo (secuencias no codificantes 3') de una secuencia codificante, y que influyen en la transcripción, procesamiento o estabilidad del ARN, o traducción de la secuencia codificante asociada. Las secuencias reguladoras pueden incluir promotores, secuencias líder de traducción, intrones, y secuencias de reconocimiento de poliadenilación.

"Promotor" se refiere a una secuencia de nucleótidos capaz de controlar la expresión de una secuencia codificante o ARN funcional. En general, una secuencia codificante está localizada 3' a una secuencia promotora. La secuencia promotora consiste en elementos cadena arriba proximales y más distales, los últimos elementos a menudo se mencionan como potenciadores. Por consiguiente, un "potenciador" es una secuencia de nucleótidos que puede estimular la actividad promotora y puede ser un elemento innato del promotor o un elemento heterólogo insertado para potenciar el nivel o especificidad tisular de un promotor. Los promotores pueden obtenerse en su totalidad de un gen nativo, o estar compuestos por diferentes elementos derivados de diferentes promotores encontrados en la naturaleza, o incluso comprender segmentos sintéticos de nucleótidos. Los especialistas en la técnica entienden que diferentes promotores pueden dirigir la expresión de un gen en diferentes tejidos o tipos celulares, o en diferentes fases del desarrollo, o en respuesta a diferentes condiciones ambientales. Los promotores que causan que un fragmento de ácido nucleico se exprese en la mayoría de tipos celulares la mayor parte del tiempo se mencionan comúnmente como "promotores constitutivos". Constantemente se están descubriendo nuevos promotores de diversos tipos útiles en células vegetales; pueden encontrarse numerosos ejemplos en la compilación de Okamuro y Goldberg (1989) Biochemistry of Plants 15:1-82. Se reconoce adicionalmente que como en la mayoría de los casos no se han definido completamente los límites exactos de las secuencias reguladoras, fragmentos de ácido nucleico de diferentes longitudes pueden tener idéntica actividad promotora.

La "secuencia líder de traducción" se refiere a una secuencia de nucleótidos localizada entre la secuencia promotora de un gen y la secuencia codificante. La secuencia líder de traducción está presente en el ARNm procesado completamente cadena arriba de la secuencia de inicio de la traducción. La secuencia líder de traducción puede afectar a numerosos parámetros incluyendo el procesamiento del transcrito primario en ARNm, estabilidad del ARNm y/o eficacia de traducción. Se han descrito ejemplos de secuencias líder de traducción (Turner y Foster (1995) Mol. Biotechnol. 3:225-236).

Las "secuencias no codificantes 3'" se refieren a secuencias de nucleótidos localizadas cadena abajo de una secuencia codificante e incluyen secuencias de reconocimiento de poliadenilación y otras secuencias que codifican señales reguladoras capaces de afectar al procesamiento del ARNm o expresión génica. La señal de poliadenilación se caracteriza habitualmente por afectar a la adición de extensiones de ácido poliadenílico en el extremo 3' del precursor de ARNm. El uso de diferentes secuencias no codificantes 3' se ejemplifica por Ingelbrecht et al. (1989) Plant Cell 1:671-680.

Una "proteína" o "polipéptido" es una cadena de aminoácidos dispuestos en un orden específico determinado por la secuencia codificante en un polinucleótido que codifica el polipéptido.

Una construcción de ADN es un ensamblaje de moléculas de ADN unidas juntas que proporcionan uno o más casetes de expresión. La construcción de ADN puede ser un plásmido posibilitado para auto-replicación en una célula bacteriana y contiene diversos sitios de restricción por enzima endonucleasa que son útiles para introducir moléculas de ADN que proporcionan elementos genéticos funcionales, es decir, promotores, intrones, líderes, secuencias codificantes, regiones de terminación 3', entre otros; o una construcción de ADN puede ser un ensamblaje lineal de moléculas de ADN, tal como un casete de expresión. El casete de expresión contenido dentro de una construcción de ADN comprende los elementos genéticos necesarios para proporcionar transcripción de un ARN mensajero. El casete de expresión puede diseñarse para expresarse en células procariotas o células eucariotas. Los casetes de expresión de la presente invención se diseñan para expresarse muy preferiblemente en células vegetales.

Las moléculas de ADN de la invención se proporcionan en casetes de expresión para su expresión en un organismo de interés. El casete incluirá secuencias reguladoras 5' y 3' unidas de forma funcional a una secuencia codificante de la invención. "Unidas de forma funcional" significa que las secuencias de ácido nucleico que están unidas son contiguas y, donde sea necesario unir dos regiones codificantes de proteína, contiguas y en la misma fase de lectura. Unido de forma funcional pretende indicar un enlace funcional entre un promotor y una segunda secuencia, donde la secuencia promotora inicia y media la transcripción de la secuencia de ADN correspondiente a la segunda

secuencia. El casete puede contener adicionalmente al menos un gen adicional a cotransformar en el organismo. Como alternativa, el gen o genes adicionales pueden proporcionarse en múltiples casetes de expresión o múltiples construcciones de ADN.

El casete de expresión incluirá en la dirección 5' a 3' de transcripción: una región de inicio de la transcripción y la traducción, una región codificante, y una región de terminación de la transcripción y la traducción funcional en el organismo que sirve como hospedador. La región de inicio de la transcripción (es decir, el promotor) puede ser nativa o análoga, o foránea o heteróloga al organismo hospedador. Además, el promotor puede ser la secuencia natural o como alternativa una secuencia sintética. Los casetes de expresión pueden contener adicionalmente secuencias líder 5' en la construcción del casete de expresión. Dichas secuencias líder pueden actuar potenciando la traducción.

Debe apreciarse que como se usa en este documento el término "transgénico" incluye cualquier célula, línea celular, callo, tejido, parte vegetal, o planta cuyo genotipo se ha alterado mediante la presencia de un ácido nucleico heterólogo incluyendo aquellos transgénicos inicialmente así alterados así como aquellos creados por cruces sexuales o propagación asexual a partir del transgénico inicial. El término "transgénico" como se usa en este documento no abarca la alteración del genoma (cromosómico o extra-cromosómico) por métodos convencionales de reproducción de plantas o por eventos de origen natural tales como fertilización cruzada aleatoria, infección vírica no recombinante, transformación bacteriana no recombinante, transposición no recombinante, o mutación espontánea.

Un "evento" transgénico se produce por transformación de células vegetales con una o más construcciones de ADN heterólogo, incluyendo un casete de expresión de ácido nucleico que comprende un transgén de interés, la regeneración de una población de plantas resultante de la inserción del transgén en el genoma de la planta, y la selección de una planta particular caracterizada por la inserción en una localización particular del genoma. Un evento se caracteriza fenotípicamente mediante la expresión del transgén. A nivel genético, un evento es parte de la composición genética de una planta. El término "evento" también se refiere a la descendencia producida por un cruce exogámico sexual entre el transformante y otra variedad que incluye el ADN heterólogo. Incluso después de retro-cruzamiento repetido con un progenitor recurrente, el ADN insertado y el ADN flanqueante del progenitor transformado está presente en la descendencia del cruce en la misma localización cromosómica. El término "evento" también se refiere a ADN del transformante original que comprende el ADN insertado y la secuencia flanqueante inmediatamente adyacente al ADN insertado que se esperaría que se transfiriera a una descendencia que recibe el ADN insertado incluyendo el transgén de interés como resultado de un cruce sexual de una línea progenitora que incluye el ADN insertado (por ejemplo, resultando el transformante original y la descendencia de autofertilización) y una línea progenitora que no contiene el ADN insertado.

Una planta de maíz TC1507 resistente a insectos puede reproducirse cruzando primero sexualmente una primera planta de maíz progenitora que consiste en una planta de maíz cultivada a partir de la planta de maíz TC1507 transgénica y la descendencia de la misma obtenida de la transformación con los casetes de expresión de la presente invención que confiere resistencia a insectos, y una segunda planta de maíz progenitora que carece de resistencia a insectos, produciendo de ese modo una pluralidad de plantas de la primera generación; y después seleccionando una planta de la primera generación que es resistente a insectos; y autofertilizando la planta de la primera generación, produciendo de ese modo una pluralidad de plantas de la segunda generación; y después seleccionando entre las plantas de la segunda generación una planta resistente a insectos. Estas etapas pueden incluir adicionalmente el retro-cruzamiento de la planta de la primera generación resistente a insectos o la planta de la segunda generación resistente a insectos con la segunda planta de maíz progenitora o una tercera planta de maíz progenitora, produciendo de este modo una planta de maíz que es resistente a insectos.

Como se usa en este documento, el término "planta" incluye referencias a plantas completas, órganos vegetales (por ejemplo, hojas, tallos, raíces, etc.), semillas, células vegetales, y descendencia de los mismos. Las partes de plantas transgénicas entendidas dentro del alcance de la invención comprenden, por ejemplo, células vegetales, protoplastos, tejidos, callos, embriones así como flores, tallos, frutos, hojas, y raíces que se originan en plantas transgénicas o su descendencia previamente transformada con una molécula de ADN de la invención y que por lo tanto consiste en al menos parte de células transgénicas, también son un aspecto de la presente invención.

Como se usa en este documento, la expresión "célula vegetal" incluye, sin limitación, semillas, cultivos en suspensión, embriones, regiones meristemáticas, tejido calloso, hojas, raíces, brotes, gametofitos, esporofitos, polen, y microesporas. La clase de plantas que pueden usarse en los métodos de la invención es generalmente tan amplia como la clase de plantas superiores susceptible a técnicas de transformación, incluyendo plantas tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas.

"Transformación" se refiere a la transferencia de un fragmento de ácido nucleico al genoma de un organismo hospedador, que provoca herencia genéticamente estable. Los organismos hospedadores que contienen los fragmentos de ácido nucleico introducidos por transformación se mencionan como organismos "transgénicos". Ejemplos de métodos de transformación de plantas incluyen transformación mediada por *Agrobacterium* (De Blaere et al. (1987) Meth. Enzymol. 143:277) y tecnología de transformación por partículas aceleradas o "pistola génica" (Klein et al. (1987) Nature (Londres) 327:70-73; patente de Estados Unidos Nº 4.945.050). A continuación se

describen métodos adicionales de transformación.

Por tanto, los polinucleótidos aislados de la presente invención pueden incorporarse en construcciones recombinantes, típicamente construcciones de ADN, que tienen capacidad de introducción y replicación en una célula hospedadora. Dicha construcción puede ser un vector que incluye un sistema de replicación y secuencias que tienen capacidad de transcripción y traducción de una secuencia codificante de polipéptido en una célula hospedadora dada. Se han descrito varios vectores adecuados para transfección estable de células vegetales o para el establecimiento de plantas transgénicas en, por ejemplo, Pouwels *et al.,* (1985; Sup. 1987) Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Weissbach y Weissbach (1989) Methods for Plant Molecular Biology, (Academic Press, Nueva York); y Flevin et al., (1990) Plant Molecular Biology Manual, (Kluwer Academic Publishers). Típicamente, los vectores de expresión en plantas incluyen, por ejemplo, uno o más genes de plantas bajo el control transcripcional de secuencias reguladoras 5' y 3' y un marcador de selección dominante. Dichos vectores de expresión en plantas también pueden contener una región reguladora promotora (por ejemplo, una regulación reguladora que controla la expresión inducible o constitutiva, regulada de forma ambiental o por el desarrollo, o específica de célula o tejido), un sitio de inicio de la transcripción, un sitio de unión al ribosoma, una señal de procesamiento del ARN, un sitio de terminación de la transcripción, y/o una señal de poliadenilación.

También debe entenderse que pueden aparearse dos plantas transgénicas diferentes para producir descendientes que contengan dos genes exógenos añadidos de segregación independiente. La auto-fertilización de la descendencia apropiada puede producir plantas que son homocigóticas para ambos genes exógenos añadidos. El retro-cruzamiento con una planta progenitora y el cruzamiento exogámico con una planta no transgénica también se contemplan, así como la propagación vegetativa. Pueden encontrarse descripciones de otros métodos de reproducción que se usan comúnmente para diferentes rasgos y cultivos en una de varias referencias, por ejemplo, Fehr, en Breeding Methods for Cultivar Development, Wilcos J. ed., American Society of Agronomy, Madison Wis. (1987).

Una "sonda" es un ácido nucleico aislado al que se une un marcador detectable o molécula indicadora convencional, por ejemplo, un isótopo radiactivo, ligando, agente quimioluminiscente, o enzima. Dicha sonda es complementaria a una hebra de un ácido nucleico diana, en el caso de la presente invención, a una hebra de ADN aislado del evento de maíz TC1507 sea de una planta de maíz o de una muestra que incluye ADN del evento. Las sondas de acuerdo con la presente invención incluyen no solamente ácidos desoxirribonucleicos o ribonucleicos sino también poliamidas y otros materiales de sonda que se unen específicamente a una secuencia de ADN diana y pueden usarse para detectar la presencia de la secuencia de ADN diana.

"Cebadores" son ácidos nucleicos aislados que hibridan con un ADN diana complementario por hibridación de ácidos nucleicos para formar un híbrido entre el cebador y la hebra de ADN diana, entonces se extienden a lo largo de la hebra de ADN diana mediante una polimerasa, por ejemplo, una ADN polimerasa. Los pares de cebadores de la presente invención se refieren a su uso para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico diana, por ejemplo, por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otros métodos convencionales de amplificación de ácido nucleico. "PCR" o "reacción en cadena de la polimerasa" es una técnica usada para la amplificación de segmentos específicos de ADN (véanse, las patentes de Estados Unidos Nº 4.683.195 y 4.800.159).

Las sondas y cebadores son de longitud suficiente de nucleótidos para unirse a la secuencia de ADN diana específicamente en las condiciones de hibridación o condiciones de reacción determinadas por el operario. Esta longitud puede ser de cualquier longitud que sea de longitud suficiente para ser útil en un método de detección de elección. Generalmente, se usan 11 nucleótidos o más de longitud, preferiblemente 18 nucleótidos o más, y más preferiblemente 22 nucleótidos o más. Dichas sondas y cebadores hibridan específicamente con una secuencia diana en condiciones de hibridación de alta rigurosidad. Preferiblemente, las sondas y cebadores de acuerdo con la presente invención tiene similitud de secuencia de ADN completa de nucleótidos contiguos con la secuencia diana, aunque pueden diseñarse sondas que difieren de la secuencia de ADN diana y que retienen la capacidad de hibridar con secuencias de ADN diana por métodos convencionales. Pueden usarse sondas como cebadores, pero generalmente se diseñan para unirse al ADN o ARN diana y no para usarse en un proceso de amplificación.

Pueden usarse cebadores específicos para amplificar un fragmento de integración para producir un amplicón que pueda usarse como una "sonda específica" para identificar el evento TC1507 en muestras biológicas. Cuando la sonda se hibrida con los ácidos nucleicos de una muestra biológica en condiciones que permiten la unión de la sonda a la muestra, esta unión puede detectarse y por tanto permite una indicación de la presencia del evento TC1507 en la muestra biológica. Dicha identificación de una sonda unida se ha descrito en la técnica. La sonda específica es preferiblemente una secuencia que, en condiciones optimizadas, hibrida específicamente con una región dentro de la región flanqueante 5' o 3' del evento y preferiblemente también comprende una parte del ADN foráneo contiguo con la misma. Preferiblemente la sonda específica comprende una secuencia al menos un 80%, preferiblemente entre un 80 y un 85%, más preferiblemente entre un 85 y un 90%, especialmente preferiblemente entre un 90 y un 95%, y mucho más preferiblemente entre un 95 y un 100% idéntica (o complementaria) a una región específica del evento.

Los métodos para preparar y usar sondas y cebadores se describen, por ejemplo, en Molecular Closing: A

Laboratory Manual, 2ª ed., vol. 1-3, ed. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1989 (a partir de ahora en este documento, "Sambrook *et al.,* 1989"); Current Protocols in Molecular Biology, ed. Ausubel et al., Greene Publishing y Wiley-Interscience, Nueva York, 1992 (con actualizaciones periódicas) (a partir de ahora en este documento, "Ausubel *et al.,* 1992"); e Innis et al., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press: San Diego, 1990. Los pares de cebadores de PCR pueden obtenerse de una secuencia conocida, por ejemplo, usando programas informáticos pretendidos para ese fin, tales como la herramienta de análisis cebadores de PCR en Vector NTI versión 6 (Informax Inc., Bethesda MD); PrimerSelect (DNASTAR Inc., Madison, WI); y Primer (Versión 0.5, © 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, Mass.). Además, la secuencia puede explorarse visualmente e identificarse manualmente los cebadores usando directrices conocidas para los especialistas en la técnica.

Un "kit" como se usa en este documento se refiere a un conjunto de reactivos con el fin de realizar el método de la invención, más particularmente, la identificación del evento TC1507 en muestras biológicas. El kit de la invención puede usarse, y sus componentes pueden ajustarse específicamente, con fines de control de calidad (por ejemplo, pureza de los lotes de semillas), detección del evento TC1507 en material vegetal, o material que comprende o deriva de material vegetal, tal como, aunque sin limitación, productos alimenticios o de forraje. "Material vegetal" como se usa en este documento se refiere a material que se obtiene o deriva de una planta.

Los cebadores y sondas basados en el ADN flanqueante y las secuencias de inserto descritos en este documento pueden usarse para confirmar (y, si fuera necesario, para corregir) las secuencias descritas por métodos convencionales, por ejemplo, por re-clonación y secuenciación de dichas secuencias. Las sondas y cebadores de ácido nucleico de la presente invención hibridan en condiciones rigurosas con una secuencia de ADN diana. Puede usarse cualquier método convencional de hibridación o amplificación de ácidos nucleicos para identificar la presencia de ADN de un evento transgénico en una muestra. Las moléculas de ácido nucleico o fragmentos de las mismas son capaces de hibridar específicamente con otras moléculas de ácido nucleico en ciertas circunstancias. Como se usa en este documento, se dice que dos moléculas de ácido nucleico son capaces de hibridar específicamente entre sí si las dos moléculas son capaces de formar una estructura anti-paralela, bicatenaria de ácido nucleico.

Se dice que una molécula de ácido nucleico es el "complemento" de otra molécula de ácido nucleico si muestra complementariedad completa. Como se usa en este documento, se dice que las moléculas muestran "complementariedad completa" cuando cada nucleótido de una de las moléculas es complementario a un nucleótido de la otra. Se dice que dos moléculas son "mínimamente complementarias" si pueden hibridar entre sí con suficiente estabilidad para permitirles permanecer hibridadas entre sí en al menos condiciones convencionales de "baja rigurosidad". Asimismo, se dice que las moléculas son "complementarias" si pueden hibridar entre sí con suficiente estabilidad para permitirles permanecer hibridadas entre sí en condiciones convencionales de "alta rigurosidad". Se describen condiciones rigurosas convencionales por Sambrook *et al.,* 1989, y por Haymes et al., En: Nucleic Acid Hybridization, a Practical Approach, IRL Press, Washington, D.C. (1985). Por lo tanto son permisibles desviaciones de la complementariedad completa, siempre que dichas desviaciones no impidan completamente la capacidad de las moléculas de formar una estructura bicatenaria. Para que una molécula de ácido nucleico sirva como cebador o sonda, solamente necesita ser suficientemente complementaria en secuencia para ser capaz de formar una estructura bicatenaria estable en el disolvente y concentraciones salinas particulares empleados.

En reacciones de hibridación, la especificidad es típicamente la función de los lavados post-hibridación, siendo los factores críticos la fuerza iónica y la temperatura de la solución de lavado final. El punto de fusión térmico (Tm) es la temperatura (a fuerza iónica y pH definidos) a la que el 50% de una secuencia diana complementaria hibrida con una sonda perfectamente apareada. Para híbridos ADN-ADN, puede obtenerse una aproximación de la Tm a partir de la ecuación de Meinkoth y Wahl (1984) Anal. Biochem. 138:267-284: Tm = 81,5ºC + 16,6 (log M) + 0,41 (%GC) - 0,61 (% form) - 500/L; donde M es la molaridad de cationes monovalentes, %GC es el porcentaje de nucleótidos de guanosina y citosina en el ADN, % form es el porcentaje de formamida en la solución de hibridación, y L es la longitud del híbrido en pares de bases. La Tm se reduce en aproximadamente 1ºC por cada 1% de desapareamiento; por tanto, la Tm, las condiciones de hibridación, y/o lavado pueden ajustarse para hibridar con secuencias de la identidad deseada. Por ejemplo, si se buscan secuencias con >90% de identidad, la Tm puede disminuirse 10ºC. Generalmente, se seleccionan condiciones rigurosas para que sean aproximadamente 5ºC inferiores que la Tm para la secuencia específica y su complemento a una fuerza iónica y pH definidos. Sin embargo, condiciones fuertemente rigurosas pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 1, 2, 3 o 4ºC inferior que la Tm; condiciones moderadamente rigurosas pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 6, 7, 8, 9, o 10ºC inferior que la Tm; condiciones de baja rigurosidad pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 11, 12, 13, 14, 15, o 20ºC inferior que la Tm.

Usando la ecuación, las composiciones de hibridación y lavado, y la Tm deseada, los especialistas en la técnica entenderán que se describen de forma inherente variaciones en la rigurosidad de las soluciones de hibridación y/o lavado. Si el grado deseado de desapareamiento provoca una Tm de menos de 45ºC (solución acuosa) o 32ºC (solución de formamida), se prefiere aumentar la concentración de SSC de modo que pueda usarse una temperatura mayor. Se encuentra una guía extensiva respecto a la hibridación de ácidos nucleicos en Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes,* Parte I, Capítulo 2

(Elsevier, Nueva York); y Ausubel *et al.,* eds. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology,* Capítulo 2 (Greene Publishing y Wiley-Interscience, Nueva York). Véase Sambrook et *al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, Nueva York).

