

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 464**

51 Int. Cl.:

A01H 5/10 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2001 E 10154997 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2016 EP 2210951**

54 Título: **Evento PV-ZMGT32 (nk603) en maíz y composiciones y procedimientos para la detección del mismo**

30 Prioridad:

22.06.2000 US 213567 P

13.10.2000 US 241215 P

13.10.2000 US 240014 P

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

22.03.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BEHR, CARL. F.;
HIRONAKA, CATHERINE;
HECK, GREGORY R. y
YOU, JINSONG**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 564 464 T3

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

DESCRIPCIÓN

Evento PV-ZMGT32 (nk603) en maíz y composiciones y procedimientos para la detección del mismo.

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de la biología molecular vegetal, específicamente la invención se refiere a una planta de maíz tolerante a glifosato, PV-ZMGT32 (nk603).

Antecedentes de la invención

La presente invención se refiere a una planta de maíz (*Zea mays*) PV-ZMGT32 (nk603) tolerante al herbicida glifosato y al constructo de expresión de ADN vegetal de la planta de maíz PV-ZMGT32 (nk603) y a la detección de la región de inserción transgén/genómica en PV-ZMGT32 (nk603) de maíz y su progenie.

10 El maíz es un cultivo importante y constituye una fuente de alimento primaria en muchas zonas del mundo. Se han aplicado procedimientos de biotecnología para mejorar las características agronómicas del maíz y la calidad del producto. Una de dichas características agronómicas es la tolerancia a herbicidas, en particular, la tolerancia al herbicida glifosato. Esta característica del maíz ha sido conferida por la expresión de un transgén en plantas de maíz (patente US N° 6.040.497).

15 Se conoce que la expresión de genes extraños en plantas está influenciada por su posición cromosómica, tal vez debido a la estructura de la cromatina (por ejemplo la heterocromatina) o la proximidad de los elementos reguladores de la transcripción (por ejemplo, potenciadores) cerca del sitio de integración (Weising et al., Ann. Rev. Genet 22: 421-477, 1988). Por esta razón, frecuentemente es necesario examinar un gran número de eventos con el fin de identificar un evento caracterizado por una expresión óptima de un gen de interés introducido. Por ejemplo, se ha observado en
20 plantas y otros organismos que puede existir una gran variación en los niveles de expresión de los genes introducidos entre eventos. También pueden existir diferencias en los patrones espaciales o temporales de expresión, por ejemplo, diferencias en la expresión relativa de un transgén en diversos tejidos vegetales, que es posible que no se correspondan con los patrones esperados de los elementos reguladores de la transcripción presentes en el constructo genético introducido. Por esta razón, es habitual producir de cientos a miles de eventos diferentes y examinar dichos
25 eventos buscando un único evento que tenga los niveles y los patrones de expresión del transgén deseados para propósitos comerciales. Un evento que tiene los niveles o patrones de expresión transgénica deseados es útil para introducir el transgén en otros ambientes genéticos mediante cruzamiento sexual usando procedimientos de cultivo convencionales. La progenie de dichos cruzamientos conserva las características de expresión transgénica del transformante original. Esta estrategia se utiliza para asegurar una expresión genética fiable en una serie de variedades que están bien adaptadas a las condiciones de crecimiento locales.