Como se usa en este documento, una secuencia sustancialmente homóloga es una molécula de ácido nucleico que hibridará específicamente con el complemento de la molécula de ácido nucleico con la que se está comparando en condiciones de alta rigurosidad. Las condiciones rigurosas apropiadas que promueven la hibridación del ADN, por ejemplo, cloruro sódico/citrato sódico (SSC) 6X a aproximadamente 45ºC, seguido de un lavado de SSC 2X a 50ºC, son conocidas para los especialistas en la técnica o pueden encontrarse en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Típicamente, las condiciones rigurosas serán aquellas en que la concentración salina es menor de aproximadamente 1,5 M de iones Na, típicamente una concentración de aproximadamente 0,01 a 1,0 M de iones Na (u otras sales) a pH 7,0 a 8,3 y la temperatura es al menos de aproximadamente 30ºC para sondas cortas (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos) y de al menos aproximadamente 60ºC para sondas largas (por ejemplo, más de 50 nucleótidos). Las condiciones rigurosas también pueden conseguirse con la adición de un agente desestabilizante tal como formamida. Condiciones ejemplares de baja rigurosidad incluyen hibridación con una solución tamponante del 30 al 35% de formamida, NaCl 1 M, SDS (dodecil sulfato sódico) al 1% a 37ºC, y un lavado en SSC 1X a 2X (SSC 20X = NaCl 3,0 M/citrato trisódico 0,3 M) a 50 a 55ºC. Condiciones ejemplares de rigurosidad moderada incluyen hibridación en formamida del 40 al 45%, NaCl 1 M, SDS al 1% a 37ºC, y un lavado en SSC 0,5X a 1X a 55 a 60ºC. Condiciones ejemplares de alta rigurosidad incluyen hibridación en formamida al 50%, NaCl 1 M, SDS al 1% a 37ºC, y un lavado en SSC 0,1X a 60 a 65ºC. En una realización preferida, un ácido nucleico de la presente invención hibridará específicamente con una o más moléculas de ácido nucleico únicas para el evento TC1507 o complementos de las mismas o fragmentos de cualquiera de ellas en condiciones moderadamente rigurosas.

Los métodos de alineación se secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica. Por tanto, la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias cualesquiera puede realizarse usando un algoritmo matemático. Ejemplos no limitantes de dichos algoritmos matemáticos son el algoritmo de Myers y Miller (1988) CABIOS 4:11-17; el algoritmo de homología local de Smith et al. (1981) Adv. Appl. Math. 2:482; el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443-453; el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444-2448; el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264, modificado como en Karlin y Altschul (1993) Pro. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877.

Pueden utilizarse implementaciones informáticas de estos algoritmos matemáticos para la comparación de secuencias para determinar la identidad de secuencia. Dichas implementaciones incluyen, aunque sin limitación: CLUSTAL en el programa PC/Gene (disponible en Intelligenetics, Mountain View, California); el programa ALIGN (Versión 2.0); el programa ALIGN PLUS (versión 3.0, copyright 1997); y GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Versión 10 (disponible en Accelrys, 9685 Scranton Road, San Diego, CA 92121, EEUU). Las alineaciones usando estos programas pueden realizarse usando los parámetros por defecto.

El programa CLUSTAL está bien descrito por Higgins y Sharp, Gene 73: 237-244 (1988); Higgins y Sharp, CABIOS 5: 151-153 (1989); Corpet, et al., Nucleic Acids Research 16: 10881-90 (1988); Huang, et al., Computer Applications in the Biosciences 8: 155-65 (1992), y Pearson, et al., Methods in Molecular Biology 24: 307-331 (1994). Los programas ALIGN y ALIGN PLUS se basan en el algoritmo de Myers y Miller (1988) *supra.* Los programas BLAST de Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403 se basan en el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) *supra.* La familia de programas BLAST que puede usarse para búsquedas de similitud en base de datos incluye: BLASTN para secuencias de consulta de nucleótidos frente a secuencias de bases de datos de nucleótidos; BLASTX para secuencias de consulta de nucleótidos frente a secuencias de bases de datos de proteínas; BLASTP para secuencias de consulta de proteínas frente a secuencias de bases de datos de proteínas; TBLASTN para secuencias de consulta de proteínas frente a secuencias de bases de datos de nucleótidos; y TBLASTX para secuencias de consulta de nucleótidos frente a secuencias de bases de datos de nucleótidos. Véase, Current Protocols in Molecular Biology, Capítulo 19, Ausubel, et al., Eds., Greene Publishing y Wiley-Interscience, Nueva York (1995). La alineación también puede realizarse de forma manual por inspección.

Para obtener alineaciones con huecos con fines de comparación, puede utilizarse Gapped BLAST (en BLAST 2.0) como se describe en Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389. Como alternativa, puede usarse PSI-BLAST (en BLAST 2.0) para realizar una búsqueda iterada que detecte relaciones distantes entre moléculas. Véase *Altschul et al.* (1997) supra. Cuando se utiliza BLAST, Gapped BLAST, PSI-BLAST, pueden usarse los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, BLASTN para secuencias de nucleótidos, BLASTX para proteínas). Véase www.ncbi.hlm.nih.gov.

Como se usa en este documento, "identidad de secuencia" o "identidad" en el contexto de dos secuencias de ácido nucleico o polipeptídicas hace referencia a los restos en las dos secuencias que son iguales cuando se alinean para la máxima correspondencia sobre una ventana de comparación especificada. Cuando el porcentaje de identidad de secuencia se usa en referencia a proteínas se reconoce que las posiciones de los restos que no son idénticos a menudo difieren por sustituciones conservativas de aminoácido, donde los restos de aminoácido están sustituidos

por otros restos de aminoácido con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad) y por lo tanto no cambian las propiedades funcionales de la molécula. Cuando las secuencias difieren en sustituciones conservativas, el porcentaje de identidad de secuencia puede ajustarse al alza para corregir la naturaleza conservativa de la sustitución. Se dice que secuencias que difieren en dichas sustituciones conservativas tienen "similitud de secuencia" o "similitud". Los medios para hacer este ajuste son bien conocidos para los especialistas en la técnica. Típicamente esto implica valorar una sustitución conservativa como un desapareamiento parcial en lugar de completo, aumentando de este modo el porcentaje de identidad de secuencia. Por tanto, por ejemplo, cuando se da un valor de 1 para un aminoácido idéntico y se da un valor de cero para una sustitución no conservativa, a una sustitución conservativa se le da un valor entre cero y 1. La valoración de sustituciones conservativas se calcula, por ejemplo, implementada en el programa PC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, California).

Como se usa en este documento, "porcentaje de identidad de secuencia" significa el valor determinado por comparación de dos secuencias alineadas de forma óptima sobre una ventana de comparación, donde la parte de la secuencia polinucleotídica en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para una alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando la cantidad de posiciones en que aparece la base de ácido nucleico o resto de aminoácido idéntico en ambas secuencias para producir la cantidad de posiciones coincidentes, dividiendo la cantidad de posiciones coincidentes por la cantidad total de posiciones en la ventana de comparación, y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia.

Respecto a la amplificación de una secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, por PCR) usando un par de cebadores de amplificación particular, las "condiciones rigurosas" son condiciones que permite que el par de cebadores hibride solamente con la secuencia diana de ácido nucleico con la que uniría un cebador que tuviera la correspondiente secuencia de tipo silvestre (o su complemento) y preferiblemente para producir un producto de amplificación único, el amplicón, en una reacción térmica de amplificación del ADN.

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

Como se usa en este documento, "ADN amplificado" o "amplicón" se refiere al producto de amplificación de ácido nucleico de una secuencia de ácido nucleico diana que es parte de un molde de ácido nucleico. Por ejemplo, para determinar si una planta de maíz resultante de un cruce sexual contiene el ADN genómico del evento transgénico de la planta de maíz de la presente invención, el ADN extraído de la muestra tisular de la planta de maíz puede someterse a un método de amplificación de ácido nucleico usando un par de cebadores de ADN que incluye un primer cebador derivado de la secuencia flanqueante adyacente al sitio de inserción del ADN heterólogo insertado, y un segundo cebador derivado del ADN heterólogo insertado para producir un amplicón que es diagnóstico para la presencia del ADN del evento. Como alternativa, el segundo cebador puede obtenerse de la secuencia flanqueante. El amplicón es de una longitud y tiene una secuencia que también es diagnóstica para el evento. El amplicón puede variar en longitud desde la longitud combinada de los pares de cebadores más un par de bases nucleotídicas hasta cualquier longitud de amplicón producible por un protocolo de amplificación de ADN. Como alternativa, los pares de cebadores pueden obtenerse de la secuencia flanqueante en ambos lados del ADN insertado para producir un amplicón que incluya la secuencia de nucleótidos de inserto completa de la construcción de expresión PHI8999A, véase la FIG. 1, aproximadamente 6,2 Kb de tamaño. Un miembro de un par de cebadores derivado de la secuencia flanqueante puede localizarse una distancia desde la secuencia de ADN insertada, esta distancia puede variar desde un par de bases nucleotídicas hasta los límites de la reacción de amplificación, o aproximadamente veinte mil pares de bases nucleotídicas. El uso del término "amplicón" excluye específicamente dímeros de cebadores que pueden formarse en la reacción térmica de amplificación del ADN.

La amplificación de ácidos nucleicos puede realizarse por cualquiera de los diversos métodos de amplificación de ácido nucleico conocidos en la técnica, incluyendo reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se conoce en la técnica una diversidad de métodos de amplificación y se describen, inter alia, en las patentes de Estados Unidos Nº 4.683.195 y 4.683.202 y en PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, ed. Innis et al., Academic press, San Diego, 1990. Los métodos de amplificación por PCR se han desarrollado para amplificar hasta 22 Kb de ADN genómico y hasta 42 Kb de ADN de bacteriófago (Cheng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5695-5699, 1994). Estos métodos así como otros métodos conocidos en la técnica de amplificación de ADN pueden usarse en la práctica de la presente invención. Se entiende que puede necesitarse ajustar varios parámetros en un protocolo de PCR específico para condiciones específicas de laboratorio y pueden modificarse ligeramente y aún permitir la recogida de resultados similares. Estos ajustes serán evidentes para los especialistas en la técnica.

El amplicón producido por estos métodos puede detectarse por una pluralidad de técnicas incluyendo, aunque sin limitación, el Análisis genético por Fragmentos (Nikiforov, et al. Nucleic Acid Res. 22:4167-4175, 1994) donde se diseña un oligonucleótido de ADN que solapa tanto con la secuencia de ADN flanqueante adyacente como con la secuencia de ADN insertada. El oligonucleótido se inmoviliza en pocillos de una placa de micropocillos. Después de la PCR de la región de interés (usando un cebador primer en la secuencia insertada y uno en la secuencia flanqueante adyacente) puede hibridarse un producto de PCR monocatenario con el oligonucleótido inmovilizado y servir como molde para una reacción de extensión de bases individuales usando una ADN polimerasa y ddNTP

marcados específicos para la siguiente base esperada. La lectura puede ser fluorescente o basada en ELISA. Una señal indica la presencia de la secuencia de inserto/flanqueante debido a una amplificación, hibridación, y extensión de bases individuales satisfactorias.

Otro método de detección es la técnica de Pirosecuenciación descrita por Winge (Innov. Pharma. Tech. 00: 18-24, 2000). En este método se diseña un oligonucleótido que solapa con la unión de ADN adyacente y ADN de inserto. El oligonucleótido se hibrida con un producto de PCR monocatenario desde la región de interés (un cebador en la secuencia insertada y uno en la secuencia flanqueante) y se incuba en presencia de una ADN polimerasa, ATP, sulfurilasa, luciferasa, apirasa, adenosina 5' fosfosulfato y luciferina. Los dNTP se añaden individualmente y la incorporación produce una señal de luz que se mide. Una señal de luz indica la presencia de la secuencia de inserto transgénico/flanqueante debido a una amplificación, hibridación, y extensión de bases individuales o multi-base satisfactorias.

Polarización de Fluorescencia como se describe por Chen et al., (Genome Res. 9:492-498, 1999) es un método que puede usarse para detectar un amplicón de la presente invención. Usando este método se diseña un oligonucleótido que solapa la unión de ADN flanqueante e insertado. El oligonucleótido se hibrida con un producto de PCR monocatenario desde la región de interés (un cebador en el ADN insertado y uno en la secuencia de ADN flanqueante) y se incuba en presencia de una ADN polimerasa y un ddNTP marcado de forma fluorescente. La extensión de bases individuales provoca la incorporación del ddNTP. La incorporación puede medirse como un cambio en la polarización usando un fluorómetro. Un cambio en la polarización indica la presencia de la secuencia de inserto transgénico/flanqueante debido a una amplificación, hibridación, y extensión de bases individuales satisfactorias.

Taqman® (PE Applied Biosystems, Foster City, Calif.) se describe como un método para detectar y cuantificar la presencia de una secuencia de ADN y se comprende completamente en las instrucciones proporcionadas por el fabricante. En resumen, se diseña una sonda oligonucleotídica FRET que solapa la unión de ADN flanqueante y de inserto. La sonda FRET y los cebadores de PCR (un cebador en la secuencia de ADN de inserto y uno en la secuencia genómica flanqueante) se ciclan en presencia de una polimerasa termoestable y dNTP. La hibridación de la sonda FRET provoca la escisión y liberación del resto fluorescente lejos del resto inactivador en la sonda FRET. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia flanqueante/de inserto transgénico debido a una amplificación e hibridación satisfactorias.

Se han descrito Balizas Moleculares para su uso en la detección de secuencias como se describe en Tyangi et al. (Nature Biotech. 14:303-308, 1996). En resumen, se diseña una sonda oligonucleotídica FRET que solapa la unión de ADN flanqueante y de inserto. La estructura única de la sonda FRET provoca que contenga la estructura secundaria que mantiene los restos fluorescente e inactivador en gran proximidad. La sonda FRET y los cebadores de PCR (un cebador en la secuencia de ADN de inserto y uno en la secuencia flanqueante) se ciclan en presencia de una polimerasa termoestable y dNTP. Después de la satisfactoria amplificación por PCR, la hibridación de la sonda FRET con la secuencia diana provoca la eliminación de la estructura secundaria de la sonda y la separación espacial de los restos fluorescente e inactivador. Se produce una señal fluorescente. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia flanqueante /de inserto transgénico debido a una amplificación e hibridación satisfactorias.

Una reacción de hibridación usando una sonda específica para una secuencia encontrada dentro del amplicón es otro método más usado para detectar el amplicón producido por una reacción de PCR.

La presente invención se define adicionalmente en los siguientes Ejemplos. Debe entenderse que estos Ejemplos, aunque indican realizaciones preferidas de la invención, se dan a modo de ilustración solamente. A partir del anterior análisis y estos Ejemplos, un especialista en la técnica puede establecer las características esenciales de esta invención, y son alejarse del alcance de la misma, puede hacer diversos cambios y modificaciones de la invención para adaptarla a diversos usos y condiciones. Por tanto, serán evidentes diversas modificaciones de la invención, además de las mostradas y descritas en este documento, para los especialistas en la técnica a partir de la anterior descripción. Se pretende que dichas modificaciones estén también dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

Ejemplo 1. Transformación de maíz por bombardeo con partículas y regeneración de plantas transgénicas que contienen el gen CryIF

Se usó una molécula de ADN de 6,2 Kb, denominada PHI8999A (véase la FIG. 1 y la SEC ID Nº 25), que incluye un primer casete de expresión transgénica que comprende el promotor, el exón no traducido 5', y el primer intrón del gen de la ubiquitina de maíz (Ubi-1) (Christensen et al. (1992) Plant Mol. Biol. 18:675-689 y Christensen y Quail (1996) Transgenic Res. 5:213-218) conectado de forma funcional a una molécula de ADN que codifica una δ-endotoxina de Bacillus thuringiensis identificada como CryIF (patentes de Estados Unidos Nº 5.188.960 y 6.218.188) conectada de forma funcional a una molécula de ADN que comprende un terminador de la transcripción ORF25 3'

aislado de *Agrobacterium tumefaciens* (Barker et al. (1983) Plant Mol. Biol. 2:335-350), y un segundo casete de expresión transgénica que comprende una molécula de ADN del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Odell J.T. et al. (1985) Nature 313: 810-812; Mitsuhara et al. (1996) Plant Cell Physiol. 37:49-59) conectado de forma funcional a una molécula de ADN que codifica el marcador de selección, el gen de la fosfinotricina acetiltransferasa (PAT) (Wohlleben W. et al. (1988) Gene 70:25-37) conectado de forma funcional a una molécula de ADN que comprende el terminador de la transcripción 3' de 35S (CaMV) (véase Mitsuhara et al. (1996) Plant Cell Physiol. 37:49-59) para transformar tejido embrionario de maíz.

Se obtuvieron plantas de maíz *B.t.* Cry1F por bombardeo con microproyectiles usando la pistola de partículas Biolistics® PDS-1000He fabricada por Bio-Rad, Hercules, CA; esencialmente como se describe por Klein et al. (1987) Nature, RU 327(6117):70-73. Se cultivaron embriones inmaduros aislados de mazorcas, recogidos pronto después de la polinización en medio de inicio de callo durante varios días. En el día de la transformación, se recubrieron partículas microscópicas de tungsteno con ADN PHI8999A (SEC ID Nº 25) purificado y se aceleraron en los embriones cultivados, donde el ADN de inserto se incorporó en el cromosoma celular. Se usó solamente el inserto PHI8999A durante la transformación y no se incorporó ADN plasmídico adicional en el transformante. Después del bombardeo, los embriones se transfirieron a medio de inicio de callo que contenía glufosinato como agente de selección. Los embriones individuales se mantuvieron físicamente separados durante el cultivo, y la mayoría de los explantes murieron en el medio selectivo.

A los embriones que sobrevivieron y produjeron tejido calloso sano resistente a glufosinato se les asignó códigos de identificación únicos que representan eventos de transformación putativos, y se transfirieron de forma continua a medio de selección fresco. Las plantas se regeneraron a partir del tejido derivado de cada evento único y se transfirieron al invernadero. Se tomaron muestras foliares para análisis molecular para verificar la presencia del transgén por PCR y para confirmar la expresión de la proteína Cry IF por ELISA. Las plantas después se sometieron a un bioensayo de planta completa usando insectos barrenadores europeos del maíz. Las plantas positivas se cruzaron con líneas endogámicas para obtener semillas de las plantas transformadas iniciales. Se evaluaron varias líneas en el campo. El evento TC1507 se seleccionó de una población de eventos transgénicos independientes basados en una combinación superior de características, incluyendo resistencia a insectos y rendimiento agronómico (véase Bing JW et al. (2000) Efficacy of Cry1F Transgenic Maize, 14th Biennial International Plant Resistance to Insects Workshop, fort Collins, CO).

Ejemplo 2. Identificación de nucleótidos que comprenden la secuencia flanqueante 5' al ADN de inserto transgénico en la línea de maíz CrylF de *Bacillus thuringiensis* TC1507

Para identificar un fragmento de ADN que incluyera la secuencia 5' al inserto PHI8999A en el evento TC1507, se seleccionaron por tamaño fragmentos de la enzima de restricción Spe I del fragmento de ADN genómico del evento TC1507 en geles de agarosa, se purificaron, y se exploraron por análisis de Southern para confirmar la hibridación con una sonda CrylF. Después de la confirmación de la hibridación y el tamaño de los fragmentos, los fragmentos de interés se clonaron en un vector de clonación pBluescript II SK (+)™ para preparar un plásmido seleccionado por tamaño enriquecido basado en biblioteca de ADN genómico. Se usó una sonda homóloga a una parte del gen Cry1F para explorar la biblioteca plasmídica para clones positivos. Se identificó un clon positivo, se purificó por exploración adicional, y se confirmó que producía una señal positiva cuando hibridaba con la sonda CrylF. Se secuenciaron casi 3 Kb del fragmento Spe I contenido en el clon positivo aislado usando un enfoque de paseo con cebador. Para iniciar la primera ejecución de secuenciación, se diseñó un cebador que se une a una secuencia conocida en el ADN del vector de clonación para secuenciar una parte del ADN de interés. Una segunda ejecución de secuenciación sobre la misma región usando otro cebador orientado en la dirección inversa proporcionó la cobertura de la segunda hebra. El paseo con cebador se consiguió usando repetidamente los datos de secuencia de ejecuciones previas para diseñar nuevos cebadores que después se usaron para extender la siguiente ronda de secuenciación adicionalmente en el ADN de interés hasta que se obtuvo la secuencia flanqueante 5' al ADN transgénico insertado en el evento de maíz TC1507. Se proporciona información de secuencia específica en el Ejemplo 4.