Sería ventajoso poder detectar la presencia de un evento particular con el fin de determinar si la progenie de un cruzamiento sexual contiene un transgén de interés. Además, un procedimiento para detectar un evento particular ayudaría a cumplir con las reglamentaciones que requieren la aprobación previa a la salida al mercado y un etiquetado de los alimentos derivados de plantas de cultivo recombinantes. Es posible detectar la presencia de un transgén
35 mediante cualquier procedimiento de detección de ácidos nucleicos bien conocido, tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o la hibridación de ADN usando sondas de ácido nucleico. Estos procedimientos de detección se centran en general en elementos genéticos usados con gran frecuencia, tales como promotores, terminadores, genes marcadores, etc. Como resultado de ello, dichos procedimientos pueden no ser útiles para discriminar entre diferentes eventos, en particular aquellos producidos usando el mismo constructo de ADN, a menos que se conozca la secuencia de ADN cromosómico adyacente al ADN insertado ("ADN flanqueador"). Un ensayo de PCR específico de evento ha sido descrito, por ejemplo, por Windels et al. (Med. Fac. Landbouww, Univ. Gent 64/5b: 459-462, 1999), quienes identificaron el evento 40-3-2 de tolerancia a glifosato en soja mediante PCR usando un juego de cebadores que abarcaba la unión entre el inserto y el ADN flanqueador, específicamente un cebador que incluía la secuencia del inserto y un segundo cebador que incluía la secuencia del ADN flanqueador.

Sumario de la invención

45 Según un aspecto de la invención, se proporciona una planta, célula, semilla de maíz o progenie del mismo tolerante a glifosato, que comprende:

50 un constructo de ADN que comprende: un primer casete de expresión y un segundo casete de expresión, en el que dicho primer casete de expresión comprende, en una unión operativa, (i) un promotor de actina 1 de arroz; (ii) un intrón de actina 1 de arroz; (iii) una molécula de ADN que codifica un péptido de tránsito a cloroplasto; (iv) una molécula de ADN que codifica EPSPS tolerante a glifosato; y (v) una molécula de ADN que comprende un terminador de transcripción;

en la que el segundo casete de expresión comprende, en una unión operativa, (a) un promotor 35S CaMV; (b) un

intrón Hsp70; (c) una molécula de ADN que codifica un péptido de tránsito a cloroplasto; (d) una molécula de ADN que codifica EPSPS resistente a glifosato; (e) una molécula de ADN que comprende un terminador de transcripción,

5 en la que la secuencia de superposición de la unión entre el ADN genómico de maíz y el flanco 5' del constructo comprende la SEQ ID N°: 9 y la unión de solapamiento entre el constructo y el flanco 3' del constructo comprende la SEQ ID N°: 11, y en el que el constructo de ADN está presente en el evento de maíz ZMGT32 (nk603) depositado en la American Type Culture Collection (ATCC) N° de Acceso PTA-2478. En particular, el primer casete de expresión comprende una molécula de ADN de un promotor de actina 1 de arroz (*Oryzae sativa*) y un intrón de actina 1 de arroz unido operativamente a una molécula de ADN que codifica una secuencia de un péptido de tránsito a cloroplasto, conectado operativamente a una molécula de ADN que codifica 5-enol-piruvilshiquimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS) resistente a glifosato, conectado operativamente a una molécula de ADN que comprende un terminador de transcripción 3'. El segundo casete de expresión transgénica del constructo de ADN comprende una molécula de ADN del promotor 35S del virus en mosaico de la coliflor (CaMV), conectado operativamente a una molécula de ADN que comprende un intrón Hsp70, conectado operativamente a una molécula de ADN que codifica un péptido de tránsito a cloroplasto, conectado operativamente a una molécula de ADN que codifica 5-enol-piruvilshiquimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS) resistente a glifosato, conectado operativamente a una molécula de ADN que comprende un terminador de transcripción 3'.