Ejemplo 3. Confirmación de la secuencia flanqueante 5' al inserto TC1507 de la línea de maíz *B.t.* CrylF

Para confirmar la secuencia flanqueante 5' del inserto TC1507 de la línea de maíz *B.t.* CrylF, se diseñaron pares de cebadores de PCR para obtener productos de PCR solapantes que se extienden desde la región flanqueante 5' en el inserto transgénico PHI8999A de longitud completa. Los productos de PCR se amplificaron satisfactoriamente a partir del ADN genómico de TC1507 de la línea de maíz *B.t.* CrylF, se aislaron, y se secuenciaron para la Región 1 a la Región 6, mostrada en la Tabla 1, y se confirmó que apareaba con la secuencia previamente determinada desde el fragmento Spe I, descrito en el Ejemplo 2. Sin embargo, la región desde el pb 2358 hasta el pb 2829, inmediatamente adyacente y 5' al inicio del inserto de longitud completa fue recalcitrante para la amplificación por PCR y pareció ser más grande que la secuencia obtenida del clon Spe I descrito anteriormente. El uso de pares de cebadores que flanquean esta región y el mezcla de polimerasa Advantage®-GC 2 (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA) fue satisfactorio en la amplificación de productos de PCR a partir del ADN genómico de TC1507 de la línea de maíz *B.t.* CrylF para secuenciación. Las condiciones de amplificación usadas para producir amplicones con el sistema Advantage®-GC 2 se muestran en la Tabla 10. Los pares de cebadores de ADN usados para confirmar la secuencia en la región desde el pb 2358 al 2829 son los enumerados en la SEC ID Nº 1 y SEC ID Nº 2; y SEC ID Nº

2 y SEC ID Nº 23. La secuencia de esta región se describe en la Tabla 1 (Regiones 7a, 7b, 7c, y 8).

Ejemplo 4. Secuencia flanqueante 5' del evento TC1507. Se proporciona una descripción de cada región en la Tabla 1.

Región 1 (SEC ID Nº 28) genómica de maíz (sin homología significativa)

```
   1  ACTAGTTTCC TAGCCCGCGT CGTGCCCCTA CCCCACCGAC GTTTATGGAA
  51  GGTGCCATTC CACGGTTCTT CGTGGCCGCC CCTAAGGATG TAAATGGTCG
 101  GTAAAATCCG GTAAATTTCC GGTACCGTTT ACCAGATTTT TCCAGCCGTT
 151  TTCGGATTTA TCGGGATATA CAGAAAACGA GACGGAAACG GAATAGGTTT
 201  TTTTTCGAAA ACGGTACGGT AAACGGTGAG ACAAACTTAC CGTCCGTTTT
 251  CGTATTTCTC GGGAAACTCT GGTATATTCC CGTATTTGTC CCGTATTTTC
 301  CCGACCCACG GACCTGCCAA TCAACCATCA GCCAGTCAGC CCATCCCCAC
 351  AGCTATGGCC CATGGGGCCA TGTTGGCCAC ATGCCCACGC AACGCAAGGC
 401  AGTAAGGCTG GCAGCCTGGC ACGCATTGAC GCATGTGGAC ACACACAGCC
 451  GCCGCCTGTT CGTGTTTCTG TGCCGTTGTG CGAGACTGTG ACTGCGAGTG
 501  GCGGAGTCGG CGAACGGCGA GGCGTCTCCG GAGTCTGGAC TGCGGCTGTG
 551  GACAGCGACG CTGTGACGGC GACTCGGCGA AGCCCCAAGC TACCAAGCCC
 601  CCAAGTCCCC ATCCATCTCT GCTTCTCTGG TCATCTCCTT CCCCTGGTCG
 651  ATCTGCAGGC GCCAGACCG
```

Región 2 (SEC ID Nº 29) secuencia genómica de maíz no descrita (complemento)

```
 670  G CCGAAGCATC ACGAAACGCA CTAAGACCTC
 701  GAAGGAGTCA AACCACTCCT CCGAGGCCTC GGGGGCTACA CCCGGCGGGT
 751  GCGCTCGCGC GCACCCACCG GAACAAAATG TAACCGAGAA AGGTCGGTCC
 801  CCTTGC AAAA AAAGTGCGAC AAAAGCCTCC AAGCGAGTAT TAACACTCAC
 851  TTTGAGGCTC GGGGGCTAC
```

Región 3 (SEC ID Nº 30) fragmento de retrotransposón Huck-1 de maíz

```
 870  T GTCGGGGACC ATAATTAGGG GTACCCCCAA
 901  GACTCCTAAT CTCAGCTGGT AACCCCCATC AGCACAAAGC TGCAAAGGCC
 951  TGATGGGTGC GATTAAGTCA AGGCTCGGTC CACTCAAGGG ACACGATCTC
1001  GCCTCGCCCG AGCCCAGCCT CGGGCAAGGG CGGCCGACCC CGAGGATTCA
1051  CGTCTCGCCC GAGGGCCCCC TCAAGCGACG GGCACACCTT CGGCTCGCCC
1101  GAGGCCCATT CTTCGCCGAG AAGCAACCTT GGCCAGATCG CCACACCGAC
1151  CGACCGTATC GCAGGAGCAT TTAATGCGAG GATCGCCTGA CACCTTATCC
1201  TGACGCGCGC TCTTCAGTCG ACAGAGCCGA AGTGACCGCA ATCACTTCGC
1251  CGCTCCACTG ACCGACCTGA CAAGAAGACA GCGCCGCCTG CGTCGCTCCG
1301  ACTGCTGTGC CACTCGACAG AGTGAGGCTG ACAGCAGCCA AGTCCGGCCT
1351  CGGGCGCCAT AGGAAGCTCC GCCTCGCCCG ACCCTAGGGC TCGGACTCGG
1401  CCTCGGCTCC GGAAGACGAC GAACTACGCT TCGCCCGACC CCAGGGCTTG
1451  GACTCAGCCT CGGCTCCGGA AGACGACGAA TTCCGCCTCG CCCGACCCCA
1501  GGGCTCGGAC TCGGCCTCGG CTCCAGAAGA CGACGAACTC CGCCTCGCCC
1551  GACCCCAGGG CTCGGACTCA GCCTCGGCTC CGGAAGACGA CGAACTCCGC
1601  CTCGCCCGAC CCCAGGGCTC GGACTCAGCC TCGGCCTCAG ACGATGGTCT
1651  CCGCCTCGCC CGACCCGGGG CTCGGACTCG A
```

Región 4 (SEC ID Nº 31) fragmento del gen *cryIF*

```
1682  CCTTTCTAT CGGACCTTGT
1701  CAGATCCTGT CTTCGTCCGA GGAGGCTTTG GCAATCCTCA CTATGTACTC
1751  GGTCTTAGGG GAGTGGCCTT TCAACAAACT GGTACGAATC ACACCCGCAC
1801  ATTCAGGAAC TCCGGGACCA TTGACTCTCT AGATGAGATA CCACCTCAAG
1851  ACAACAGCGG CGCACCTTGG AATGACTACT CCCATGTGCT GAATCATGTT
1901  ACCTTTGTGC GCTGGCCAGG TGAGATCTCA GGTTCCGACT CATGGAGAGC
1951  ACCAATGTTC TCTTGGACGC ATCGTAGCGC TACCCCCACA AACACCATTG
2001  ATCCAGAGAG AATCAC
```

Región 5 (SEC ID Nº 32) fragmento del gen *rpoC2* de cloroplasto de maíz

```
2017  TCAT TCTTCAAGAA CTGCATATCT TGCCGAGATC
2051  CTCATCCCTA AAGGTACTTG ACAATAGTAT TATTGGAGTC GATACACAAC
2101  TCACAAAAAA TACAAGAAGT CGACTAGGTG GATTGGTCCG AGTGAAGAGA
```

2151 AAAAAAAGCC ATACAGAACT CAAAATCTTT TCCGGAGATA TTCATTTTCC
2201 TGAAGAGGCG GATAAGATAT TAGGTGGCAG TTTGATACCA CCAGAAAGAG
2251 AAAAAAAAGA TTCTAAGGAA TCAAAAAAAA GGAAAAATTG GGTTTATGTT
2301 CAACGGAAAA AATTTCTCAA AAGCAAGGAA AAGTATT

Región 6 (SEC ID Nº 33) fragmento del promotor de cloroplasto o *ubiZM1(2)* de maíz

2338 GTG GCTATTTATC
2351 TATC

Nucleótidos 2355-2358 (CGT) conectan la región 6 a la región 7a.
Región 7a (SEC ID Nº 34) fragmento del gen *pat*

2358 GCA GCTGATATGG CCGCGGTTTG TGATATCGTT AACCATTACA
2401 TTGAGACGTC TACAGTGAAC TTTAGGACAG AGCCACAAAC ACCACAAGAG
2451 TGGATTGATG ATCTAGAGAG GTTGCAAGAT AGATACCCTT GGTTGGTTGC
2501 TGAGGTTGAG GGTGTTGTGG CTGGTATTGC TTACGCTGGG CCCTGGAAGG
2551 CTAGGAAC

Región 7b (SEC ID Nº 35) fragmento del gen *pat* (complemento)

2559 CC TCAACCTCAG CAACCAACCA ATGGTATCTA TCTTGCAACC
2601 TCTCTAGATC ATCAATCCAC TCTTGTGGTG TTTGTGGCTC TGTCCTAAAG
2651 TTCACTGTAG ACGTCTCAAT GTAATGGTTA ACGATATCAC AAACCG

Región 7c (SEC ID Nº 36) fragmento del gen cry1F (complemento)

2697 AGAG
2701 AAGAGGGATCT

Región 8 (SEC ID Nº 37) fragmento de polienlazador

2712 CGAAGCTTC GGCCGGGGCC CATCGATATC CGCGGGCATG
2751 CCTGCAGTGC AGCGTGACCC GGTCGTGCCC CTCTCTAGAG ATAATGAGCA
2801 TTGCATGTCT AAGTTATAAA AAATTACCA

Región 9 (SEC ID Nº 25) inserto de longitud completa de PHI8999A

Ejemplo 5. Descripción de la secuencia flanqueante 5' al inserto en el evento de maíz TC1507

Para describir más completamente el evento TC1507, se hizo una búsqueda de homología de la secuencia flanqueante 5' frente a las bases de datos públicas de GenBank (publicación 122, 2/01) usando la herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLAST). El programa BLAST realiza búsquedas de similitud de secuencia y es particularmente útil para identificar homólogos con una secuencia desconocida. Además de la búsqueda en las bases de datos públicas, se realizaron alineaciones por pares usando AlignX (InforMax Inc., Bethesda, MD) para buscar homologías entre la secuencia flanqueante del evento de maíz TC1507 y el inserto transgénico PHI8999A. Los resultados de estas búsquedas de homología se presentan en la Tabla 1. La secuencia flanqueante 5' de TC1507 se enumera con la base 1 siendo la más alejada 5' al inserto y la base 2830 en el punto de inicio del inserto transgénico PHI8999A de longitud completa (véase la FIG. 1). Los valores porcentuales de identidad indican el porcentaje de apareamiento idénticos a lo largo de la longitud de las secuencias analizadas.

En la mayoría de los casos, la búsqueda de similitud con la secuencia flanqueante 5' del evento TC1507 produjo un apareamiento con una secuencia única basado en un valor porcentual de identidad muy alto. Esas secuencias se identifican en la Tabla 1. Además, existen dos regiones en la secuencia flanqueante de ADN 5' de TC1507 con alta similitud con más de una secuencia conocida. En las regiones 870-1681 y 2338-2354, los valores porcentuales de identidad con ambos fragmentos de secuencia son suficientemente altos para no poder determinar un único apareamiento (homólogo). Los dos posibles homólogos para cada una de estas regiones se indican en la Tabla 1.

Se identificaron secuencias muy similares para roda salvo las primeras 669 pares de bases de la secuencia. Generalmente, los resultados de la búsqueda de similitud indican alta homología con secuencias genómicas de maíz 5' a la base 1681. La región desde la base 1682 hasta el inicio del inserto PHI8999A en la posición 2830 contiene algunos fragmentos asociados con el evento de transformación.

Tabla 1. Sumario de secuencias para el inserto del evento TC1507

Región	Localización en la SEC ID Nº 24	Tamaño pb	% de identidad	Homólogo	Localización en secuencia homóloga	Descripción
1	1-669	669	N/A[1]	N/A	N/A	Sin homología significativa detectada
2	670-869	200	90,5	AF123535	52432-52632 (complemento)	Secuencia genómica de maíz no descrita
Región	**Localización en la SEC ID Nº 24**	**Tamaño pb**	**% de identidad**	**Homólogo**	**Localización en secuencia homóloga**	**Descripción**
3	870-1681	812	89,4	AF050439	1-801	Fragmento de retrotransposón Huck-1 de maíz 5' LTR[2]
			86,6	AF050438	1-797	Fragmento de retrotransposón Huck-1 de maíz 3' LTR
4	1682-2016	335	100,0	PHI8999A	3149-3483	Fragmento del gen cry1F
5	2017-2337	321	100,0	X86563	29429-29749	Fragmento del gen *rpoC2* de cloroplasto de maíz (subunidad beta-2 de ARN polimerasa)
Región	**Localización en la SEC ID Nº 24**	**Tamaño pb**	**% de identidad**	**Homólogo**	**Localización en secuencia homóloga**	**Descripción**
6	2338-2354	17	100,0	X86563	97643-97659	Fragmento del gen *trnI* de cloroplasto de maíz (ARNt-Ile)
			82,4	PHI8999A	182-197	Fragmento del promotor de ubiZM1(2) de maíz
7a	2358-2558	201	100,0	PHI8999A	5320-5475	Fragmento del gen *pat*
7b	2559-2696	138	99	PHI8999A	5336-5518 (complemento)	Fragmento del gen *pat*
7c	2697-2711	15	100,0	PHI8999A	2544-2558 (complemento)	Fragmento del gen cry1F
8	2712-2829	118	100,0	PHI8999A	36-153	Fragmento de la región polienlazadora (bases 36-80) y promotor de ubiZM1(2) (bases 81-153)
9	2830-9015	6186	100,0	PHI8999A	11-6196	Inserto de longitud completa de PHI8999A
10	9016-9565	550	100,0	PHI8999A	3906-4456 (complemento)	Terminador ORF25 invertido
11	9566-9693	128	100,0	NC_001666	121851-121978 (complemento) y 100759-100886	Fragmento del ARNr *rps12* de cloroplasto de maíz (ARN ribosómico 23S)
Región	**Localización en la SEC ID Nº 24**	**Tamaño pb**	**% de identidad**	**Homólogo**	**Localización en secuencia homóloga**	**Descripción**
12	9696-10087	392	99	NC_001666	17091-17483 (complemento)	Fragmento de genoma de cloroplasto de maíz
13	10088-10275	188	99	PHI8999A	5333-5520 (complemento)	Fragmento del gen *pat*
14	10278-10358	81	100	NC_001666	137122-137202 (complemento)	Fragmento de "ORF241" de cloroplasto de maíz -gen de proteína hipotética
15	10359-10612	254	N/A[1]	N/A	N/A	Sin homología significativa detectada
16	10613-11361	749	N/A[1]	N/A	N/A	Sin descripción disponible

[1] N/A; no aplicable
[2] LTR; repetición terminal larga

Ejemplo 6: Confirmación de la presencia de regiones 1, 2, y 3 en una línea de maíz de control no modificada

Se usó análisis por PCR para determinar si las regiones 1, 2, y 3 (Tabla 1) en la región flanqueante 5' del evento TC1507 están presentes en una línea de maíz de control no modificada usada para transformación para producir el

evento de maíz TC1507 y por tanto representa una frontera con ADN genómico de maíz. Se realizaron nueve diferentes análisis de PCR sobre ADN genómico preparado a partir de TC1507 y la línea de maíz de control no modificada Hi-II (véase Armstrong (1994) The Maize Handbook, ed. Freeling y Walbot, Springer-Verlag, Nueva York, pág. 663-671, para información sobre Hi-II) como se resume en la Tabla 2 usando las secuencias cebadoras mostradas en la Tabla 3. Se diseñaron dos reacciones para amplificar el ADN dentro de la región 1 de la región de depósito 5' del pb 25 a 324 (Reacción A - amplicón de 300 pb); y desde el pb 25 a 480 (Reacción B - amplicón de 456 pb). Los amplicones esperados estuvieron presentes tanto en la línea de maíz no modificada Hi-II como en el evento de maíz TC1507. Un par de cebadores de PCR, Reacción C, abarcó la región 2 a la región 3 de la región flanqueante 5' desde el pb 759 a 1182 (amplicón de 424 pb) y de nuevo produjo productos de PCR del tamaño esperado tanto en Hi-II como TC1507. La Reacción D abarcó la región 1 a región 3 de la región flanqueante 5' desde el pb 415 a 1182 (amplicón de 768 pb) y de nuevo produjo productos de PCR del tamaño esperado tanto en Hi-II como TC1507. Las Reacciones E y F se diseñaron como pares de cebadores específicos para la región del gen *pat* del inserto de longitud completa de PHI8999A en TC1507 y por tanto no se espera un amplicón en la línea de maíz Hi-II no modificada. Los resultados indican que ambas Reacciones E y F son específicas para una línea de maíz transformada con una región del gen *pat* y producen el amplicón esperado, mientras que no se produjo amplicón en la línea de maíz Hi-II no modificada. La Reacción G también se diseñó como un par de cebadores que produciría un amplicón de 366 pb en el evento de maíz TC1507 y sin amplicón en la línea de maíz Hi-II no modificada.

Las Reacciones H y I se diseñaron como pares de cebadores específicos para TC1507 que abarcarían el final del inserto transgénico en la región flanqueante 5'. En ambas Reacciones H y I, el cebador inverso estaba localizado en la región del promotor de ubiquitina del inserto de longitud completa PHI8999A (región 9 en la Tabla 1) y el cebador directo estaba localizado en la región 5, el fragmento del gen *rpoC2* (véase la Tabla 1). La Reacción H y la Reacción I produjeron ambas un amplicón en la línea de maíz TC1507 y no produjeron un amplicón en la línea de maíz de control no modificada. Estos resultados indican que ambas Reacciones H e I son específicas para el evento TC1507.

Los resultados de PCR muestran que la secuencia no descrita (región 1) está presente en la línea de maíz no modificada Hi-II y que las regiones 1, 2 y 3, son contiguas en la línea de maíz no modificada Hi-II. Las secuencias de ADN amplificadas en las Reacciones A, B, C, y D no son únicas para la región flanqueante 5' del evento de maíz TC1507 sino que también están presente en la línea de maíz no modificada Hi-II.

Tabla 2. Reacciones de PCR para la secuencia 5' al inserto PHI8999A en el evento de maíz TC1507 y para regiones dentro del inserto de longitud completa de PHI8999A en el evento de maíz TC1507

Reacción	Localización del amplicón de PCR	Tamaño del amplicón (pb)	Región en la secuencia flanqueante de TC1507 o inserto PHI8999A	Amplicón presente en Hi-II	Amplicón presente en línea de maíz TC1507
A	25 - 324 pb en la secuencia flanqueante de TC1507	300	Región 1	Sí	Sí
B	25 - 480 pb en la secuencia flanqueante de TC1507	456	Región 1	Sí	Sí
Reacción	**Localización del amplicón de PCR**	**Tamaño del amplicón (pb)**	**Región en la secuencia flanqueante de TC1507 o inserto PHI8999A**	**Amplicón presente en Hi-II**	**Amplicón presente en línea de maíz TC1507**
	pb en la secuencia flanqueante de TC1507		3		
D	415 - 1182 pb en la secuencia flanqueante 5' de TC1507	768	Región 1 a región3	Sí	Sí
E No única para TC1507	4750 - 5794 pb en PHI8999A	1045	Región 9 (en inserto de longitud completa de PHI8999A, promotor 35S hasta gen *pat*)	No	Sí
F No única para TC1507	4827 - 5308 pb en PHI8999A	482	Región 9 (en inserto de longitud completa de PHI8999A, promotor 35S hasta gen *pat*)	No	Sí

Reacción	Localización del amplicón de PCR	Tamaño del amplicón (pb)	Región en la secuencia flanqueante de TC1507 o inserto PHI8999A	Amplicón presente en Hi-II	Amplicón presente en línea de maíz TC1507
Detecta el fragmento cry IF en región flanqueante 5'	Secuencia *cry*1F en secuencia flanqueante 5' y en inserto de longitud completa de PHI8999A	366	Abarca 335 pb de la secuencia *Cry*1F en la secuencia flanqueante 5' y la misma secuencia en el inserto de longitud completa	No	Sí
Reacción	**Localización del amplicón de PCR**	**Tamaño del amplicón (pb)**	**Región en la secuencia flanqueante de TC1507 o inserto PHI8999A**	**Amplicón presente en Hi-II**	**Amplicón presente en línea de maíz TC1507**
H Única para TC1507	2158 pb en región 5 (fragmento del gen *rpoC2*) hasta 3069 pb en región 9 (inserto de longitud completa de PHI8999A)	912	Región 5 a región 9 única para el evento de inserción [ABARCA REGIONES DE UNIÓN ÚNICAS]	No	Sí
I Única para TC1507	2158 pb en región 5 (fragmento del gen *rpoC2*) hasta 3001 pb en región 9 (inserto de longitud completa de PHI8999A)	844	Región 5 a región 9 única para el evento de inserción [ABARCA REGIONES DE UNIÓN ÚNICAS]	No	Sí

Tabla 3. Cebadores de PCR para la secuencia 5' al inserto PHI8999A en TC1507 y para regiones dentro del inserto de longitud completa de PHI8999A en el evento de maíz TC1507

Reacción	Tamaño de amplicón (pb)	Par de cebadores	Secuencias cebadoras 5' a 3'
A	300	SEC ID Nº 10	CCCCTACCCCACCGACGTTTAT
		SEC ID Nº 11	TTGATTGGCAGGTCCGTGGGTC
B	456	SEC ID Nº 10	CCCCTACCCCACCGACGTTTAT
		SEC ID Nº 12	CACAACGGCACAGAAACACGAA
C	424	SEC ID Nº 13	GCGCACCCACCGGAACAAAATG
		SEC ID Nº 14	TCCTCGCATTAAATGCTCCTGC
D	768	SEC ID Nº 15	CCTGGCACGCATTGACGCATGT
		SEC ID Nº 14	TCCTCGCATTAAATGCTCCTGC
E	1045	SEC ID Nº 6	TAGAGGACCTAACAGAACTCGCCGT
		SEC ID Nº 7	GAGCTGGCAACTCAAAATCCCTTT
Reacción	**Tamaño de amplicón (pb)**	**Par de cebadores**	**Secuencias cebadoras 5' a 3'**
F	482	SEC ID Nº 8	AAAATCTTCGTCAACATGGTGGAGC
		SEC ID Nº 9	TAATCTCAACTGGTCTCCTCTCCGG
Reacción	**Tamaño de amplicón (pb)**	**Par de cebadores**	**Secuencias cebadoras 5' a 3'**
G	366	SEC ID Nº 19	GGCTCGGACTCGACCTTTCTAT
		SEC ID Nº 20	GCAGTTCTTGAAGAATGAGTGA
H	912	SEC ID Nº 1	GTAGTACTATAGATTATATTATTCGTAGAG
		SEC ID Nº 2	GCCATACAGAACTCAAAATCTTTTCCGGAG
I	844	SEC ID Nº 2	GCCATACAGAACTCAAAATCTTTTCCGGAG
		SEC ID Nº 23	CTTCAAACAAGTGTGACAAA

Ejemplo 7. Secuencia flanqueante 3' al ADN transgénico insertado en el evento de maíz TC1507

Se usaron dos enfoques de PCR diferentes para prolongar la longitud de la información de secuencia 3' al inserto PHI8999A de longitud completa en el evento de maíz TC1507. En el primer enfoque se diseñaron pares de cebadores de PCR para amplificar un producto que abarcaba la unión entre el inserto de longitud completa y el terminador ORF25 invertido, véase la FIG. 1 para una representación del terminador ORF25 invertido. Un cebador directo estaba localizado al final del inserto PHI8999A de longitud completa y una serie de cebadores inversos estaba localizada a intervalos de 100 pb en la secuencia invertida. De este modo pudo determinarse la longitud del fragmento invertido presente en el evento de maíz TC1507 dentro de una región de 100 pb en base a las reacciones de PCR satisfactorias. Este método indicó que el fragmento invertido contenía la mayoría del terminador ORF25

pero no la secuencia Cry1F. Se aislaron y secuenciaron fragmentos de PCR de esta región.