20 Se divulgan además procedimientos para producir y seleccionar una planta de maíz tolerante a glifosato. El constructo de ADN consiste en dos casetes de expresión transgénica. El primer casete de expresión consiste en una molécula de ADN de un promotor de actina 1 de arroz (*Oryzae sativa*) y un intrón de actina 1 de arroz unido operativamente a una molécula de ADN que codifica una secuencia de un péptido de tránsito a cloroplasto EPSPS de *Arabidopsis*, conectada operativamente a una molécula de ADN que codifica 5-enol-piruvilshiquimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS) resistente a glifosato aislada de *Agrobacterium tumefaciens* sp, cepa CP4, conectada operativamente a una molécula de ADN que consiste en un terminador de transcripción de nopalina sintetasa. El segundo casete de expresión transgénica consiste en una molécula de ADN del promotor 35S del virus de mosaico de la coliflor (CaMV) que contiene una duplicación en tándem de la región potenciadora, conectada operativamente a una molécula de ADN que consiste en un intrón Hsp70 de *Zea mays*, conectado operativamente a una molécula de ADN que codifica una secuencia de un péptido de tránsito a cloroplasto EPSPS de *Arabidopsis*, conectada operativamente a una molécula de ADN que codifica una 5-enol-piruvilshiquimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS) resistente a glifosato aislada de *Agrobacterium tumefaciens* sp., cepa CP4, conectada operativamente a una molécula de ADN que consiste en un terminador de transcripción de nopalina sintetasa.

35 Es preferente que la planta, célula o semilla de maíz o progenie del mismo tolerante a glifosato comprenda incorporada en el genoma de las células de la planta la secuencia de unión de PV-ZMGT32 (nk603) seleccionada de entre 5' TG TAGCGGCCACGCGTGG3' (SEQ ID N°:9), 5' TACCACGCGACACTTC 3' (SEQ ID N°:10) y 5' TGCTGTTCTGCTGACTTT 3' (SEQ ID N°:11) y complementos de las mismas. La planta de maíz que tolera la aplicación de glifosato puede obtenerse mediante un procedimiento que comprenden las etapas de: (a) cruzar sexualmente una primera línea de maíz progenitora que comprende los casetes de expresión de la presente invención, que confieren tolerancia a la aplicación de glifosato, y una segunda línea de maíz progenitora que carece de tolerancia a glifosato, produciendo de esta manera una pluralidad de plantas de la progenie; y (b) seleccionar una planta de la progenie que tolera la aplicación de glifosato y comprende las moléculas de ácido nucleico marcadoras de las SEQ ID N°:9, SEQ ID N°:10, SEQ ID N°:11 o SEQ ID N°:12.

La presente invención proporciona además un procedimiento de cultivo de una planta de maíz que tolera la aplicación del herbicida glifosato que comprende:

(a) plantar al menos una semilla de maíz tal como se ha definido anteriormente;

45 (b) permitir que una planta de maíz crezca a partir de dicha semilla de maíz;

(c) pulverizar dicha planta de maíz con el herbicida glifosato de manera que dicha planta de maíz tenga una lesión vegetativa y una reducción del rendimiento reducidas en comparación con otras plantas de maíz que no comprenden las SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, SEQ ID N°: 11 y SEQ ID N°: 12.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

50 Las definiciones y los procedimientos siguientes se proporcionan para definir mejor la presente invención y para guiar a las personas con conocimientos ordinarios en la materia en la práctica de la misma. A menos que se indique lo contrario, los términos deben entenderse según el uso convencional por parte de las personas con conocimientos ordinarios en la materia relevante. Las definiciones de los términos comunes de biología molecular pueden consultarse también en Rigger et al., Glossary Genetics: Classical and Molecular, 5ª edición, Springer-Verlag; Nueva York, 1991; y Lewin, Genes V, Oxford University Press; Nueva York, 1994. Se usa la nomenclatura de las bases de ADN según la

norma 37 CFR § 1.822.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "maíz" significa *Zea mays* o maíz e incluye todas las variedades vegetales que puedan cultivarse con maíz, incluyendo especies de maíz salvaje.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "que comprende" significa "que incluye pero que no se limita a".

5 El término "glifosato" se refiere a N-fosfonometilglicina y sus sales. El glifosato es el ingrediente activo del herbicida Roundup® (Monsanto Co.). Los tratamientos con el "herbicida glifosato" se refieren a tratamientos con el herbicida Roundup®, Roundup Ultra®, Roundup UltraMax® o cualquier otra formulación herbicida que contenga glifosato. La selección de las dosis de aplicación para una formulación con glifosato, que constituya una dosis biológicamente efectiva está dentro de la capacidad de un técnico especialista en agronomía.