En el segundo enfoque se diseñaron cebadores de PCR para un paseo en la secuencia de ADN flanqueante desde la región del terminador ORF25 invertido determinada en el experimento de PCR descrito anteriormente. Se aisló el ADN genómico de dos a tres plantas individuales del evento TC1507 y se digirió una línea de maíz de control no modificada con diversas enzimas de restricción y después se ligó a adaptadores específicos para la enzima de restricción usada para la digestión (Kit Universal Genome Walker™, Clontech Laboratories, Inc. y Devon et al. (1995) Nucleic Acids Res. 23:1644-1645). Se realizó una PCR primaria usando un cebador específico del terminador ORF25 y un cebador homólogo a la secuencia adaptadora ligada en el ADN digerido. Para aumentar la especificidad de la reacción se realizó una PCR secundaria anidada de nuevo con otro cebador específico del terminador ORF25 y un cebador secundario homólogo a la secuencia adaptadora siendo los cebadores secundarios internos a los respectivos cebadores usados en la PCR primaria. Los productos producidos por la PCR anidada se analizaron por electroforesis en gel de agarosa y se aislaron y secuenciaron fragmentos únicos para las muestras de ADN de TC1507. Los fragmentos se amplificaron tanto desde el terminador ORF25 contenido dentro del inserto de longitud completa como desde el terminado ORF25 diana (invertido) en el extremo 3' del inserto PHI8999A de longitud completa. Los fragmentos del inserto de longitud completa eran de un tamaño predicho basado en el conocimiento de los sitios para enzimas de restricción localizados en el inserto de longitud completa. Los fragmentos producidos desde el terminador ORF25 invertido 3' aparecieron como fragmentos de tamaño inesperado. El análisis de secuencia de los fragmentos amplificados desde el terminador ORF25 invertido 3' produjo una secuencia de ADN flanqueante de 1043 pb. La secuencia resultante de la serie anterior de experimentos de paseo genómico se usó para diseñar cebadores adicionales para un paseo adicional desde el inserto en el genoma de maíz fronterizo con una secuencia flanqueante 3' final, de 2346 pb.

Para describir la secuencia flanqueante 3' de TC1507, se hizo búsqueda de homología frente a las bases de datos públicas de GenBank usando la herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLAST). El programa BLAST realiza búsquedas de similitud de secuencia y es particularmente útil para identificar homólogos para una secuencia desconocida. Además de la búsqueda en las base de datos públicas, se realizaron alineaciones usando SeqMan 4.05™, algoritmos de alineación de Martinez y Needleman-Wunsch (DNASTAR Inc.) para buscar homología entre la secuencia flanqueante 3' de TC1507 y el inserto transgénico PHI8999A. Los resultados de estas búsquedas de homología se presentan en la Tabla 1. Los valores porcentuales de identidad indican el porcentaje de apareamientos idénticos a lo largo de la longitud de las secuencias analizadas. Los resultados de búsqueda de similitud para la secuencia flanqueante 3' indican alta homología con tres regiones de ADN de cloroplasto de maíz, un fragmento de 188 pb del gen *pat*, y 254 pb de ADN (región 15, Tabla 1) sin homología significativa. También se secuenciaron 749 pb adicionales (región 16) más allá de la región 15 (véase la Tabla 1). No hay resultados de búsqueda de similitud disponibles para la región 16.

El análisis de PCR sobre el ADN de control y genómico de TC1507 determinó que la secuencia de 254 pb (región 15, fragmento de cloroplasto de maíz "ORF241") está presente en el genoma de maíz. La secuencia de ADN de la región 15 en la región flanqueante 3' no es única para la región flanqueante 3' del evento de maíz TC1507 sino que también está presente en la línea de maíz de control no modificada. La secuencia flanqueante 3' de TC1507 se presenta en el Ejemplo 8 y se visualiza en la FIG. 1.

Ejemplo 8. Secuencia de la región 3' al extremo del ADN de inserto de longitud completa en el evento de maíz TC1507. Hay una descripción de cada región en la Tabla 1.

Región 10 (SEC ID Nº 38) fragmento del terminador ORF25 (complemento)

9016 CTCAC TCCGCTTGAT CTTGGCAAAG ATATTTGACG
9051 CATTTATTAG TATGTGTTAA TTTTCATTTG CAGTGCAGTA TTTTCTATTC
9101 GATCTTTATG TAATTCGTTA CAATTAATAA ATATTCAAAT CAGATTATTG
9151 ACTGTCATTT GTATCAAATC GTGTTTAATG GATATTTTTA TTATAATATT
9201 GATGATATCT CAATCAAAAC GTAGATAATA ATAATATTTA TTTAATATTT
9251 TTGCGTCGCA CAGTGAAAAT CTATATGAGA TTACAAAATA CCGACAACAT
9301 TATTTAAGAA ACATAGACAT TAACCCTGAG ACTGTTGGAC ATCAACGGGT
9351 AGATTCCTTC ATGCATAGCA CCTCATTCTT GGGGACAAAA GCACGGTTTG
9401 GCCGTTCCAT TGCTGCACGA ACGAGCTTTG CTATATCCTC GGGTTGGATC
9451 ATCTCATCAG GTCCAATCAA ATTTGTCCAA GAACTCATGT TAGTCGCAAC
9501 GAAACCGGGG CATATGTCGG GTATCTCGAG CTCGCGAAAG CTTGGCTGCA
9551 GGTCGACGGA TCCTT

Región 11 (SEC ID Nº 39) fragmento del gen de ARNr *rps12* de cloroplasto de maíz (complemento)

9566 CAACA AAAGGGTACC TGTACCCGAA ACCGACACAG
9601 GTGGGTAGGT AGAGAATACC TAGGGGCGCG AGACAACTCT CTCTAAGGAA
9651 CTCGGCAAAA TAGCCCCGTA ACTTCGGGAG AAGGGGTGCC CCC

Los nucleótidos 9694-9695 (CG) conectan la región 11 a la región 12.
Región 12 (SEC ID Nº 40) fragmento de genoma de cloroplasto de maíz

9696 CTAAC
9701 AATAAACGAA TACGGTTTAT GTATGGATTC CGGTAAAATA CCGGTACTCG
9751 ATTTCATAAG AGTCGAATAG GAAGTTAAGA TGAGGGTGGT ATCATCATAA
9801 AAATGGAGTA GTATCCTAAA TTATACTAAT CCACGTATGA TATGTATGCC
9851 TTTCCTTATC AACCGGAAGT AGTGCAAAAA AAATTCTATA CTGCACTGCT
9901 CTCTTTTTAC TGAGAAATGC AAAAAAATAA AAGTGAAGTA AGGGTGCCCC
9951 ATAGATATTT GATCTTGCCT CCTGTCCCCC CCCCCCTTTT TTCATCAAAA
10001 ATTTCCATGA AAAAAGAAAA GATGAATTTG TCCATTCATT GAACCCTAGT
10051 TCGGGACTGA CGGGGCTCGA ACCCGCAGCT TCCGCCT

Región 13 (SEC ID Nº 41) fragmento del gen *pat* (complemento)

10088 GTT CCTAGCCTTC
10101 CAGGGCCCAG CGTAAGCAAT ACCAGCCACA GCACCCTCAA CCTCAGCAAC
10151 CAACCAAGGG TATCTATCTT GCAACCTCTC TAGATCATCA ATCCACTCTT
10201 GTGGTGTTTG TGGCTCTGTC CTAAAGTTCA CTGTAGACGT CTCAATGTAA
10251 TGGTTAACGA TATCACAAAC CGCGG

Los nucleótidos 10276-10277 (AA) conectan la región 13 a la región 14.
Región 14 (SEC ID Nº 42) fragmento de ORF241 de cloroplasto de maíz (complemento)

10278 CAC AAGAACGAAA GCACCTTTTC
10301 ATTCTTTCAT ATACTAGGGG TTTTTACTTG GAAAAGACAA TGTTCCATAC
10351 TAAAGGAT

Región 15 (SEC ID Nº 43) genómica de maíz (sin homología significativa)

10359 AG CTGCAGAAGC CGCCACCGTC TTGAGGACCT TCCGGGGAGC
10401 CAGACCGGTC GAACCGTGCC TCCACTTGCT AAGGAGAAAG GGAAAATCAG
10451 GGCCAGGACA TACGAAGGAG GAGCCAGAAC GAAGATATCC TAAGATACTT
10501 ACTCGCTCCG GGCCATGATC AATCATGCCT GTGGGGAGGT CTCTCGCACC
10551 TCGATCCATG AAGGTACCAC CGAGGTCTGC CCCGCCGCCG GCTTCGGTAC
10601 CGTCCTCGCC TT

Región 16 (SEC ID Nº 44) genómica de maíz

10613 GGGCGCCC GAGGCACCCG GGGGATGGAC TGCCCAGGCG
10651 CAGCCACGAC GACCCAAGGA TCACCCTCCT GCGCAGTCGG CACGAGCAAT
10701 AGTTCTCGGG GAACAGGCAG CTTGGCCTGA CTCCCCGGGG TCACCTCAAC
10751 TACCTCGGCC GAGGGGTCAA GTACCCCCTC AGTCCGCCCC CGCTCTTCGG
10801 ACCGGGACCC CGACGTCCCG GCCCCGGATA CCGACGGCAC CAGCCCGCTC
10851 GGGGGCTGGC TTGACGACCC CTGGCCCAGC CTCAGATCTG GGCTGAGGCC
10901 GAGGCAGGCG GCCATGTCGT CGTCTTCATC ATCGTCTTCA TCATCGTCGT
10951 CGTCATCAGG CGTCTCCGGC GACGGCTCCC TTGGGAGCCC CTCCCTCTCC
11001 TGCCGACGAC GAAGCCTTTC CAAGGCATCC CGAGCCCACG TCCGCTCGTG
11051 GGCCCGAGCC TTCTTTGCGT CCTTCTTCTC CTTCCTCTTC TCCGCGGTGA
11101 CCCTCCGCGC AGCTCGGTCC ACCGCATCCT CCGGGACTGG TGGCAGGGAA
11151 GGCTTGTGAT GCCCTACCTC CTGGAGACAG ACGAAAAGTC TCAGCTATGA
11201 GAACCGAGGG CAATCTGACG CAAGAAGGAA GAAGGAGCGG ATACTCACCA
11251 GAGACACGCA CCCGCGATCG GGACGCATTA AGGGCTGGGA AAAAGTGCCG
11301 GCCTCTAATT TCGCTACCGT GCCGTCCACC CACCTGTGGA GGTCATCGAT
11351 GGGAAGGGGA A

Ejemplo 9. Confirmación de la presencia de la región 15 en la línea de maíz de control no modificada

Se usó análisis de PCR para determinar si la región no descrita de la secuencia al final de la secuencia flanqueante 3' (región 15 en la Tabla 1) está presente en la línea de maíz de control no modificada usada para la transformación para producir el evento de maíz TC1507 y por tanto representa una frontera con el ADN genómico de maíz. La amplificación por PCR satisfactoria de la región 15 tanto en la línea de maíz TC1507 como la línea de maíz de control Hi-II no modificada reveló que la región 15 estaba de hecho presente en el ADN genómico de maíz. Se realizaron cinco análisis de PCR diferentes sobre el ADN genómico preparado a partir de TC1507 y la línea de maíz de control Hi-II no modificada descrita en la Tabla 7 a continuación usando las secuencias cebadoras mostradas en la Tabla 8. Se diseñaron tres reacciones para amplificar el ADN dentro de la región 15 de la región flanqueante 3';

Reacción L - que produce un amplicón de 175 pb, Reacción M - que produce un amplicón de 134 pb, y Reacción N - que produce un amplicón de 107 pb. Los amplicones esperados estuvieron presentes tanto en la línea de maíz de control no modificada como en línea de maíz TC1507. Las Reacciones J y K se diseñaron como pares de cebadores específicos para TC1507 que abarcarían el extremo del inserto en la región flanqueante 3'. En la Reacción J, el cebador directo estaba localizado en el fragmento del gen *pat* en el extremo 3' del inserto PHI8999A de longitud completa (región 13 en la Tabla 1) y el cebador inverso estaba localizado en la región 15 no definida. En la Reacción K el cebador directo estaba localizado en el gen de la proteína hipotética de cloroplasto en el extremo 3' del inserto de longitud completa (región 14 en la Tabla 1) y el cebador inverso estaba localizado en la región 15 no definida. Tanto la Reacción J como la Reacción K produjeron un amplicón en la línea de maíz TC1507 y no produjeron un amplicón en la línea de maíz de control no modificada. Los resultados indican que ambas Reacciones J y K son específicas para el evento TC1507.

Los resultados de PCR indican que la secuencia no descrita (región 15) de la secuencia flanqueante 3' de TC1507 también está presente en el ADN genómico aislado de la línea de maíz de control Hi-II no modificada. Las secuencias de ADN amplificadas en las Reacciones L, M, y N no son únicas para la región flanqueante 3' de TC1507 sino que también están presentes en la línea de maíz de control no modificada.

Tabla 7. Reacciones de PCR para la secuencia 3' al inserto PHI8999A en el evento de maíz TC1507

Reacción	Tamaño del amplicón (pb)	Región en secuencia flanqueante 3' de TC1507	Amplicón presente en control	Amplicón presente en línea de maíz TC1507
J	342	Región 13 (fragmento del gen *pat*) a región 15	No	Sí
K	252	Región 14 (gen de cloroplasto) a región 15	No	Sí
L	175	Región 15	Sí	Sí
M	134	Región 15	Sí	Sí
N	107	Región 15	Sí	Sí

Tabla 8. Cebadores de PCR para la secuencia 3' al inserto PHI8999A en el evento de maíz TC1507

Reacción	Tamaño del amplicón (pb)	Par de cebadores	Secuencias cebadoras 5' a 3'
J	342	SEC ID Nº 3	TGTGGTGTTTGTGGCTCTGTCCT AA
		SEC ID Nº 5	GACCTCCCCACAGGCATGATTG ATC
K	252	SEC ID Nº 4	AGCACCTTTTCATTCTTTCATAT AC
		SEC ID Nº 5	GACCTCCCCACAGGCATGATTG ATC
L	175	SEC ID Nº 16	AAGCCGCCACCGTCTTGAGGAC CTT
		SEC ID Nº 5	GACCTCCCCACAGGCATGATTG ATC
M	134	SEC ID Nº 17	GTCGAACCGTGCCTCCACTTGC TAA
		SEC ID Nº 5	GACCTCCCCACAGGCATGATTG ATC
N	107	SEC ID Nº 18	AGAAAGGGAAAATCAGGGCCA GGAC
		SEC ID Nº 5	GACCTCCCCACAGGCATGATTG ATC

Ejemplo 10. Cebadores de PCR

Se usaron pares de cebadores específicos del evento de ADN para producir un amplicón diagnóstico para TC1507. Estos pares de cebadores del evento incluyen, aunque sin limitación, la SEC ID Nº 1 y SEC ID Nº 2; la SEC ID Nº 2 y SEC ID Nº 23; la SEC ID Nº 3 y SEC ID Nº 5; y la SEC ID Nº 4 y SEC ID Nº 5. Además de estos pares de cebadores, cualquier par de cebadores derivado de la SEC ID Nº 26 y SEC ID Nº 27 que cuando se usa en una reacción de amplificación de ADN produzca un amplicón de ADN diagnóstico para TC1507 es un aspecto de la presente invención. Las condiciones de amplificación para este análisis se ilustran en la Tabla 9, sin embargo, cualquier modificación de estos métodos que use los cebadores de ADN o complementos de los mismos para producir una molécula de ADN amplicón diagnóstica para TC1507 pertenece a las habilidades de la técnica. Las condiciones preferidas de amplificación para reacciones utilizando los cebadores de PCR identificados en las SEC ID Nº 1, 2, y 23 se ilustran en la Tabla 10. Además, se incluyen pares de cebadores de control, que incluyen las SEC ID Nº 10 y 11; las SEC ID Nº 10 y 12; las SEC ID Nº 13 y 14; las SEC ID Nº 14 y 15; las SEC ID Nº 5 y 16; las SEC ID Nº 5 y 17; y las SEC ID Nº 5 y 18; para la amplificación de un gen endógeno de maíz como patrones internos para las condiciones de reacción. También se incluyen pares de cebadores que producirán un amplicón en eventos transgénicos que contienen un gen *pat* (SEC ID Nº 6 y 7; SEC ID Nº 8 y 9), y un par de cebadores que producirá un amplicón en eventos transgénicos que contienen un gen cry1f (SEC ID Nº 19 y 20).

El análisis de extractos de ADN de tejido vegetal para ensayar la presencia del evento TC1507 debe incluir un control positivo de extracto de ADN tisular (una muestra de ADN que se sabe que contiene las secuencias transgénicas). Una amplificación satisfactoria del control positivo demuestra que la PCR se ejecutó en condiciones

que permiten la amplificación de secuencias diana. También debe incluirse un control negativo, o de tipo silvestre de extracto de ADN en que el ADN molde proporcionado es ADN genómico preparado a partir de una planta no transgénica, o es una planta transgénica no TC1507. Además un control negativo que no contenga extracto de ADN de maíz molde será un indicador útil de los reactivos y condiciones usados en el protocolo de PCR.

Pueden seleccionarse moléculas cebadoras de ADN adicionales de longitud suficiente a partir de la SEC ID Nº 26 y SEC ID Nº 27 por los especialistas en la técnica de métodos de amplificación de ADN, y optimizarse las condiciones para la producción de un amplicón que puede diferir de los métodos mostrados en la Tabla 9 o Tabla 10 pero producir un amplicón diagnóstico para el evento TC1507. El uso de estas secuencias cebadoras de ADN con modificaciones a los métodos mostrados en la Tabla 9 y Tabla 10 está dentro del alcance de la invención. El amplicón donde al menos una molécula cebadora de ADN de longitud suficiente derivada de la SEC ID Nº 26 y SEC ID Nº 27 que es diagnóstica para el evento TC1507 es un aspecto de la invención. El amplicón donde al menos un cebador de ADN de longitud suficiente derivado de cualquiera de los elementos genéticos de PHI8999A que es diagnóstico para el evento TC1507 es un aspecto de la invención. El ensayo para el amplicón TC1507 puede realizarse usando un Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700, o termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient, o por métodos y aparatos conocidos para los especialistas en la técnica.

Tabla 9. Condiciones de PCR:

Condiciones:	
Kit usado:	Kit Perkin-Elmer AmpliTAQ Gold
Volumen	Componente
5 μl	Molde (10 ng/μl)
4 μl	2 μl de cada cebador (10 μM)
2 μl	Tampón PCR Gold 10X
2 μl	$MgCl_2$ 25 mM
2 μl	dNTP 50X (10 mM)
0,1 μl	Polimerasa Amplitaq Gold
4,9 μl	H_2O
20 μl	Total
Parámetros de ciclado	
Sistema de PCR GeneAmp® 9700	
9 min 92ºC	
30 ciclos:	
94ºC 30 s	
60ºC 30 s	
72ºC 1 min	
7 min 72ºC	
Mantenimiento 4ºC	

Tabla 10. Condiciones de PCR usadas con la mezcla de polimerasa Advantage®-GC 2:

Condiciones:	
Kit usado:	Mezcla de polimerasa Advantage®-GC 2
Volumen	Componente
5 μl	Molde (10 ng/μl)
5 μl	2,5 μl cada cebador (10 μM)
10 μl	Tampón GC2 5x
10 μl	Fusión GC (1,0 M conc. final)
1,5 μl	dNTP 50X (10 mM)
1,0 μl	Polimerasa Advantage GC2
17,5 μl	H_2O
50 μl	Total
Parámetros de ciclado	
Sistema de PCR GeneAmp® 9700	
5 min 94ºC	
35 ciclos:	
94ºC 1 min	
60ºC 2 min	
72ºC 3 min	
7 min 72ºC	
Mantenimiento 4ºC	

Habiendo ilustrado y descrito los principios de la presente invención, debe ser evidente para los especialistas en la técnica que la invención puede modificarse en disposición y detalle sin alejarse de dichos principios. Reivindicamos

todas las modificaciones que están dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Lista de secuencias

<110> Dow AgroSciences LLC E. I. du Pont de Nemours and Company Pioneer Hi-Bred InteARNtional, Inc.

<120> Evento de maíz TC1507 y métodos para la detección del mismo

<130> 1523-PCT

<150> US 60/467.772
<151> 02-05-2003

<160> 57

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
<210> 1
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<210>
<213> Secuencia cebadora específica de evento diseñada para TC1507

<400> 1

gtagtactat agattatatt attcgtagag 30

<210> 2
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<210>
<213> Secuencia cebadora específica de evento diseñada para TC1507

<400> 2

gccatacaga actcaaaatc ttttccggag 30

<210> 3
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<210>
<213> Cebador específico de evento diseñado para TC1507.

<400> 3

tgtggtgttt gtggctctgt cctaa 25

<210> 4
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<210>
<213> Cebador específico de evento para TC1507.

<400> 4

agcacctttt cattctttca tatac 25

<210> 5 <211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<210>
<213> Secuencia cebadora de ADN genómico

<400> 5

gacctcccca caggcatgat tgatc 25

<210> 6
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<210>
<213> Cebador en inserción de longitud completa, promotor de 35S para gen pat

<400> 6

tagaggacct aacagaactc gccgt 25

<210> 7
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<210>
<213> Cebador en inserción de longitud completa, promotor de 35S para gen pat

<400> 7

gagctggcaa ctcaaaatcc cttt 24

<210> 8
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<210>
<213> Cebador en inserción de longitud completa, promotor de 35S para gen pat

<400> 8

aaaatcttcg tcaacatggt ggagc 25

<210> 9
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<210>
<213> Cebador en inserción de longitud completa, promotor de 35S para gen pat

<400> 9

taatctcaac tggtctcctc tccgg 25

<210> 10
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<210>
<213> Cebador - ADN genómico de *Zea mays*

<400> 10

cccctacccc accgacgttt at 22

<210> 11
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<210>
<213> Cebador - ADN genómico de *Zea mays*

<400> 11

ttgattggca ggtccgtggg tc 22

<210> 12
<211> 22

<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<210>
<213> Cebador - ADN genómico de *Zea mays*.

<400> 12

cacaacggca cagaaacacg aa 22

<210> 13
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<210>
<213> Cebador - ADN genómico de *Zea mays*.

<400> 13

gcgcacccac cggaacaaaa tg 22

<210> 14
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<210>
<213> Cebador - ADN genómico de *Zea mays*.

<400> 14

tcctcgcatt aaatgctcct gc 22

<210> 15
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<210>
<213> Cebador - ADN genómico de *Zea mays*.

<400> 15

cctggcacgc attgacgcat gt 22

<210> 16
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<210>
<213> Cebador - ADN genómico de *Zea mays*.

<400> 16

aagccgccac cgtcttgagg acctt 25

<210> 17
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<210>
<213> Cebador - ADN genómico de *Zea mays*.

<400> 17

gtcgaaccgt gcctccactt gctaa 25

<210> 18
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<210>
<213> Cebador - ADN genómico de *Zea mays*.

<400> 18

agaaagggaa aatcagggcc aggac 25

<210> 19
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<210>
<213> Cebador de secuencia Cry1F

<400> 19

ggctcggact cgacctttct at 22

<210> 20
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<210>
<213> Cebador de secuencia Cry1F

<400> 20

gcagttcttg aagaatgagt ga 22

<210> 21
<211> 2829
<212> ADN
<213> Secuencia flanqueante 5' de evento TC1507

<400> 21

actagtttcc tagcccgcgt cgtgccccta ccccaccgac gtttatggaa ggtgccattc 60
cacggttctt cgtggccgcc cctaaggatg taaatggtcg gtaaaatccg gtaaatttcc 120
ggtaccgttt accagatttt tccagccgtt ttcggattta tcgggatata cagaaaacga 180
gacggaaacg gaataggttt tttttcgaaa acggtacggt aaacggtgag acaaacttac 240
cgtccgtttt cgtatttctc gggaaactct ggtatattcc cgtatttgtc ccgtattttc 300
ccgacccacg gacctgccaa tcaaccatca gccagtcagc ccatccccac agctatggcc 360
catggggcca tgttggccac atgcccacgc aacgcaaggc agtaaggctg gcagcctggc 420
acgcattgac gcatgtggac acacacagcc gccgcctgtt cgtgtttctg tgccgttgtg 480
cgagactgtg actgcgagtg gcggagtcgg cgaacggcga ggcgtctccg gagtctggac 540
tgcggctgtg gacagcgacg ctgtgacggc gactcggcga agccccaagc taccaagccc 600
ccaagtcccc atccatctct gcttctctgg tcatctcctt cccctggtcg atctgcaggc 660
gccagaccgg ccgaagcatc acgaaacgca ctaagacctc gaaggagtca aaccactcct 720
ccgaggcctc gggggctaca cccggcgggt gcgctcgcgc gcacccaccg gaacaaaatg 780
taaccgagaa aggtcggtcc ccttgcaaaa aaagtgcgac aaaagcctcc aagcgagtat 840
taacactcac tttgaggctc gggggctact gtcggggacc ataattaggg gtaccccccaa 900
gactcctaat ctcagctggt aaccccccatc agcacaaagc tgcaaaggcc tgatgggtgc 960
gattaagtca aggctcggtc cactcaaggg acacgatctc gcctcgcccg agcccagcct 1020
cgggcaaggg cggccgaccc cgaggattca cgtctcgccc gagggccccc tcaagcgacg 1080
ggcacacctt cggctcgccc gaggcccatt cttcgccgag aagcaacctt ggccagatcg 1140
ccacaccgac cgaccgtatc gcaggagcat ttaatgcgag gatcgcctga caccttatcc 1200
tgacgcgcgc tcttcagtcg acagagccga agtgaccgca atcacttcgc cgctccactg 1260
accgacctga caagaagaca gcgccgcctg cgtcgctccg actgctgtgc cactcgacag 1320
agtgaggctg acagcagcca agtccggcct cgggcgccat aggaagctcc gcctcgcccg 1380
accctagggc tcggactcgg cctcggctcc ggaagacgac gaactacgct tcgcccgacc 1440
ccagggcttg gactcagcct cggctccgga agacgacgaa ttccgcctcg cccgacccca 1500
gggctcggac tcggcctcgg ctccagaaga cgacgaactc cgcctcgccc gaccccaggg 1560
ctcggactca gcctcggctc cggaagacga cgaactccgc ctcgcccgac cccagggctc 1620
ggactcagcc tcggcctcag acgatggtct ccgcctcgcc cgaccccggg ctcggactcg 1680
acctttctat cggaccttgt cagatcctgt cttcgtccga ggaggctttg gcaatcctca 1740
ctatgtactc ggtcttaggg gagtggcctt tcaacaaact ggtacgaatc acacccgcac 1800
attcaggaac tccgggacca ttgactctct agatgagata ccacctcaag acaacagcgg 1860
cgcaccttgg aatgactact cccatgtgct gaatcatgtt acctttgtgc gctggccagg 1920
tgagatctca ggttccgact catggagagc accaatgttc tcttggacgc atcgtagcgc 1980
taccccaca aacaccattg atccagagag aatcactcat tcttcaagaa ctgcatatct 2040
tgccgagatc ctcatcccta aaggtacttg acaatagtat tattggagtc gatacacaac 2100
tcacaaaaaa tacaagaagt cgactaggtg gattggtccg agtgaagaga aaaaaaagcc 2160
atacagaact caaaatcttt tccggagata ttcattttcc tgaagaggcg gataagatat 2220
taggtggcag tttgatacca ccagaaagag aaaaaaaaga ttctaaggaa tcaaaaaaaa 2280
ggaaaaattg ggtttatgtt caacggaaaa aatttctcaa aagcaaggaa aagtattgtg 2340
gctatttatc tatccgtgca gctgatatgg ccgcggtttg tgatatcgtt aaccattaca 2400
ttgagacgtc tacagtgaac tttaggacag agccacaaac accacaagag tggattgatg 2460
atctagagag gttgcaagat agataccctt ggttggttgc tgaggttgag ggtgttgtgg 2520
ctggtattgc ttacgctggg ccctggaagg ctaggaaccc tcaacctcag caaccaacca 2580
atggtatcta tcttgcaacc tctctagatc atcaatccac tcttgtggtg tttgtggctc 2640
tgtcctaaag ttcactgtag acgtctcaat gtaatggtta acgatatcac aaaccgagag 2700
aagagggatc tcgaagcttc ggccggggcc catcgatatc cgcgggcatg cctgcagtgc 2760
agcgtgaccc ggtcgtgccc ctctctagag ataatgagca ttgcatgtct aagttataaa 2820
aaattacca 2829

<210> 22
<211> 2346
<212> ADN
<213> Secuencia flanqueante 3' de evento TC1507

<400> 22

ctcactccgc ttgatcttgg caaagatatt tgacgcattt attagtatgt gttaattttc 60
atttgcagtg cagtattttc tattcgatct ttatgtaatt cgttacaatt aataaatatt 120
caaatcagat tattgactgt catttgtatc aaatcgtgtt taatggatat ttttattata 180
atattgatga tatctcaatc aaaacgtaga taataataat atttatttaa tatttttgcg 240
tcgcacagtg aaaatctata tgagattaca aaataccgac aacattattt aagaaacata 300
gacattaacc ctgagactgt tggacatcaa cgggtagatt ccttcatgca tagcacctca 360
ttcttgggga caaaagcacg gtttggccgt tccattgctg cacgaacgag ctttgctata 420
tcctcgggtt ggatcatctc atcaggtcca atcaaatttg tccaagaact catgttagtc 480
gcaacgaaac cggggcatat gtcgggtatc tcgagctcgc gaaagcttgg ctgcaggtcg 540
acggatcctt caacaaaagg gtacctgtac ccgaaaccga cacaggtggg taggtagaga 600
atacctaggg gcgcgagaca actctctcta aggaactcgg caaaatagcc ccgtaacttc 660
gggagaaggg gtgccccccg ctaacaataa acgaatacgg tttatgtatg gattccggta 720
aaataccggt actcgatttc ataagagtcg aataggaagt taagatgagg gtggtatcat 780
cataaaaatg gagtagtatc ctaaattata ctaatccacg tatgatatgt atgcctttcc 840
ttatcaaccg gaagtagtgc aaaaaaaatt ctatactgca ctgctctctt tttactgaga 900
aatgcaaaaa aataaaagtg aagtaagggt gccccataga tatttgatct tgcctcctgt 960
ccccccccc ctttttttcat caaaaatttc catgaaaaaa gaaaagatga atttgtccat 1020
tcattgaacc ctagttcggg actgacgggg ctcgaacccg cagcttccgc ctgttcctag 1080
ccttccaggg cccagcgtaa gcaataccag ccacagcacc ctcaacctca gcaaccaacc 1140
aagggtatct atcttgcaac ctctctagat catcaatcca ctcttgtggt gtttgtggct 1200
ctgtcctaaa gttcactgta gacgtctcaa tgtaatggtt aacgatatca caaaccgcgg 1260
aacacaagaa cgaaagcacc ttttcattct ttcatatact aggggttttt acttggaaaa 1320
gacaatgttc catactaaag gatagctgca gaagccgcca ccgtcttgag gaccttccgg 1380
ggagccagac cggtcgaacc gtgcctccac ttgctaagga gaaagggaaa atcagggcca 1440
ggacatacga aggaggagcc agaacgaaga tatcctaaga tacttactcg ctccgggcca 1500
tgatcaatca tgcctgtggg gaggtctctc gcacctcgat ccatgaaggt accaccgagg 1560
tctgccccgc cgccggcttc ggtaccgtcc tcgccttggg cgcccgaggc acccgggggа 1620
tggactgccc aggcgcagcc acgacgaccc aaggatcacc ctcctgcgca gtcggcacga 1680
gcaatagttc tcggggaaca ggcagcttgg cctgactccc cggggtcacc tcaactacct 1740
cggccgaggg gtcaagtacc ccctcagtcc gccccgctc ttcggaccgg gaccccgacg 1800
tcccggcccc ggataccgac ggcaccagcc cgctcggggg ctggcttgac gacccctggc 1860
ccagcctcag atctgggctg aggccgaggc aggcggccat gtcgtcgtct tcatcatcgt 1920
cttcatcatc gtcgtcgtca tcaggcgtct ccggcgacgg ctcccttggg agccccтccc 1980
tctcctgccg acgacgaagc ctttccaagg catcccgagc ccacgtccgc tcgtgggccc 2040
gagccttctt tgcgtccttc ttctccttcc tcttctccgc ggtgaccctc cgcgcagctc 2100
ggtccaccgc atcctccggg actggtggca gggaaggctt gtgatgccct acctcctgga 2160
gacagacgaa aagtctcagc tatgagaacc gagggcaatc tgacgcaaga aggaagaagg 2220
agcggatact caccagagac acgcacccgc gatcgggacg cattaagggc tgggaaaaag 2280
tgccggcctc taatttcgct accgtgccgt ccacccacct gtggaggtca tcgatgggaa 2340
ggggaa 2346

<210> 23
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<210>
<213> Secuencia cebadora específica de evento diseñada para TC1507

<400> 23

cttcaaacaa gtgtgacaaa 20

<210> 24
<211> 11361
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<210>
<213> La secuencia representa la inserción transgénica en la línea de maíz TC1507 así como la secuencia flanqueante a los sitios de inserción.

<400> 24

actagtttcc tagcccgcgt cgtgccccta ccccaccgac gtttatggaa ggtgccattc 60
cacggttctt cgtggccgcc cctaaggatg taaatggtcg gtaaaatccg gtaaatttcc 120
ggtaccgttt accagatttt tccagccgtt ttcggattta tcgggatata cagaaaacga 180
gacggaaacg gaataggttt tttttcgaaa acggtacggt aaacggtgag acaaacttac 240
cgtccgtttt cgtatttctc gggaaactct ggtatattcc cgtatttgtc ccgtattttc 300
ccgacccacg gacctgccaa tcaaccatca gccagtcagc ccatccccac agctatggcc 360
catggggcca tgttggccac atgcccacgc aacgcaaggc agtaaggctg gcagcctggc 420
acgcattgac gcatgtggac acacacagcc gccgcctgtt cgtgtttctg tgccgttgtg 480
cgagactgtg actgcgagtg gcggagtcgg cgaacggcga ggcgtctccg gagtctggac 540
tgcggctgtg gacagcgacg ctgtgacggc gactcggcga agccccaagc taccaagccc 600
ccaagtcccc atccatctct gctttctctgg tcatctcctt cccctggtcg atctgcaggc 660
gccagaccgg ccgaagcatc acgaaacgca ctaagacctc gaaggagtca aaccactcct 720
ccgaggcctc gggggctaca cccggcgggt gcgctcgcgc gcacccaccg gaacaaaatg 780
taaccgagaa aggtcggtcc cttgcaaaa aaagtgcgac aaaagcctcc aagcgagtat 840
taacactcac tttgaggctc gggggctact gtcggggacc ataattaggg gtacccccaa 900
gactcctaat ctcagctggt aacccccatc agcacaaagc tgcaaaggcc tgatgggtgc 960
gattaagtca aggctcggtc cactcaaggg acacgatctc gcctcgcccg agcccagcct 1020
cgggcaaggg cggccgaccc cgaggattca cgtctcgccc gagggccccc tcaagcgacg 1080
ggcacacctt cggctcgccc gaggcccatt cttcgccgag aagcaacctt ggccagatcg 1140
ccacaccgac cgaccgtatc gcaggagcat ttaatgcgag gatcgcctga caccttatcc 1200
tgacgcgcgc tcttcagtcg acagagccga agtgaccgca atcacttcgc cgctccactg 1260
accgacctga caagaagaca gcgccgcctg cgtcgctccg actgctgtgc cactcgacag 1320
agtgaggctg acagcagcca agtccggcct cgggcgccat aggaagctcc gcctcgcccg 1380
accctagggc tcggactcgg cctcggctcc ggaagacgac gaactacgct tcgcccgacc 1440
ccagggcttg gactcagcct cggctccgga agacgacgaa ttccgcctcg cccgacccca 1500
gggctcggac tcggcctcgg ctccagaaga cgacgaactc cgcctcgccc gaccccaggg 1560
ctcggactca gcctcggctc cggaagacga cgaactccgc ctcgcccgac cccagggctc 1620
ggactcagcc tcggcctcag acgatggtct ccgcctcgcc cgacccgggg ctcggactcg 1680
acctttctat cggaccttgt cagatcctgt cttcgtccga ggaggctttg gcaatcctca 1740
ctatgtactc ggtcttaggg gagtggcctt tcaacaaact ggtacgaatc acacccgcac 1800
attcaggaac tccgggacca ttgactctct agatgagata ccacctcaag acaacagcgg 1860
cgcaccttgg aatgactact cccatgtgct gaatcatgtt acctttgtgc gctggccagg 1920
tgagatctca ggttccgact catggagagc accaatgttc tcttggacgc atcgtagcgc 1980
taccccaca aacaccattg atccagagag aatcactcat tcttcaagaa ctgcatatct 2040
tgccgagatc ctcatcccta aaggtacttg acaatagtat tattggagtc gatacacaac 2100
tcacaaaaaa tacaagaagt cgactaggtg gattggtccg agtgaagaga aaaaaaagcc 2160
atacagaact caaaatcttt tccggagata ttcattttcc tgaagaggcg gataagatat 2220
taggtggcag tttgatacca ccagaaagag aaaaaaaaga ttctaaggaa tcaaaaaaaa 2280
ggaaaaattg ggtttatgtt caacggaaaa aatttctcaa aagcaaggaa aagtattgtg 2340
gctatttatc tatccgtgca gctgatatgg ccgcggtttg tgatatcgtt aaccattaca 2400
ttgagacgtc tacagtgaac tttaggacag agccacaaac accacaagag tggattgatg 2460
atctagagag gttgcaagat agataccctt ggttggttgc tgaggttgag ggtgttgtgg 2520
ctggtattgc ttacgctggg ccctggaagg ctaggaaccc tcaacctcag caaccaacca 2580
atggtatcta tcttgcaacc tctctagatc atcaatccac tcttgtggtg tttgtggctc 2640
tgtcctaaag ttcactgtag acgtctcaat gtaatggtta acgatatcac aaaccgagag 2700
aagagggatc tcgaagcttc ggccggggcc catcgatatc cgcgggcatg cctgcagtgc 2760
agcgtgaccc ggtcgtgccc ctctctagag ataatgagca ttgcatgtct aagttataaa 2820
aaattaccac aactggaaga gcggttaccc ggaccgaagc ttcggccggg gcccatcgat 2880
atccgcgggc atgcctgcag tgcagcgtga cccggtcgtg cccctctcta gagataatga 2940
gcattgcatg tctaagttat aaaaaattac cacatatttt ttttgtcaca cttgtttgaa 3000
gtgcagttta tctatcttta tacatatatt taaactttac tctacgaata atataatcta 3060
tagtactaca ataatatcag tgttttagag aatcatataa atgaacagtt agacatggtc 3120
taaaggacaa ttgagtattt tgacaacagg actctacagt tttatctttt tagtgtgcat 3180
gtgttctcct tttttttgc aaatagcttc acctatataa tacttcatcc attttattag 3240
tacatccatt tagggtttag ggttaatggt ttttatagac taatttttt agtacatcta 3300
ttttattcta ttttagcctc taaattaaga aaactaaaac tctatttag ttttttatt 3360
taataattta gatataaaat agaataaaat aaagtgacta aaaattaaac aaatacccct 3420