10 El constructo de ADN es un conjunto de moléculas de ADN unidas entre sí que proporcionan uno o varios casetes de expresión. El constructo de ADN es preferentemente un plásmido capaz de autorreplicarse en una célula bacteriana y contiene diversos sitios de restricción de enzimas endonucleasas que son útiles para introducir moléculas de ADN que proporcionan elementos genéticos funcionales, es decir, promotores, intrones, líderes, secuencias de codificación, regiones de terminación 3', entre otros. Los casetes de expresión contenidos dentro del constructo de ADN
15 comprenden los elementos genéticos necesarios para proporcionar la transcripción de un ARN mensajero. Los casetes de expresión pueden diseñarse para su expresión en células procariontas o células eucariotas. Los casetes de expresión de la presente invención están diseñados para una expresión preferencial en células vegetales. La combinación de casetes de expresión en plantas transgénicas puede conducir a fenotipos inesperados. En la presente invención, la combinación del casete del promotor de actina 1 de arroz y el casete del promotor 35S CaMV provistos en un constructo de ADN (pMON25496) mejoró la tolerancia al herbicida glifosato de las plantas de maíz transgénicas en comparación con los casetes individuales y con el estándar comercial GA21 que contiene tres copias de un casete del promotor de actina 1 de arroz.

Un "evento" transgénico se produce mediante la transformación de las células vegetales con el constructo de ADN heterólogo, que incluye un casete de expresión de ácido nucleico que comprende un transgén de interés, la
25 regeneración de una población de plantas resultantes de la inserción del transgén en el genoma de la planta y la selección de una planta particular caracterizada por la inserción en una ubicación genómica particular. El término "evento" se refiere al transformante original y a la progenie del transformante que contiene el ADN heterólogo. El término "evento" también se refiere a la progenie producida por cruzamiento sexual entre el transformante y otra variedad que incluye el ADN heterólogo. Incluso después de repetidos cruzamientos con un progenitor recurrente, el
30 ADN insertado y el ADN flanqueador del progenitor transformado están presentes en la progenie del cruzamiento en la misma ubicación cromosómica. El término "evento" se refiere también al ADN del transformante original que comprende el ADN insertado y la secuencia genómica flanqueadora inmediatamente adyacente al ADN insertado, que se esperaría que fuera transferido a la progenie que recibe al ADN insertado, incluyendo el transgén de interés, como resultado del cruzamiento sexual de una línea progenitora que incluye el ADN insertado (por ejemplo, el transformante original y la progenie resultante de un auto-cruzamiento) y una línea progenitora que no contiene el ADN insertado. Una planta de maíz PV-ZMGT32 (nk603) tolerante a glifosato puede ser generada mediante un primer cruzamiento sexual de una primera planta de maíz progenitora que consiste en una planta de maíz cultivada a partir de la planta de maíz PV-ZMGT32 (nk603) transgénica, con el N° Acceso ATCC: PTA-2478, y la progenie de la misma derivada de la transformación con los casetes de expresión de la presente invención que tolera la aplicación del herbicida glifosato, y una segunda planta de maíz progenitora que carece de tolerancia al herbicida glifosato, produciendo de esta manera una pluralidad de plantas de la primera progenie; y a continuación seleccionando una planta de la primera progenie que es tolerante a la aplicación del herbicida glifosato; y auto-cruzando dicha planta de la primera progenie, produciendo de esta manera una pluralidad de plantas de la segunda progenie, y a continuación seleccionando de entre las plantas de la segunda progenie una planta que sea tolerante al herbicida glifosato. Estas etapas pueden incluir además el retro-cruzamiento de la planta de la primera progenie tolerante a glifosato o la planta de la segunda progenie tolerante a glifosato con la segunda planta de maíz progenitora o con una tercera planta de maíz progenitora, produciendo de esta manera una planta de maíz que tolera la aplicación del herbicida glifosato.