taagaaatta aaaaaactaa ggaaacattt ttcttgtttc gagtagataa tgccagcctg 3480
ttaaacgccg tcgacgagtc taacggacac caaccagcga accagcagcg tcgcgtcggg 3540
ccaagcgaag cagacggcac ggcatctctg tcgctgcctc tggacccctc tcgagagttc 3600
cgctccaccg ttggacttgc tccgctgtcg gcatccagaa attgcgtggc ggagcggcag 3660
acgtgagccg gcacggcagg cggcctcctc ctcctctcac ggcacggcag ctacgggggа 3720
ttcctttccc accgctcctt cgctttcoct tcctcgcccg ccgtaataaa tagacacccc 3780
ctccacaccc tctttccccа acctcgtgtt gttcggagcg cacacacaca caaccagatc 3840
tcccccaaat ccacccgtcg gcacctccgc ttcaaggtac gccgctcgtc ctcccccccc 3900
ccccctctct accttctcta gatcggcgtt ccggtccatg gttagggccc ggtagttcta 3960
cttctgttca tgtttgtgtt agatccgtgt ttgtgttaga tccgtgctgc tagcgttcgt 4020
acacggatgc gacctgtacg tcagacacgt tctgattgct aacttgccag tgtttctctt 4080
tggggaatcc tgggatggct ctagccgttc cgcagacggg atcgatttca tgatttttt 4140
tgtttcgttg catagggttt ggtttgccct tttcctttat ttcaatatat gccgtgcact 4200
tgtttgtcgg gtcatctttt catgcttttt tttgtcttgg ttgtgatgat gtggtctggt 4260
tgggcggtcg ttctagatcg gagtagaatt ctgtttcaaa ctacctggtg gatttattaa 4320
ttttggatct gtatgtgtgt gccatacata ttcatagtta cgaattgaag atgatggatg 4380
gaaatatcga tctaggatag gtatacatgt tgatgcgggt tttactgatg catatacaga 4440
gatgcttttt gttcgcttgg ttgtgatgat gtggtgtggt tgggcggtcg ttcattcgtt 4500
ctagatcgga gtagaatact gtttcaaact acctggtgta tttattaatt ttggaactgt 4560
atgtgtgtgt catacatctt catagttacg agtttaagat ggatggaaat atcgatctag 4620
gataggtata catgttgatg tgggttttac tgatgcatat acatgatggc atatgcagca 4680
tctattcata tgctctaacc ttgagtacct atctattata ataaacaagt atgttttata 4740
attattttga tcttgatata cttggatgat ggcatatgca gcagctatat gtggattttt 4800
ttagccctgc cttcatacgc tatttatttg cttggtactg tttcttttgt cgatgctcac 4860
cctgttgttt ggtgttactt ctgcaggtcg actctagagg atccaacaat ggagaacaac 4920
atacagaatc agtgcgtccc ctacaactgc ctcaacaatc ctgaagtaga gattctcaac 4980
gaagagaggt cgactggcag attgccgtta gacatctccc tgtcccttac acgtttcctg 5040
ttgtctgagt ttgttccagg tgtgggagtt gcgtttggcc tcttcgacct catctggggc 5100
ttcatcactc catctgattg gagcctcttt cttctccaga ttgaacagtt gattgaacaa 5160
aggattgaga ccttggaaag gaatcgggcc atcactaccc ttcgtggctt agcagacagc 5220
tatgagatct acattgaagc actaagagag tgggaagcca atcctaacaa tgcccaactg 5280
agagaagatg tgcgtatacg ctttgctaac acagatgatg ctttgatcac agccatcaac 5340
aacttcaccc ttaccagctt cgagatccct cttctctcgg tctatgttca agctgctaac 5400
ctgcacttgt cactactgcg cgacgctgtg tcgtttgggc aaggttgggg actggacata 5460
gctactgtca acaatcacta caacagactc atcaatctga ttcatcgata cacgaaacat 5520
tgtttggata cctacaatca gggattggag aacctgagag gtactaacac tcgccaatgg 5580
gccaggttca atcagttcag gagagacctt acacttactg tgttagacat agttgctctc 5640
tttccgaact acgatgttcg tacctatccg attcaaacgt catcccaact tacaagggag 5700
atctacacca gttcagtcat tgaagactct ccagtttctg cgaacatacc caatggtttc 5760
aacagggctg agtttggagt cagaccaccc catctcatgg acttcatgaa ctctttgttt 5820
gtgactgcag agactgttag atcccaaact gtgtggggag gacacttagt tagctcacgc 5880
aacacggctg gcaatcgtat caactttcct agttacgggg tcttcaatcc cgggggcgcc 5940
atctggattg cagatgaaga tccacgtcct ttctatcgga ccttgtcaga tcctgtcttc 6000
gtccgaggag gctttggcaa tcctcactat gtactcggtc ttaggggagt ggcctttcaa 6060
caaactggta cgaatcacac ccgcacattc aggaactccg ggaccattga ctctctagat 6120
gagataccac ctcaagacaa cagcggcgca ccttggaatg actactccca tgtgctgaat 6180
catgttacct ttgtgcgctg gccaggtgag atctcaggtt ccgactcatg gagagcacca 6240
atgttctctt ggacgcatcg tagcgctacc cccacaaaca ccattgatcc agagagaatc 6300
actcagattc ccttggtgaa ggcacacaca cttcagtcag gaactacagt tgtaagaggg 6360
ccggggttca cgggaggaga cattcttcga cgcactagtg gaggaccatt cgcgtacacc 6420
attgtcaaca tcaatgggca acttccccaa aggtatcgtg ccaggatacg ctatgcctct 6480
actaccaatc taagaatcta cgttacggtt gcaggtgaac ggatctttgc tggtcagttc 6540
aacaagacaa tggataccgg tgatccactt acattccaat ctttctccta cgccactatc 6600
aacaccgcgt tcacctttcc aatgagccag agcagtttca cagtaggtgc tgataccttc 6660
agttcaggca acgaagtgta cattgacagg tttgagttga ttccagttac tgccacactc 6720
gagtaaggat ccgtcgacct gcagccaagc tttcgcgagc tcgagatccc cgacatatgc 6780
cccggtttcg ttgcgactaa catgagttct tggacaaatt tgattggacc tgatgagatg 6840
atccaacccg aggatatagc aaagctcgtt cgtgcagcaa tggaacggcc aaaccgtgct 6900
tttgtcccca agaatgaggt gctatgcatg aaggaatcta cccgttgatg tccaacagtc 6960
tcagggttaa tgtctatgta tcttaaataa tgttgtcggt attttgtaat ctcatataga 7020
ttttcactgt gcgacgcaaa aatattaaat aaatattatt attatctacg ttttgattga 7080

gatatcatca atattataat aaaaatatcc attaaacacg atttgataca aatgacagtc 7140
aataatctga tttgaatatt tattaattgt aacgaattac ataaagatcg aatagaaaat 7200
actgcactgc aaatgaaaat taacacatac taataaatgc gtcaaatatc tttgccaaga 7260
tcaagcggag tgagggcctc atatccggtc tcagttacaa gcacggtatc cccgaagcgc 7320
gctccaccaa tgccctcgac atagatgccg ggctcgacgc tgaggacatt gcctaccttg 7380
agcatggtct cagcgccggc tttaagctca atcccatccc aatctgaata tcctatcccg 7440
cgcccagtcc ggtgtaagaa cgggtctgtc catccacctc tgttgggaat tccggtccgg 7500
gtcacctttg tccaccaaga tggaactgcg gccgcggacc gaattcccat ggagtcaaag 7560
attcaaatag aggacctaac agaactcgcc gtaaagactg gcgaacagtt catacagagt 7620
ctcttacgac tcaatgacaa gaagaaaatc ttcgtcaaca tggtggagca cgacacgctt 7680
gtctactcca aaaatatcaa agatacagtc tcagaagacc aaagggcaat tgagactttt 7740
caacaaaggg taatatccgg aaacctcctc ggattccatt gcccagctat ctgtcacttt 7800
attgtgaaga tagtggaaaa ggaaggtggc tcctacaaat gccatcattg cgataaagga 7860
aaggccatcg ttgaagatgc ctctgccgac agtggtccca aagatggacc cccacccacg 7920
aggagcatcg tggaaaaaga agacgttcca accacgtctt caaagcaagt ggattgatgt 7980
gatatctcca ctgacgtaag ggatgacgca caatcccact atccttcgca gacccttcc 8040
tctatataag gaagttcatt tcatttggag aggacagggt acccggggat ccaccatgtc 8100
tccggagagg agaccagttg agattaggcc agctacagca gctgatatgg ccgcggtttg 8160
tgatatcgtt aaccattaca ttgagacgtc tacagtgaac tttaggacag agccacaaac 8220
accacaagag tggattgatg atctagagag gttgcaagat agataccctt ggttggttgc 8280
tgaggttgag ggtgttgtgg ctggtattgc ttacgctggg ccctggaagg ctaggaacgc 8340
ttacgattgg acagttgaga gtactgttta cgtgtcacat aggcatcaaa ggttgggcct 8400
aggatccaca ttgtacacac atttgcttaa gtctatggag gcgcaaggtt ttaagtctgt 8460
ggttgctgtt ataggccttc caaacgatcc atctgttagg ttgcatgagg ctttgggata 8520
cacagcccgg ggtacattgc gcgcagctgg atacaagcat ggtggatggc atgatgttgg 8580
tttttggcaa agggattttg agttgccagc tcctccaagg ccagttaggc cagttaccca 8640
gatctgagtc gacctgcagg catgcccgct gaaatcacca gtctctctct acaaatctat 8700
ctctctctat aataatgtgt gagtagttcc cagataaggg aattagggtt cttatagggt 8760
ttcgctcatg tgttgagcat ataagaaacc cttagtatgt atttgtattt gtaaaatact 8820
tctatcaata aaatttctaa ttcctaaaac caaaatccag tggcgagctc gaattcgagc 8880
tcgagcccgg gtggatcctc tagagtcgac ctgcagaagc ttcggtccgg cgcgcctcta 8940
gttgaagaca cgttcatgtc ttcatcgtaa gaagacactc agtagtcttc ggccagaatg 9000
gcctaactca aggccctcac tccgcttgat cttggcaaag atatttgacg catttattag 9060
tatgtgttaa ttttcatttg cagtgcagta ttttctattc gatctttatg taattcgtta 9120
caattaataa atattcaaat cagattattg actgtcattt gtatcaaatc gtgtttaatg 9180
gatattttta ttataatatt gatgatatct caatcaaaac gtagataata ataatattta 9240
tttaatattt ttgcgtcgca cagtgaaaat ctatatgaga ttacaaaata ccgacaacat 9300
tatttaagaa acatagacat taaccctgag actgttggac atcaacgggt agattccttc 9360
atgcatagca cctcattctt ggggacaaaa gcacggtttg gccgttccat tgctgcacga 9420
acgagctttg ctatatcctc gggttggatc atctcatcag gtccaatcaa atttgtccaa 9480
gaactcatgt tagtcgcaac gaaaccgggg catatgtcgg gtatctcgag ctcgcgaaag 9540
cttggctgca ggtcgacgga tccttcaaca aaagggtacc tgtacccgaa accgacacag 9600
gtgggtaggt agagaatacc taggggcgcg agacaactct ctctaaggaa ctcggcaaaa 9660
tagccccgta acttcgggag aaggggtgcc ccccgctaac aataaacgaa tacggtttat 9720
gtatggattc cggtaaaata ccggtactcg atttcataag agtcgaatag gaagttaaga 9780
tgagggtggt atcatcataa aaatggagta gtatcctaaa ttatactaat ccacgtatga 9840
tatgtatgcc tttccttatc aaccggaagt agtgcaaaaa aaattctata ctgcactgct 9900
ctctttttac tgagaaatgc aaaaaaataa aagtgaagta agggtgcccc atagatattt 9960
gatcttgcct cctgtccccc ccccccttttt ttcatcaaaa atttccatga aaaaagaaaa 10020
gatgaatttg tccattcatt gaaccctagt tcgggactga cggggctcga acccgcagct 10080
tccgcctgtt cctagccttc cagggcccag cgtaagcaat accagccaca gcaccctcaa 10140
cctcagcaac caaccaaggg tatctatctt gcaacctctc tagatcatca atccactctt 10200
gtggtgtttg tggctctgtc ctaaagttca ctgtagacgt ctcaatgtaa tggttaacga 10260
tatcacaaac cgcggaacac aagaacgaaa gcacctttтc attctttcat atactagggg 10320
tttttacttg gaaaagacaa tgttccatac taaaggatag ctgcagaagc cgccaccgtc 10380
ttgaggacct tccggggagc cagaccggtc gaaccgtgcc tccacttgct aaggagaaag 10440
ggaaaatcag ggccaggaca tacgaaggag gagccagaac gaagatatcc taagatactt 10500
actcgctccg ggccatgatc aatcatgcct gtggggaggt ctctcgcacc tcgatccatg 10560
aaggtaccac cgaggtctgc cccgccgccg gcttcggtac cgtcctcgcc ttgggcgccc 10620
gaggcacccg ggggatggac tgcccaggcg cagccacgac gacccaagga tcaccctcct 10680
gcgcagtcgg cacgagcaat agttctcggg gaacaggcag cttggcctga ctccccgggg 10740

```
tcacctcaac tacctcggcc gaggggtcaa gtacccccctc agtccgcccc cgctcttcgg 10800
accgggaccc cgacgtcccg gccccggata ccgacggcac cagcccgctc gggggctggc 10860
ttgacgaccc ctggcccagc ctcagatctg ggctgaggcc gaggcaggcg gccatgtcgt 10920
cgtcttcatc atcgtcttca tcatcgtcgt cgtcatcagg cgtctccggc gacggctccc 10980
ttgggagccc ctccctctcc tgccgacgac gaagcctttc caaggcatcc cgagcccacg 11040
tccgctcgtg ggcccgagcc ttctttgcgt ccttcttctc cttcctcttc tccgcggtga 11100
ccctccgcgc agctcggtcc accgcatcct ccgggactgg tggcagggaa ggcttgtgat 11160
gccctacctc ctggagacag acgaaaagtc tcagctatga gaaccgaggg caatctgacg 11220
caagaaggaa gaaggagcgg atactcacca gagacacgca cccgcgatcg ggacgcatta 11280
agggctggga aaaagtgccg gcctctaatt tcgctaccgt gccgtccacc cacctgtgga 11340
ggtcatcgat gggaagggga a                                          11361
```

<210> 25
<211> 6186
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<210>
<213> La secuencia representa la molécula de ADN usada para transformar la línea de maíz TC1507. Esta secuencia representa la inserción PHI8999A.

<400> 25

```
caactggaag agcggttacc cggaccgaag cttcggccgg ggcccatcga tatccgcggg 60
catgcctgca gtgcagcgtg acccggtcgt gcccctctct agagataatg agcattgcat 120
gtctaagtta taaaaaatta ccacatattt tttttgtcac acttgtttga agtgcagttt 180
atctatcttt atacatatat ttaaacttta ctctacgaat aatataatct atagtactac 240
aataatatca gtgttttaga gaatcatata aatgaacagt tagacatggt ctaaaggaca 300
attgagtatt ttgacaacag gactctacag ttttatcttt ttagtgtgca tgtgtttctcc 360
ttttttttg caaatagctt cacctatata atacttcatc cattttatta gtacatccat 420
ttagggttta gggttaatgg tttttataga ctaatttttt tagtacatct attttattct 480
attttagcct ctaaattaag aaaactaaaa ctctatttta gttttttttat ttaataattt 540
agatataaaa tagaataaaa taaagtgact aaaaattaaa caaataccct ttaagaaatt 600
aaaaaaacta aggaaacatt tttcttgttt cgagtagata atgccagcct gttaaacgcc 660
gtcgacgagt ctaacggaca ccaaccagcg aaccagcagc gtcgcgtcgg gccaagcgaa 720
gcagacggca cggcatctct gtcgctgcct ctggacccct ctcgagagtt ccgctccacc 780
gttggacttg ctccgctgtc ggcatccaga aattgcgtgg cggagcggca gacgtgagcc 840
ggcacggcag gcggcctcct cctcctctca cggcacggca gctacggggg attcctttcc 900
caccgctcct tcgctttccc ttcctcgccc gccgtaataa atagacaccc cctccacacc 960
ctctttcccc aacctcgtgt tgttcggagc gcacacacac acaaccagat ctccccccaaa 1020
tccacccgtc ggcacctccg cttcaaggta cgccgctcgt cctcccccccc ccccccctctc 1080
taccttctct agatcggcgt tccggtccat ggttagggcc cggtagttct acttctgttc 1140
atgtttgtgt tagatccgtg tttgtgttag atccgtgctg ctagcgttcg tacacggatg 1200
cgacctgtac gtcagacacg ttctgattgc taacttgcca gtgtttctct ttggggaatc 1260
ctgggatggc tctagccgtt ccgcagacgg gatcgatttc atgatttttt ttgtttcgtt 1320
gcatagggtt tggtttgccc ttttccttta tttcaatata tgccgtgcac ttgtttgtcg 1380
ggtcatcttt tcatgctttt ttttgtcttg gttgtgatga tgtggtctgg ttgggcggtc 1440
gttctagatc ggagtagaat tctgtttcaa actacctggt ggatttatta attttggatc 1500
tgtatgtgtg tgccatacat attcatagtt acgaattgaa gatgatggat ggaaatatcg 1560
atctaggata ggtatacatg ttgatgcggg ttttactgat gcatatacag agatgctttt 1620
tgttcgcttg gttgtgatga tgtggtgtgg ttgggcggtc gttcattcgt tctagatcgg 1680
agtagaatac tgtttcaaac tacctggtgt atttattaat tttggaactg tatgtgtgtg 1740
tcatacatct tcatagttac gagtttaaga tggatggaaa tatcgatcta ggataggtat 1800
acatgttgat gtgggtttta ctgatgcata tacatgatgg catatgcagc atctattcat 1860
atgctctaac cttgagtacc tatctattat aataaacaag tatgttttat aattatttttg 1920
atcttgatat acttggatga tggcatatgc agcagctata tgtggatttt tttagccctg 1980
ccttcatacg ctatttattt gcttggtact gtttcttttg tcgatgctca ccctgttgtt 2040
tggtgttact tctgcaggtc gactctagag gatccaacaa tggagaacaa catacagaat 2100
cagtgcgtcc cctacaactg cctcaacaat cctgaagtag agattctcaa cgaagagagg 2160
tcgactggca gattgccgtt agacatctcc ctgtccctta cacgtttcct gttgtctgag 2220
tttgttccag gtgtgggagt tgcgtttggc ctcttcgacc tcatctgggg cttcatcact 2280
```

ccatctgatt ggagcctctt tcttctccag attgaacagt tgattgaaca aaggattgag 2340
accttggaaa ggaatcgggc catcactacc cttcgtggct tagcagacag ctatgagatc 2400
tacattgaag cactaagaga gtgggaagcc aatcctaaca atgcccaact gagagaagat 2460
gtgcgtatac gctttgctaa cacagatgat gctttgatca cagccatcaa caacttcacc 2520
cttaccagct tcgagatccc tcttctctcg gtctatgttc aagctgctaa cctgcacttg 2580
tcactactgc gcgacgctgt gtcgtttggg caaggttggg gactggacat agctactgtc 2640
aacaatcact acaacagact catcaatctg attcatcgat acacgaaaca ttgtttggat 2700
acctacaatc agggattgga gaacctgaga ggtactaaca ctcgccaatg ggccaggttc 2760
aatcagttca ggagagacct tacacttact gtgttagaca tagttgctct ctttccgaac 2820
tacgatgttc gtacctatcc gattcaaacg tcatcccaac ttacaaggga gatctacacc 2880
agttcagtca ttgaagactc tccagtttct gcgaacatac ccaatggttt caacagggct 2940
gagtttggag tcagaccacc ccatctcatg gacttcatga actctttgtt tgtgactgca 3000
gagactgtta gatcccaaac tgtgtgggga ggacacttag ttagctcacg caacacggct 3060
ggcaatcgta tcaactttcc tagttacggg gtcttcaatc ccgggggcgc catctggatt 3120
gcagatgaag atccacgtcc tttctatcgg accttgtcag atcctgtctt cgtccgagga 3180
ggctttggca atcctcacta tgtactcggt cttaggggag tggcctttca acaaactggt 3240
acgaatcaca cccgcacatt caggaactcc gggaccattg actctctaga tgagatacca 3300
cctcaagaca acagcggcgc accttggaat gactactccc atgtgctgaa tcatgttacc 3360
tttgtgcgct ggccaggtga gatctcaggt tccgactcat ggagagcacc aatgttctct 3420
tggacgcatc gtagcgctac ccccacaaac accattgatc cagagagaat cactcagatt 3480
cccttggtga aggcacacac acttcagtca ggaactacag ttgtaagagg gccggggttc 3540
acgggaggag acattcttcg acgcactagt ggaggaccat tcgcgtacac cattgtcaac 3600
atcaatgggc aacttcccca aaggtatcgt gccaggatac gctatgcctc tactaccaat 3660
ctaagaatct acgttacggt tgcaggtgaa cggatctttg ctggtcagtt caacaagaca 3720
atggataccg gtgatccact tacattccaa tctttctcct acgccactat caacaccgcg 3780
ttcacctttc caatgagcca gagcagtttc acagtaggtg ctgatacctt cagttcaggc 3840
aacgaagtgt acattgacag gtttgagttg attccagtta ctgccacact cgagtaagga 3900
tccgtcgacc tgcagccaag cttttcgcga gctcgagatc cccgacatat gccccggttt 3960
cgttgcgact aacatgagtt cttggacaaa tttgattgga cctgatgaga tgatccaacc 4020
cgaggatata gcaaagctcg ttcgtgcagc aatggaacgg ccaaaccgtg cttttgtccc 4080
caagaatgag gtgctatgca tgaaggaatc tacccgttga tgtccaacag tctcagggtt 4140
aatgtctatg tatcttaaat aatgttgtcg gtattttgta atctcatata gattttcact 4200
gtgcgacgca aaaatattaa ataaatatta ttattatcta cgttttgatt gagatatcat 4260
caatattata ataaaaatat ccattaaaca cgatttgata caaatgacag tcaataatct 4320
gatttgaata tttattaatt gtaacgaatt acataaagat cgaatagaaa atactgcact 4380
gcaaatgaaa attaacacat actaataaat gcgtcaaata tctttgccaa gatcaagcgg 4440
agtgagggcc tcatatccgg tctcagttac aagcacggta tccccgaagc gcgctccacc 4500
aatgccctcg acatagatgc cgggctcgac gctgaggaca ttgcctacct tgagcatggt 4560
ctcagcgccg gctttaagct caatcccatc ccaatctgaa tatcctatcc cgcgcccagt 4620
ccggtgtaag aacgggtctg tccatccacc tctgttggga attccggtcc gggtcacctt 4680
tgtccaccaa gatggaactg cggccgcgga ccgaattccc atggagtcaa agattcaaat 4740
agaggaccta acagaactcg ccgtaaagac tggcgaacag ttcatacaga gtctcttacg 4800
actcaatgac aagaagaaaa tcttcgtcaa catggtggag cacgacacgc ttgtctactc 4860
caaaaatatc aaagatacag tctcagaaga ccaaagggca attgagactt ttcaacaaag 4920
ggtaatatcc ggaaacctcc tcggattcca ttgcccagct atctgtcact ttattgtgaa 4980
gatagtggaa aaggaaggtg gctcctacaa atgccatcat tgcgataaag gaaaggccat 5040
cgttgaagat gcctctgccg acagtggtcc caaagatgga cccccaccca cgaggagcat 5100
cgtggaaaaa gaagacgttc caaccacgtc ttcaaagcaa gtggattgat gtgatatctc 5160
cactgacgta agggatgacg cacaatccca ctatccttcg caagacccтt cctctatata 5220
aggaagttca tttcatttgg agaggacagg gtacccgggg atccaccatg tctccggaga 5280
ggagaccagt tgagattagg ccagctacag cagctgatat ggccgcggtt tgtgatatcg 5340
ttaaccatta cattgagacg tctacagtga actttaggac agagccacaa acaccacaag 5400
agtggattga tgatctagag aggttgcaag atagataccc ttggttggtt gctgaggttg 5460
agggtgttgt ggctggtatt gcttacgctg ggccctggaa ggctaggaac gcttacgatt 5520
ggacagttga gagtactgtt tacgtgtcac ataggcatca aaggttgggc ctaggatcca 5580
cattgtacac acatttgctt aagtctatgg aggcgcaagg ttttaagtct gtggttgctg 5640
ttataggcct tccaaacgat ccatctgtta ggttgcatga ggctttggga tacacagccc 5700
ggggtacatt gcgcgcagct ggatacaagc atggtggatg gcatgatgtt ggtttttggc 5760
aaagggattt tgagttgcca gctcctccaa ggccagttag gccagttacc cagatctgag 5820
tcgacctgca ggcatgccgc tgaaatcacc agtctctctc tacaaatcta tctctctcta 5880
taataatgtg tgagtagttc ccagataagg gaattagggt tcttataggg tttcgctcat 5940

gtgttgagca tataagaaac ccttagtatg tatttgtatt tgtaaaatac ttctatcaat 6000
aaaatttcta attcctaaaa ccaaaatcca gtggcgagct cgaattcgag ctcgagcccg 6060
ggtggatcct ctagagtcga cctgcagaag cttcggtccg gcgcgcctct agttgaagac 6120
acgttcatgt cttcatcgta agaagacact cagtagtctt cggccagaat ggcctaactc 6180
aaggcc 6186

<210> 26
<211> 3830
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<210>
<213> Secuencia que representa parte de la inserción PHI8999A así como la secuencia flanqueante 5' a la inserción.