Debe entenderse también que dos plantas transgénicas diferentes pueden ser apareadas para producir una descendencia que contenga dos genes exógenos añadidos de segregación independiente. El auto-cruzamiento de la
50 progenie apropiada permite obtener plantas que son homocigotas para ambos genes exógenos añadidos. También se contempla el retro-cruzamiento con una planta progenitora y el cruzamiento con una planta no transgénica, así como la propagación vegetativa. Las descripciones de otros procedimientos de cultivo usados habitualmente para diferentes características y cultivos pueden consultarse en una de entre diversas referencias, por ejemplo, Fehr, en *Breeding Methods for Cultivar Development*, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison WI (1987).

55 Una "sonda" es un ácido nucleico aislado al cual se une una marca o una molécula informante detectable convencional, por ejemplo, un isótopo radioactivo, un ligando, un agente quimioluminescente o una enzima. Dicha sonda es complementaria de una hebra del ácido nucleico de interés, en el caso de la presente invención, de una

hebra de ADN genómico del evento PV-ZMGT32 (nk603) de maíz, bien de una planta de maíz o bien de una muestra que incluye el ADN del evento. Las sondas según la presente invención no sólo incluyen ácido desoxirribonucleico o ribonucleico sino también poliamidas y otros materiales de sonda que se unen específicamente a una secuencia de ADN diana y que pueden ser usados para detectar la presencia de esa secuencia de ADN diana.

5 Los "cebadores" son ácidos nucleicos aislados que se alinean con una cadena de ADN diana complementaria mediante hibridación de ácido nucleico para formar un híbrido entre el cebador y la cadena de ADN diana, a continuación se extienden a lo largo de la cadena de ADN diana por acción de una polimerasa, por ejemplo, una ADN polimerasa. Los pares de cebadores de la presente invención están destinados a la amplificación de una secuencia de ácido nucleico de interés, por ejemplo, mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otros
10 procedimientos convencionales de amplificación de ácidos nucleicos.

Las sondas y los cebadores son de suficiente longitud de nucleótidos como para unirse específicamente a la secuencia de ADN diana en las condiciones de hibridación o las condiciones de reacción determinadas por el operador. Esta longitud puede ser cualquier longitud que sea suficiente para ser útil en el procedimiento de detección elegido. En general, se usan 11 nucleótidos o más de longitud, preferentemente 18 nucleótidos o más, más preferentemente 24
15 nucleótidos o más y más preferentemente 30 nucleótidos o más. Dichas sondas y cebadores se hibridizan específicamente con una secuencia diana bajo condiciones de hibridación de alta exigencia. Preferentemente, las sondas y los cebadores según la presente invención presentan una similitud de secuencia de ADN completa de nucleótidos contiguos con la secuencia diana, aunque es posible diseñar sondas que difieran de la secuencia de ADN diana y que retengan la capacidad de hibridarse con dicha secuencia de ADN diana mediante procedimientos
20 convencionales.

Los procedimientos para preparar y usar sondas y cebadores se describen, por ejemplo, en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., vol. 1-3, ed. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 (en adelante, "Sambrook et al., 1989"); *Current Protocols in Molecular Biology*, ed. Ausubel et al., Greene Publishing y Wiley-Interscience, Nueva York, 1992 (con actualizaciones periódicas) (en adelante, "Ausubel et al.,
25 1992"); e Innis et al., *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press; San Diego, 1990. Los pares de cebadores para PCR pueden derivarse de una secuencia conocida, por ejemplo, usando programas de ordenador destinados a tal fin, tal como Primer (Versión 0.5, © 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA).

Los cebadores y las sondas basados en el ADN flanqueador y las secuencias insertadas divulgados en la presente memoria pueden ser usados para confirmar (y, si es necesario, para corregir) las secuencias divulgadas mediante procedimientos convencionales, por ejemplo, mediante re-clonación y secuenciación de dichas secuencias.
30

Las sondas y los cebadores de ácidos nucleicos se hibridizan bajo condiciones estrictas a una secuencia de ADN diana. Puede usarse cualquier procedimiento de hibridación o amplificación de ácidos nucleicos convencional para identificar la presencia de ADN de un evento transgénico en una muestra. Las moléculas de ácido nucleico o los fragmentos de las mismas tienen la capacidad de hibridarse específicamente con otras moléculas de ácido nucleico bajo ciertas circunstancias. Tal como se usa en la presente memoria, se dice que dos moléculas de ácidos nucleicos tienen la capacidad de hibridarse específicamente entre sí, si las dos moléculas pueden formar una estructura de ácido nucleico de cadena doble, antiparalela. Se dice que una molécula de ácido nucleico es "complementaria" de otra molécula de ácido nucleico si presentan complementariedad completa. Tal como se usa en la presente memoria, se considera que unas moléculas presentan "complementariedad completa" cuando cada nucleótido de una de las moléculas es complementario de un nucleótido de la otra. Se dice que dos moléculas son "mínimamente complementarias" si se pueden hibridarse entre sí con suficiente estabilidad como para permanecer alineadas entre sí al menos bajo condiciones de "severidad baja" convencionales. De manera similar, se considera que las moléculas son "complementarias" si se hibridan entre sí con suficiente estabilidad como para permanecer alineadas entre sí
35 bajo condiciones de "severidad alta" convencionales. Las condiciones de severidad convencionales se describen en Sambrook et al., 1989, y en Haymes et al., *E: Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, DC (1985). Por lo tanto, las desviaciones de la complementariedad completa son permisibles, siempre que dichas desviaciones no impidan completamente la capacidad de las moléculas para formar una estructura de -cadena doble. Para que una molécula de ácido nucleico sirva como cebador o sonda solo es necesario que sea suficientemente complementaria en la secuencia como para formar una estructura de cadena doble estable bajo las concentraciones particulares de solvente y sales empleadas.
40
45
50

Tal como se usa en la presente memoria, una secuencia substancialmente homóloga es una molécula de ácido nucleico que se hibridará específicamente con el complemento de la molécula de ácido nucleico con la que está siendo comparada bajo condiciones de severidad alta. Las condiciones de severidad apropiadas que promueven la hibridación del ADN, por ejemplo, 6,0 x cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45°C, seguido de un lavado de 2,0 x SSC a 50°C, son conocidas para las personas con conocimientos ordinarios en la materia o pueden consultarse en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989). 6.3.1-6.3.6. Por ejemplo, la
55