<400> 26

actagtttcc tagcccgcgt cgtgccccta ccccaccgac gtttatggaa ggtgccattc 60
cacggttctt cgtggccgcc cctaaggatg taaatggtcg gtaaaatccg gtaaatttcc 120
ggtaccgttt accagatttt tccagccgtt ttcggattta tcgggatata cagaaaacga 180
gacggaaacg gaataggttt ttttttcgaaa acggtacggt aaacggtgag acaaacttac 240
cgtccgtttt cgtatttctc gggaaactct ggtatattcc cgtatttgtc ccgtattttc 300
ccgacccacg gacctgccaa tcaaccatca gccagtcagc ccatccccac agctatggcc 360
catggggcca tgttggccac atgcccacgc aacgcaaggc agtaaggctg gcagcctggc 420
acgcattgac gcatgtggac acacacagcc gccgcctgtt cgtgtttctg tgccgttgtg 480
cgagactgtg actgcgagtg gcggagtcgg cgaacggcga ggcgtctccg gagtctggac 540
tgcggctgtg gacagcgacg ctgtgacggc gactcggcga agccccaagc taccaagccc 600
ccaagtcccc atccatctct gcttctctgg tcatctcctt cccctggtcg atctgcaggc 660
gccagaccgg ccgaagcatc acgaaacgca ctaagacctc gaaggagtca aaccactcct 720
ccgaggcctc gggggctaca cccggcgggt gcgctcgcgc gcacccaccg gaacaaaatg 780
taaccgagaa aggtcggtcc ccttgcaaaa aaagtgcgac aaaagcctcc aagcgagtat 840
taacactcac tttgaggctc gggggctact gtcggggacc ataattaggg gtacccccaa 900
gactcctaat ctcagctggt aacccccatc agcacaaagc tgcaaaggcc tgatgggtgc 960
gattaagtca aggctcggtc cactcaaggg acacgatctc gcctcgcccg agcccagcct 1020
cgggcaaggg cggccgaccc cgaggattca cgtctcgccc gagggccccc tcaagcgacg 1080
ggcacacctt cggctcgccc gaggcccatt cttcgccgag aagcaacctt ggccagatcg 1140
ccacaccgac cgaccgtatc gcaggagcat ttaatgcgag gatcgcctga caccttatcc 1200
tgacgcgcgc tcttcagtcg acagagccga agtgaccgca atcacttcgc cgctccactg 1260
accgacctga caagaagaca gcgccgcctg cgtcgctccg actgctgtgc cactcgacag 1320
agtgaggctg acagcagcca agtccggcct cgggcgccat aggaagctcc gcctcgcccg 1380
accctagggc tcggactcgg cctcggctcc ggaagacgac gaactacgct tcgcccgacc 1440
ccagggcttg gactcagcct cggctccgga agacgacgaa ttccgcctcg cccgacccca 1500
gggctcggac tcggcctcgg ctccagaaga cgacgaactc cgcctcgccc gaccccaggg 1560
ctcggactca gcctcggctc cggaagacga cgaactccgc ctcgcccgac cccagggctc 1620
ggactcagcc tcggcctcag acgatggtct ccgcctcgcc cgacccgggg ctcggactcg 1680
acctttctat cggaccttgt cagatcctgt cttcgtccga ggaggctttg gcaatcctca 1740
ctatgtactc ggtcttaggg gagtggcctt tcaacaaact ggtacgaatc acacccgcac 1800
attcaggaac tccgggacca ttgactctct agatgagata ccacctcaag acaacagcgg 1860
cgcaccttgg aatgactact cccatgtgct gaatcatgtt acctttgtgc gctggccagg 1920
tgagatctca ggttccgact catggagagc accaatgttc tcttggacgc atcgtagcgc 1980
taccccaca aacaccattg atccagagag aatcactcat tcttcaagaa ctgcatatct 2040
tgccgagatc ctcatcccta aaggtacttg acaatagtat tattggagtc gatacacaac 2100
tcacaaaaaa tacaagaagt cgactaggtg gattggtccg agtgaagaga aaaaaaagcc 2160
atacagaact caaaatcttt tccggagata ttcattttcc tgaagaggcg gataagatat 2220
taggtggcag tttgatacca ccagaaagag aaaaaaaaga ttctaaggaa tcaaaaaaaa 2280
ggaaaaattg ggtttatgtt caacggaaaa aatttctcaa aagcaaggaa aagtattgtg 2340
gctatttatc tatccgtgca gctgatatgg ccgcggtttg tgatatcgtt aaccattaca 2400
ttgagacgtc tacagtgaac tttaggacag agccacaaac accacaagag tggattgatg 2460
atctagagag gttgcaagat agataccctt ggttggttgc tgaggttgag ggtgttgtgg 2520
ctggtattgc ttacgctggg ccctggaagg ctaggaaccc tcaacctcag caaccaacca 2580
atggtatcta tcttgcaacc tctctagatc atcaatccac tcttgtggtg tttgtggctc 2640

```
tgtcctaaag ttcactgtag acgtctcaat gtaatggtta acgatatcac aaaccgagag 2700
aagagggatc tcgaagcttc ggccggggcc catcgatatc cgcgggcatg cctgcagtgc 2760
agcgtgaccc ggtcgtgccc ctctctagag ataatgagca ttgcatgtct aagttataaa 2820
aaattaccac aactggaaga gcggttaccc ggaccgaagc ttcggccggg gcccatcgat 2880
atccgcgggc atgcctgcag tgcagcgtga cccggtcgtg cccctctcta gagataatga 2940
gcattgcatg tctaagttat aaaaaattac cacatatttt ttttgtcaca cttgtttgaa 3000
gtgcagttta tctatcttta tacatatatt taaactttac tctacgaata atataatcta 3060
tagtactaca ataatatcag tgttttagag aatcatataa atgaacagtt agacatggtc 3120
taaaggacaa ttgagtattt tgacaacagg actctacagt tttatctttt tagtgtgcat 3180
gtgttctcct tttttttgc aaatagcttc acctatataa tacttcatcc attttattag 3240
tacatccatt tagggtttag ggttaatggt ttttatagac taatttttt agtacatcta 3300
ttttattcta ttttagcctc taaattaaga aaactaaaac tctattttag ttttttttatt 3360
taataattta gatataaaat agaataaaat aaagtgacta aaaattaaac aaatacccctt 3420
taagaaatta aaaaaactaa ggaaacattt ttcttgtttc gagtagataa tgccagcctg 3480
ttaaacgccg tcgacgagtc taacggacac caaccagcga accagcagcg tcgcgtcggg 3540
ccaagcgaag cagacggcac ggcatctctg tcgctgcctc tggacccctc tcgagagttc 3600
cgctccaccg ttggacttgc tccgctgtcg gcatccagaa attgcgtggc ggagcggcag 3660
acgtgagccg gcacggcagg cggcctcctc ctcctctcac ggcacggcag ctacgggggа 3720
ttcctttccc accgctcctt cgctttcccc tcctcgcccg ccgtaataaa tagacacccc 3780
ctccacaccc tctttccccа acctcgtgtt gttcggagcg cacacacaca           3830
```

<210> 27
<211> 3347
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<210>
<213> Secuencia que representa parte de la inserción de PHI8999A así como la secuencia flanqueante 3' a la inserción.

<400> 27

```
cccactatcc ttcgcaagac ccttcctcta tataaggaag ttcatttcat ttggagagga 60
cagggtaccc ggggatccac catgtctccg gagaggagac cagttgagat taggccagct 120
acagcagctg atatggccgc ggtttgtgat atcgttaacc attacattga gacgtctaca 180
gtgaacttta ggacagagcc acaaacacca caagagtgga ttgatgatct agagaggttg 240
caagatagat acccttggtt ggttgctgag gttgagggtg ttgtggctgg tattgcttac 300
gctgggccct ggaaggctag gaacgcttac gattggacag ttgagagtac tgtttacgtg 360
tcacataggc atcaaaggtt gggcctagga tccacattgt acacacattt gcttaagtct 420
atggaggcgc aaggttttaa gtctgtggtt gctgttatag gccttccaaa cgatccatct 480
gttaggttgc atgaggcttt gggatacaca gcccggggta cattgcgcgc agctggatac 540
aagcatggtg gatggcatga tgttggtttt tggcaaaggg attttgagtt gccagctcct 600
ccaaggccag ttaggccagt tacccagatc tgagtcgacc tgcaggcatg cccgctgaaa 660
tcaccagtct ctctctacaa atctatctct ctctataata atgtgtgagt agttcccaga 720
taagggaatt agggttctta tagggtttcg ctcatgtgtt gagcatataa gaaacccttа 780
gtatgtattt gtatttgtaa aatacttcta tcaataaaat ttctaattcc taaaaccaaa 840
atccagtggc gagctcgaat tcgagctcga gcccgggtgg atcctctaga gtcgacctgc 900
agaagcttcg gtccggcgcg cctctagttg aagacacgtt catgtcttca tcgtaagaag 960
acactcagta gtcttcggcc agaatggcct aactcaaggc cctcactccg cttgatcttg 1020
gcaaagatat ttgacgcatt tattagtatg tgttaatttt catttgcagt gcagtatttt 1080
ctattcgatc tttatgtaat tcgttacaat taataaatat tcaaatcaga ttattgactg 1140
tcatttgtat caaatcgtgt ttaatggata tttttattat aatattgatg atatctcaat 1200
caaaacgtag ataataataa tatttattta atatttttgc gtcgcacagt gaaaatctat 1260
atgagattac aaaataccga cаacattatt taagaaacat agacattaac cctgagactg 1320
ttggacatca acgggtagat tccttcatgc atagcacctc attcttgggg acaaaagcac 1380
ggtttggccg ttccattgct gcacgaacga gctttgctat atcctcgggt tggatcatct 1440
catcaggtcc aatcaaattt gtccaagaac tcatgttagt cgcaacgaaa ccggggcata 1500
tgtcgggtat ctcgagctcg cgaaagcttg gctgcaggtc gacggatcct tcaacaaaag 1560
ggtacctgta cccgaaaccg acacaggtgg gtaggtagag aatacctagg ggcgcgagac 1620
aactctctct aaggaactcg gcaaaatagc cccgtaactt cgggagaagg ggtgcccccc 1680
gctaacaata aacgaatacg gtttatgtat ggattccggt aaaataccgg tactcgattt 1740
```

cataagagtc gaataggaag ttaagatgag ggtggtatca tcataaaaat ggagtagtat 1800
cctaaattat actaatccac gtatgatatg tatgcctttc cttatcaacc ggaagtagtg 1860
caaaaaaaat tctatactgc actgctctct ttttactgag aaatgcaaaa aaataaaagt 1920
gaagtaaggg tgccccatag atatttgatc ttgcctcctg tccccccccc ccttttttca 1980
tcaaaaattt ccatgaaaaa agaaaagatg aatttgtcca ttcattgaac cctagttcgg 2040
gactgacggg gctcgaaccc gcagcttccg cctgttccta gccttccagg gcccagcgta 2100
agcaatacca gccacagcac cctcaacctc agcaaccaac caagggtatc tatcttgcaa 2160
cctctctaga tcatcaatcc actcttgtgg tgtttgtggc tctgtcctaa agttcactgt 2220
agacgtctca atgtaatggt taacgatatc acaaaccgcg gaacacaaga acgaaagcac 2280
cttttcattc tttcatatac tagggggtttt tacttggaaa agacaatgtt ccatactaaa 2340
ggatagctgc agaagccgcc accgtcttga ggaccttccg gggagccaga ccggtcgaac 2400
cgtgcctcca cttgctaagg agaaagggaa aatcagggcc aggacatacg aaggaggagc 2460
cagaacgaag atatcctaag atacttactc gctccgggcc atgatcaatc atgcctgtgg 2520
ggaggtctct cgcacctcga tccatgaagg taccaccgag gtctgccccg ccgccggctt 2580
cggtaccgtc ctcgccttgg gcgcccgagg cacccggggg atggactgcc caggcgcagc 2640
cacgacgacc caaggatcac cctcctgcgc agtcggcacg agcaatagtt ctcggggaac 2700
aggcagcttg gcctgactcc ccggggtcac ctcaactacc tcggccgagg ggtcaagtac 2760
cccctcagtc cgcccccgct cttcggaccg ggaccccgac gtcccggccc cggataccga 2820
cggcaccagc ccgctcgggg gctggcttga cgacccctgg cccagcctca gatctgggct 2880
gaggccgagg caggcggcca tgtcgtcgtc ttcatcatcg tctttcatcat cgtcgtcgtc 2940
atcaggcgtc tccggcgacg gctcccttgg gagcccctcc ctctcctgcc gacgacgaag 3000
cctttccaag gcatcccgag cccacgtccg ctcgtgggcc cgagccttct ttgcgtcctt 3060
cttctccttc ctcttctccg cggtgaccct ccgcgcagct cggtccaccg catcctccgg 3120
gactggtggc agggaaggct tgtgatgccc tacctcctgg agacagacga aaagtctcag 3180
ctatgagaac cgagggcaat ctgacgcaag aaggaagaag gagcggatac tcaccagaga 3240
cacgcacccg cgatcgggac gcattaaggg ctgggaaaaa gtgccggcct ctaatttcgc 3300
taccgtgccg tccacccacc tgtggaggtc atcgatggga aggggaa 3347

<210> 28
<211> 669
<212> ADN
<213> *Zea mays*

<400> 28

actagtttcc tagcccgcgt cgtgccccta ccccaccgac gtttatggaa ggtgccattc 60
cacggttctt cgtggccgcc cctaaggatg taaatggtcg gtaaaatccg gtaaatttcc 120
ggtaccgttt accagatttt tccagccgtt ttcggattta tcgggatata cagaaaacga 180
gacggaaacg gaataggttt tttttcgaaa acggtacggt aaacggtgag acaaacttac 240
cgtccgtttt cgtatttctc gggaaactct ggtatattcc cgtatttgtc ccgtattttc 300
ccgacccacg gacctgccaa tcaaccatca gccagtcagc ccatccccac agctatggcc 360
catggggcca tgttggccac atgcccacgc aacgcaaggc agtaaggctg gcagcctggc 420
acgcattgac gcatgtggac acacacagcc gccgcctgtt cgtgtttctg tgccgttgtg 480
cgagactgtg actgcgagtg gcggagtcgg cgaacggcga ggcgtctccg gagtctggac 540
tgcggctgtg gacagcgacg ctgtgacggc gactcggcga agccccaagc taccaagccc 600
ccaagtcccc atccatctct gcttctctgg tcatctcctt cccctggtcg atctgcaggc 660
gccagaccg 669

<210> 29
<211> 200
<212> ADN
<213> *Zea mays*

<400> 29

gccgaagcat cacgaaacgc actaagacct cgaaggagtc aaaccactcc tccgaggcct 60
cgggggctac acccggcggg tgcgctcgcg cgcacccacc ggaacaaaat gtaaccgaga 120
aaggtcggtc cccttgcaaa aaaagtgcga caaaagcctc caagcgagta ttaacactca 180
ctttgaggct cgggggctac 200

<210> 30

<211> 812
<212> ADN
<213> *Zea mays*

<210>
<213> Fragmento de retrotransposón Huck-1 de maíz

<400> 30

tgtcggggac cataattagg ggtaccccca agactcctaa tctcagctgg taacccccat 60
cagcacaaag ctgcaaaggc ctgatgggtg cgattaagtc aaggctcggt ccactcaagg 120
gacacgatct cgcctcgccc gagcccagcc tcgggcaagg gcggccgacc ccgaggattc 180
acgtctcgcc cgagggcccc ctcaagcgac gggcacacct tcggctcgcc cgaggcccat 240
tcttcgccga gaagcaacct tggccagatc gccacaccga ccgaccgtat cgcaggagca 300
tttaatgcga ggatcgcctg acaccttatc ctgacgcgcg ctcttcagtc gacagagccg 360
aagtgaccgc aatcacttcg ccgctccact gaccgacctg acaagaagac agcgccgcct 420
gcgtcgctcc gactgctgtg ccactcgaca gagtgaggct gacagcagcc aagtccggcc 480
tcgggcgcca taggaagctc cgcctcgccc gaccctaggg ctcggactcg gcctcggctc 540
cggaagacga cgaactacgc ttcgcccgac cccagggctt ggactcagcc tcggctccgg 600
aagacgacga attccgcctc gcccgacccc agggctcgga ctcggcctcg gctccagaag 660
acgacgaact ccgcctcgcc cgaccccagg gctcggactc agcctcggct ccggaagacg 720
acgaactccg cctcgcccga ccccagggct cggactcagc ctcggcctca gacgatggtc 780
tccgcctcgc ccgacccggg gctcggactc ga 812

<210> 31
<211> 335
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<210>
<213>Representa parte del fragmento de secuencia de inserción PHI8999A del gen cry1F

<400> 31

cctttctatc ggaccttgtc agatcctgtc ttcgtccgag gaggctttgg caatcctcac 60
tatgtactcg gtcttagggg agtggccttt caacaaactg gtacgaatca cacccgcaca 120
ttcaggaact ccgggaccat tgactctcta gatgagatac cacctcaaga caacagcggc 180
gcaccttgga atgactactc ccatgtgctg aatcatgtta cctttgtgcg ctggccaggt 240
gagatctcag gttccgactc atggagagca ccaatgttct cttggacgca tcgtagcgct 300
acccccacaa acaccattga tccagagaga atcac 335

<210> 32
<211> 321
<212> ADN
<213> *Zea mays*

<210>
<213> Fragmento del gen rpoC2 de cloroplasto de maíz

<400> 32

tcattcttca agaactgcat atcttgccga gatcctcatc cctaaaggta cttgacaata 60
gtattattgg agtcgataca caactcacaa aaaatacaag aagtcgacta ggtggattgg 120
tccgagtgaa gagaaaaaaa agccatacag aactcaaaat cttttccgga gatattcatt 180
ttcctgaaga ggcggataag atattaggtg gcagtttgat accaccagaa agagaaaaaa 240
aagattctaa ggaatcaaaa aaaaggaaaa attgggttta tgttcaacgg aaaaaatttc 300
tcaaaagcaa ggaaaagtat t 321

<210> 33
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<210>
<213> Representa parte del fragmento de secuencia de inserción PHI8999A del promotor ubiZM1(2); también un fragmento de gen trn1 de cloroplasto de maíz

<400> 33

gtggctattt atctatc 17

<210> 34
<211> 201
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<210>
<213> Representa parte del fragmento de secuencia de inserción PHI8999A del gen pat

<400> 34

gcagctgata tggccgcggt ttgtgatatc gttaaccatt acattgagac gtctacagtg 60
aactttagga cagagccaca aacaccacaa gagtggattg atgatctaga gaggttgcaa 120
gatagatacc cttggttggt tgctgaggtt gagggtgttg tggctggtat tgcttacgct 180
gggccctgga aggctaggaa c 201