concentración de sales en la etapa de lavado puede seleccionarse entre una severidad baja de aproximadamente 2,0 x SSC a 50°C y una severidad alta de aproximadamente 0,2 x SSC a 50°C. Además, la temperatura en la etapa de lavado puede ser incrementada desde condiciones de severidad baja a temperatura ambiente, aproximadamente 22°C, hasta condiciones de severidad alta a aproximadamente 65°C. Pueden variarse tanto la temperatura como las sales, o puede mantenerse constante una de entre la temperatura o la concentración de sales mientras se cambia la otra variable. En una realización preferente, un ácido nucleico de la presente invención se hibridizará específicamente con una o varias de las moléculas de ácido nucleico mostradas en las SEQ ID N°: 9, 10, 11 y 12, o sus complementos o fragmentos, bajo condiciones moderadamente estrictas, por ejemplo a aproximadamente 2,0 x SSC y aproximadamente 65°C. En una realización particularmente preferente, un ácido nucleico de la presente invención se hibridizará específicamente con una o varias de las moléculas de ácido nucleico mostradas en las SEQ ID N°: 9 a SEQ ID N°: 12, o sus complementos o fragmentos, bajo condiciones de severidad alta. En un aspecto de la presente invención, una molécula de ácido nucleico marcadora preferente de la presente invención presenta la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en las SEQ ID N°: 9 a SEQ ID N°: 12, o sus complementos o fragmentos. En otro aspecto de la presente invención, la molécula de ácido nucleico marcadora preferente de la presente invención comparte entre el 80% y el 100% o entre el 90% y el 100% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico mostrada en las SEQ ID N°: 9 a SEQ ID N°: 12, o sus complementos o fragmentos. En un aspecto adicional de la presente invención, una molécula de ácido nucleico marcadora preferente de la presente invención comparte entre el 95% y el 100% de identidad de secuencia con la secuencia mostrada en las SEQ ID N°: 9 a SEQ ID N°: 12, o sus complementos o fragmentos. Las SEQ ID N°: 9 a SEQ EN NO: 12 pueden ser usadas como marcadores en procedimientos de cultivo de plantas para identificar la progenie de los cruzamientos genéticos de manera similar a los procedimientos descritos para el análisis de marcadores de ADN de repeticiones de secuencia simple, en "DNA markers: Protocols, applications and overviews"; (1997) 171-185, Cregan, et al, eds., Wiley-Liss NY; todos los cuales se incorporan a la presente memoria en su totalidad, por referencia. La hibridación de la sonda a la molécula de ADN diana puede ser detectada mediante cualquier procedimiento conocido por las personas con conocimientos ordinarios en la materia, entre los que se incluyen, pero no se limitan a, marcas fluorescentes, marcas radioactivas, marcas basadas en anticuerpos y marcas quimioluminiscentes.

Con relación a la amplificación de la secuencia del ácido nucleico diana (por ejemplo mediante PCR) usando un par de cebadores de amplificación particulares, las "condiciones estrictas" son condiciones que permiten que el par de cebadores se hibriden solo con la secuencia de ácido nucleico diana a la que se uniría un cebador que tiene la secuencia de tipo salvaje correspondiente (o su complementaria) y para producir preferentemente un producto amplificación único, el amplicón, en una reacción de amplificación térmica de ADN.

La expresión "específico para (una secuencia diana)" indica que una sonda o un cebador se hibrida bajo condiciones de hibridación estrictas solo con la secuencia diana en una muestra que comprende la secuencia diana.

Tal como se usa en la presente memoria, el "ADN amplificado" o "amplicón" se refiere al producto de la amplificación del ácido nucleico de una secuencia de ácido nucleico diana que es parte de una plantilla de ácido nucleico. Por ejemplo, para determinar si la planta de maíz que resultante de un cruzamiento sexual contiene o no el ADN genómico del evento de transgénico de la planta de maíz de la presente invención, el ADN extraído de una muestra de tejido de la planta de maíz puede ser sometida a un procedimiento de amplificación de ácido nucleico usando un par de cebadores de ADN que incluye un primer cebador derivado de la secuencia flanqueadora en el genoma de la planta adyacente al sitio de inserción del ADN insertado heterólogo, y un segundo cebador derivado del ADN heterólogo insertado para producir un amplicón que es diagnóstico de la presencia del ADN del evento. El amplicón tiene una longitud y una secuencia que son también diagnósticos del evento. La longitud del amplicón puede variar en un intervalo comprendido entre la longitud combinada de los pares de cebadores más un par de bases nucleotídicas, preferentemente más aproximadamente cincuenta pares de bases nucleotídicas, más preferentemente más aproximadamente doscientos cincuenta pares de bases nucleotídicas y más preferentemente más aproximadamente cuatrocientos cincuenta pares de bases nucleotídicas. De manera alternativa, el par de cebadores puede ser derivado de las secuencias flanqueadoras a ambos lados del ADN insertado para producir un amplicón que incluya toda la secuencia de nucleótidos del inserto (por ejemplo, el fragmento de ADN MluI del constructo de expresión pMON25496, Figura 1, de aproximadamente 6706 pares de bases nucleotídicas). Un miembro del par de cebadores derivado de la secuencia genómica de la planta puede estar situado a una distancia de 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 los dímeros de cebadores que pueden formarse en la reacción de amplificación térmica de ADN.