<210> 35
<211> 138
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<210>
<213> Representa parte del fragmento de secuencia de inserción PHI8999A del gen pat (complemento)

<400> 35

cctcaacctc agcaaccaac caatggtatc tatcttgcaa cctctctaga tcatcaatcc 60
actcttgtgg tgtttgtggc tctgtcctaa agttcactgt agacgtctca atgtaatggt 120
taacgatatc acaaaccg 138

<210> 36
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<210>
<213> Representa parte del fragmento de secuencia de inserción PHI8999A del gen cry1F (complemento)

<400> 36
agagaagagg gatct 15

<210> 37
<211> 118
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<210>
<213> Representa parte del fragmento de secuencia de inserción PHI8999A de polienlazante

<400> 37

<210> 38
<211> 550
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<210>
<213> Representa parte del fragmento de secuencia de inserción PHI8999A del terminador ORF25 (complemento)

<400> 38

cgaagcttcg gccggggccc atcgatatcc gcgggcatgc ctgcagtgca gcgtgacccg 60
gtcgtgcccc tctctagaga taatgagcat tgcatgtcta agttataaaa aattacca 118

ctcactccgc ttgatcttgg caaagatatt tgacgcattt attagtatgt gttaattttc 60
atttgcagtg cagtattttc tattcgatct ttatgtaatt cgttacaatt aataaatatt 120
caaatcagat tattgactgt catttgtatc aaatcgtgtt taatggatat ttttattata 180
atattgatga tatctcaatc aaaacgtaga taataataat atttatttaa tatttttgcg 240
tcgcacagtg aaaatctata tgagattaca aaataccgac aacattattt aagaaacata 300
gacattaacc ctgagactgt tggacatcaa cgggtagatt ccttcatgca tagcacctca 360
ttcttgggga caaaagcacg gtttggccgt tccattgctg cacgaacgag ctttgctata 420
tcctcgggtt ggatcatctc atcaggtcca atcaaatttg tccaagaact catgttagtc 480
gcaacgaaac cggggcatat gtcgggtatc tcgagctcgc gaaagcttgg ctgcaggtcg 540
acggatcctt 550

<210> 39
<211> 128
<212> ADN
<213> *Zea mays*

<210>
<213> Fragmento del gen de ARNr rps12 de cloroplasto de maíz (complemento)

caacaaaagg gtacctgtac ccgaaaccga cacaggtggg taggtagaga atacctaggg 60
gcgcgagaca actctctcta aggaactcgg caaaatagcc ccgtaacttc gggagaaggg 120
gtgccccc 128

<210> 40
<211> 392
<212> ADN
<213> *Zea mays*

<210>
<213> Fragmento del genoma del cloroplasto de maíz

<400> 40

ctaacaataa acgaatacgg tttatgtatg gattccggta aaataccggt actcgatttc 60
ataagagtcg aataggaagt taagatgagg gtggtatcat cataaaaatg gagtagtatc 120
ctaaattata ctaatccacg tatgatatgt atgcctttcc ttatcaaccg gaagtagtgc 180
aaaaaaaatt ctatactgca ctgctctctt tttactgaga aatgcaaaaa aataaaagtg 240
aagtaagggt gccccataga tatttgatct tgcctcctgt ccccccccc ctttttttcat 300
caaaaatttc catgaaaaaa gaaaagatga atttgtccat tcattgaacc ctagttcggg 360
actgacgggg ctcgaacccg cagcttccgc ct 392

<210> 41
<211> 188
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<210>
<213> Representa parte del fragmento de secuencia de inserción PHI8999A del gen pat (complemento)

<400> 41

gttcctagcc ttccagggcc cagcgtaagc aataccagcc acagcaccct caacctcagc 60
aaccaaccaa gggtatctat cttgcaacct ctctagatca tcaatccact cttgtggtgt 120
ttgtggctct gtcctaaagt tcactgtaga cgtctcaatg taatggttaa cgatatcaca 180
aaccgcgg 188

<210> 42
<211> 81
<212> ADN
<213> *Zea mays*

<210>
<213> Fragmento del ORF241 del cloroplasto de maíz (complemento)

<400> 42

<210> 43
<211> 254
<212> ADN
<213> *Zea mays*

<400> 43

```
agctgcagaa gccgccaccg tcttgaggac cttccgggga gccagaccgg tcgaaccgtg 60
cctccacttg ctaaggagaa agggaaaatc agggccagga catacgaagg aggagccaga 120
acgaagatat cctaagatac ttactcgctc cgggccatga tcaatcatgc ctgtggggag 180
gtctctcgca cctcgatcca tgaaggtacc accgaggtct gccccgccgc cggcttcggt 240
accgtcctcg cctt                                                  254
```

<210> 44
<211> 749
<212> ADN
<213> *Zea mays*

<400> 44

```
gggcgcccga ggcacccggg ggatggactg cccaggcgca gccacgacga cccaaggatc 60
accctcctgc gcagtcggca cgagcaatag ttctcgggga acaggcagct tggcctgact 120
ccccggggtc acctcaacta cctcggccga ggggtcaagt acccccctcag tccgcccccg 180
ctcttcggac cgggaccccg acgtcccggc cccggatacc gacggcacca gcccgctcgg 240
gggctggctt gacgacccct ggcccagcct cagatctggg ctgaggccga ggcaggcggc 300
catgtcgtcg tcttcatcat cgtcttcatc atcgtcgtcg tcatcaggcg tctccggcga 360
cggctccctt gggagccccc ccctctcctg ccgacgacga agcctttcca aggcatcccg 420
agcccacgtc cgctcgtggg cccgagcctt ctttgcgtcc ttcttctcct tcctcttctc 480
cgcggtgacc ctccgcgcag ctcggtccac cgcatcctcc gggactggtg gcagggaagg 540
cttgtgatgc cctacctcct ggagacagac gaaaagtctc agctatgaga accgagggca 600
atctgacgca agaaggaaga aggagcggat actcaccaga gacacgcacc cgcgatcggg 660
acgcattaag ggctgggaaa aagtgccggc ctctaatttc gctaccgtgc cgtccaccca 720
cctgtggagg tcatcgatgg gaaggggaa                                   749

cacaagaacg aaagcacctt ttcattcttt catatactag gggtttttac ttggaaaaga 60
caatgttcca tactaaagga t                                          81
```

<210> 45
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<210>
<213> secuencia flanqueante 5' al evento; unión entre las regiones 3 y 4

<400> 45
tcggactcga cctttctatc 20

<210> 46
<211> 20
<212 ADN
<213> Secuencia artificial

<210>
<213> secuencia flanqueante 5' al evento; unión entre las regiones 4 y 5

<400> 46
agagaatcac tcattcttca 20

<210> 47
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<210>
<213> secuencia flanqueante 5' al evento; unión entre las regiones 5 y 6

<400> 47
gaaaagtatt gtggctattt 20

<210> 48
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<210>
<213> secuencia flanqueante 5' al evento; unión entre las regiones 6 y 7a

<400> 48
tctcaaggcc gcagctgata 20

<210> 49
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<210>
<213> secuencia flanqueante 5' al evento; unión entre las regiones 7a y 7b

<400> 49
ggctaggaac cctcaacctc 20

<210> 50
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<210>
<213> secuencia flanqueante 5' al evento; unión entre las regiones 7b y 7c

<400> 50
tcacaaaccg agagaagagg 20

<210> 51
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<210>
<213> secuencia flanqueante 5' al evento; unión entre las regiones 7c y 8

<400> 51
agagggatct cgaagcttcg 20

<210> 52
<211> 20
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<210>
<213> secuencia flanqueante 5' al evento; unión entre las regiones 8 y 9

<400> 52
aaaattacca caactggaag 20

<210> 53
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<210>
<213> secuencia flanqueante 3’ al evento; unión entre las regiones 9 y 10

<400> 53
agctatgttt ctcactccgc 20

<210> 54
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<210>
<213> secuencia flanqueante 3’ al evento; unión entre las regiones 10 y 11

<400> 54
acggatcctt caacaaaagg 20

<210> 55
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<210>
<213> secuencia flanqueante 3’ al evento; unión entre las regiones 11 y 12

<400> 55
gtgccccccg ctaacaataa 20

<210> 56
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<210>
<213> secuencia flanqueante 3’ al evento; unión entre las regiones 12 y 13

<400> 56
gcttccgcct gttcctagcc 20

<210> 57
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<210>
<213> secuencia flanqueante 3’ al evento; unión entre las regiones 13 y 14

<400> 57
aaaccgcgga acacaagaac 20

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ADN aislada que comprende una secuencia de nucleótidos identificada como SEC ID Nº 21, 22, 24, 26 o 27.

2. Un kit para identificar el evento TC1507 en una muestra biológica que detecta una región específica de TC1507, comprendiendo dicho kit un primer cebador que reconoce la SEC ID Nº 21 o SEC ID Nº 22, y un segundo cebador que reconoce la SEC ID Nº 25.

3. El kit de la reivindicación 2, en el que dichos al menos primero y segundo cebadores comprenden la secuencia de la SEC ID Nº 1 y SEC ID Nº 2, respectivamente.

4. El kit de la reivindicación 2, en el que dichos al menos primero y segundo cebadores comprenden la secuencia de la SEC ID Nº 2 y SEC ID Nº 23, respectivamente.

5. El kit de la reivindicación 2, en el que dichos al menos primero y segundo cebadores comprenden la secuencia de la SEC ID Nº 3 y SEC ID Nº 5, respectivamente.

6. El kit de la reivindicación 2, en el que dichos al menos primero y segundo cebadores comprenden la secuencia de la SEC ID Nº 4 y SEC ID Nº 5, respectivamente.

7. Un kit de detección de ADN que comprende al menos una molécula de ADN que es homóloga o complementaria a la SEC ID Nº 26 o 27, en el que la molécula de ADN es específica para el ADN de unión del evento de maíz TC1507 y es de una longitud suficiente de polinucleótidos de ADN contiguos para funcionar en un método de detección de ADN.

8. Un kit para identificar el evento TC1507 en una muestra biológica, comprendiendo dicho kit: una sonda específica que comprende una secuencia que hibrida con la SEC ID Nº 21 y la SEC ID Nº 25, contigua con la misma.

9. Un kit para identificar el evento TC1507 en una muestra biológica, comprendiendo dicho kit: una sonda específica que comprende una secuencia que hibrida con la SEC ID Nº 22 y la SEC ID Nº 25, contigua con la misma.

10. Un kit de detección de ADN que comprende una sonda polinucleotídica que hibrida en condiciones rigurosas de hibridación con una o más secuencias de ADN seleccionadas entre el grupo que consiste en las SEC ID Nº 45, 46, 47, 49, 50, 51, 52, 54, 55, 56 y 57 y complementos de las mismas.

11. Un kit de detección de ADN que comprende un par de cebadores que comprende cada uno al menos 10 nucleótidos de la SEC ID Nº 26 y SEC ID Nº 27, en el que cada uno está en lados opuestos de una secuencia diagnóstica para la inserción del evento TC1507.

12. Un método para identificar el evento TC1507 en una muestra biológica, que comprende detectar una región específica de TC1507 con una sonda o primer cebador que reconoce específicamente una secuencia dentro de la SEC ID Nº 21 o SEC ID Nº22.

13. El método de la reivindicación 12, que comprende adicionalmente amplificar un fragmento de ADN de un ácido nucleico presente en dicha muestra biológica usando una reacción en cadena de la polimerasa con al menos dos cebadores, en el que dicho primer cebador reconoce una secuencia dentro de la SEC ID Nº 21 o SEC ID Nº 22, y un segundo cebador reconoce una secuencia dentro de la SEC ID Nº 25.

14. El método de la reivindicación 13, en el que dicho primer cebador reconoce una secuencia dentro de la SEC ID Nº 21 y dicho segundo cebador reconoce una secuencia dentro de la SEC ID Nº 25.

15. El método de la reivindicación 12, en el que dicho primer cebador reconoce una secuencia dentro de la SEC ID Nº 22 y un segundo cebador reconoce una secuencia dentro de la SEC ID Nº 25.

16. El método de la reivindicación 14, en el que dichos primero y segundo cebadores comprenden: la secuencia de la SEC ID Nº 2 y SEC ID Nº 1 respectivamente; o la secuencia de la SEC ID Nº 2 y SEC ID Nº 23 respectivamente.

17. El método de la reivindicación 15, en el que dichos primero y segundo cebadores comprenden: la secuencia de la SEC ID Nº 3 y SEC ID Nº 5 respectivamente; o la secuencia de la SEC ID Nº 4 y SEC ID Nº 5 respectivamente.

18. El método de la reivindicación 16, que comprende amplificar un fragmento de aproximadamente 912 pb, aproximadamente 844 pb, aproximadamente 342 pb, o aproximadamente 252 pb usando un protocolo de identificación por PCR de TC1507.

19. Un método para detectar la presencia del evento de maíz TC1507 o descendencia del mismo en una muestra

biológica, que comprende:

(a) extraer una muestra de ADN de dicha muestra biológica;
(b) proporcionar las moléculas cebadoras de ADN SEC ID Nº 1 y SEC ID Nº 2, SEC ID Nº 2 y SEC ID Nº 23, SEC ID Nº 3 y SEC ID Nº 5, o SEC ID Nº 4 y SEC ID Nº 5;
(c) proporcionar condiciones de reacción de amplificación de ADN;
(d) realizar dicha reacción de amplificación de ADN, produciendo de ese modo una molécula de amplicón de ADN; y
(e) detectar dicha molécula de amplicón de ADN, donde la detección de dicha molécula de amplicón de ADN en dicha reacción de amplificación de ADN indica la presencia del evento de maíz TC1507.

20. Una molécula de ADN aislada que comprende el amplicón producido por el método de la reivindicación 19.

21. Un método para detectar la presencia de ADN correspondiente al evento TC1507 en una muestra, comprendiendo el método:

(a) poner en contacto la muestra que comprende ADN de maíz con una sonda polinucleotídica que hibrida en condiciones rigurosas de hibridación con ADN del evento de maíz TC1507 y no hibrida en dichas condiciones rigurosas de hibridación con un ADN de planta de maíz no TC1507;
(b) someter la muestra y la sonda a condiciones rigurosas de hibridación; y
(c) detectar la hibridación de la sonda al ADN, donde la detección de hibridación indica la presencia del evento TC1507.

22. Una secuencia cebadora nucleotídica de ADN aislada que comprende una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID Nº 45, 46, 47, 49, 50, 51, 52, 54, 55, 56 y 57 o su complemento.

23. Un par de moléculas de ADN que comprende: una primera molécula de ADN y una segunda molécula de ADN, en el que las moléculas de ADN son de una longitud suficiente de nucleótidos contiguos de la SEC ID Nº 26 o su complemento, o de la SEC ID Nº 27 o su complemento, para funcionar como cebadores o sondas de ADN diagnósticos para el ADN extraído de una planta de maíz TC1507 o descendencia de la misma.

24. Una molécula de ADN aislada que comprende una secuencia de unión que comprende una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID Nº 45, 46, 47, 49, 50, 51, 52, 54, 55, 56 y 57 y complementos de las mismas.

25. Un método para confirmar la pureza de las semillas, que comprende la detección de una región específica de TC1507 con un cebador o sonda específico que reconoce específicamente una secuencia dentro de la SEC ID Nº 21 o SEC ID Nº 22, en una muestra de semillas.

26. Un método para explorar semillas para la presencia del evento TC1507, que comprende la detección de una región específica de TC1507 con un cebador o sonda específico que reconoce específicamente una secuencia dentro de la SEC ID Nº 21 o SEC ID Nº 22 en una muestra de un lote de semillas.

27. Una secuencia de ADN aislada que comprende una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en ADN que tiene al menos una secuencia de nucleótidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID Nº 45, 46, 47, 49, 50, 51, 52, 54, 55, 56 y 57 y complementos de las mismas.

28. Un par de secuencias de ADN aisladas, que comprenden cada una al menos diez nucleótidos y que cuando se usan juntas en un procedimiento de amplificación de ADN producirá un amplicón diagnóstico para el evento TC1507.

29. El par de secuencias de ADN aisladas de la reivindicación 28 en el que cada una se elige entre la SEC ID Nº 26; o en el que cada una se elige entre la SEC ID Nº 27.

30. Un método para detectar la presencia de la inserción del evento TC1507 en tejido de maíz que comprende:

(a) seleccionar un par de cebadores que comprenden cada uno al menos diez nucleótidos de la SEC ID Nº 26 o SEC ID Nº 27 en el que cada miembro del par está en lados opuestos de una secuencia diagnóstica para dicha inserción del evento TC1507;
(b) poner en contacto una muestra de dicho tejido de maíz con dicho par de cebadores;
(c) realizar amplificación de ADN y analizar para la presencia de amplicones.

31. El método de la reivindicación 30 en el que cada miembro del par de cebadores se selecciona entre el grupo que consiste en las SEC ID Nº 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 23, 45, 46, 47, 49, 50, 51, 52, 54, 55, 56 y 57 y complementos de las mismas.

32. Un método para detectar la presencia de la inserción del evento TC1507 en tejido de maíz que comprende:

(a) poner en contacto una muestra de dicho tejido de maíz con una sonda polinucleotídica que hibrida en condiciones rigurosas de hibridación con una o más secuencias de ADN seleccionadas entre el grupo que consiste en las SEC ID Nº 45, 46, 47, 49, 50, 51, 52, 54, 55, 56 y 57 y complementos de las mismas;
(b) someter dicha muestra y sonda a condiciones rigurosas de hibridación; y
(c) analizar para la hibridación de la sonda.

33. El kit de detección de ADN de la reivindicación 11 en el que cada miembro del par de cebadores se selecciona entre el grupo que consiste en las SEC ID Nº 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 23, 45, 46, 47, 49, 50, 51, 52, 54, 55, 56 y 57 y complementos de las mismas.

34. Un método para identificar TC1507 en una muestra biológica que detecta una región específica de TC1507 dentro de la SEC ID Nº 24.

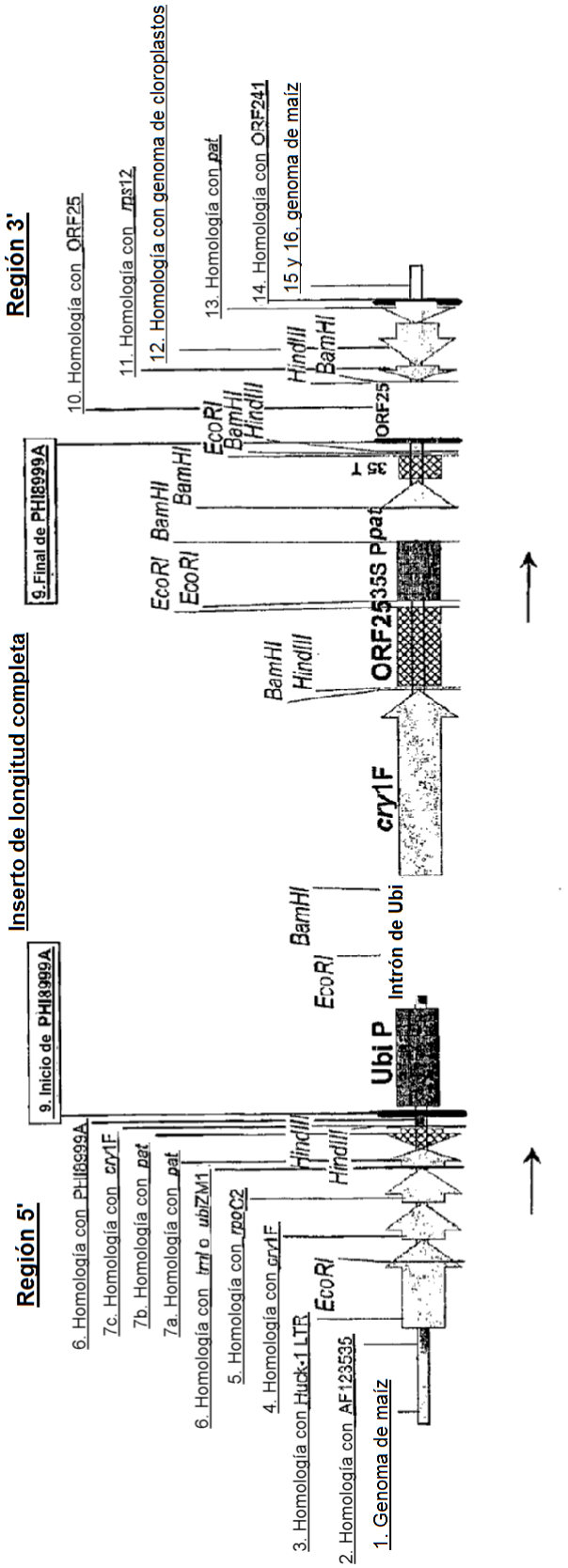
Región 5'
Inserto de longitud completa
Región 3'
1. Genoma de maíz
2. Homología con AF123535
3. Homología con Huck-1 LTR
4. Homología con cry1F
5. Homología con rpoC2
6. Homología con trnI o ubiZM1
7a. Homología con pat
7b. Homología con pat
7c. Homología con cry1F
6. Homología con PHI8999A
9. Inicio de PHI8999A
Ubi P
Intrón de Ubi
cry1F
ORF25
35S P
pat
9. Final de PHI8999A
10. Homología con ORF25
11. Homología con rps12
12. Homología con genoma de cloroplastos
13. Homología con pat
14. Homología con ORF241
15 y 16. genoma de maíz
EcoRI
BamHI
HindIII

FIG. 1