La amplificación de ácido nucleico puede llevarse a cabo mediante cualquiera de los diversos procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos conocidos en el arte, incluyendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se conocen una gran variedad de procedimientos de amplificación en la técnica y se describen, entre otros, en las patentes US N°: 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. Se han desarrollado procedimientos de amplificación mediante PCR para amplificar hasta 22 kb de ADN genómico y hasta 42 kb de ADN de bacteriófagos (Cheng et al., Proc. Nati. Acad. Sci. EE.UU. 91:

5695-5699, 1994). Estos procedimientos, así como otros procedimientos conocidos en la técnica de amplificación de ADN, pueden ser empleados en la práctica de la presente invención. La secuencia del inserto de ADN heterólogo o la secuencia del ADN flanqueador del evento PV-ZMGT32 (nk603) de maíz pueden ser verificadas (y corregidas si es necesario) mediante amplificación de dichas secuencias a partir del ADN extraído de las semillas o plantas del depósito ATCC, N° Acceso PTA-2478, usando los cebadores de ADN derivados a partir de las secuencias provistas en la presente memoria, seguido de secuenciación de ADN estándar del amplicón de PCR a del ADN clonado.

El amplicón producido mediante estos procedimientos puede ser detectado mediante una pluralidad de técnicas. Uno de dichos procedimientos es el Análisis de Bits Genéticos (Nikiforov, et al., Nucleic Acid Res. 22: 4167-4175, 1994) en el que se diseña un oligonucleótido de ADN que se superpone tanto a la secuencia de ADN genómico flanqueador adyacente como a la secuencia de ADN insertada. El oligonucleótido es inmovilizado en los pocillos de una placa de micropocillos. Después de la PCR de la región de interés (usando un cebador en la secuencia insertada y uno en la secuencia genómica flanqueadora adyacente), puede hibridarse un producto de PCR de cadena simple al oligonucleótido inmovilizado y puede servir como una plantilla para una reacción de extensión de una sola base usando una ADN polimerasa y ddNTPs marcados específicos para la siguiente base esperada. La lectura puede estar basada en fluorescencia o en ELISA. Una señal indica la presencia de la secuencia del inserto/flanqueadora debida a una amplificación, hibridación y extensión de una sola base exitosas.

Otro procedimiento es la técnica de pirosecuenciación descrita por Winge (Innov. Phrma. Tech. 00: 18-24, 2000). En este procedimiento, se diseña un oligonucleótido que se superpone a la unión del ADN genómico adyacente y del ADN del inserto. El oligonucleótido se hibridiza con un producto de PCR de cadena simple de la región de interés (un cebador en la secuencia insertada y uno en la secuencia genómica flanqueadora) y se incuba en presencia de una ADN polimerasa, ATP, sulfurilasa, luciferasa, apirasa, adenosina 5' fosfosulfato y luciferina. Los dNTPs se añaden individualmente y la incorporación resulta en una señal luminosa que es medida. La señal luminosa indica la presencia de la secuencia del inserto transgénico/flanqueadora debido a una amplificación, hibridación y extensión de bases únicas o múltiples exitosas.

La polarización de fluorescencia descrita por Chen, et al. (Genome Res. 9: 492-498, 1999) es un procedimiento que puede ser usado para detectar el amplicón de la presente invención. En el uso de este procedimiento se diseña un oligonucleótido que se superpone a la unión del ADN genómico flanqueador y del ADN insertado. El oligonucleótido se hibrida con un producto de PCR de cadena simple de la región de interés (un cebador en la secuencia del ADN insertado y uno en la secuencia del ADN genómico flanqueador) y se incuba en presencia de una ADN polimerasa y un ddNTP marcado con fluorescencia. La extensión de una sola base resulta en la incorporación del ddNTP. La incorporación puede ser medida como un cambio en la polarización usando un fluorómetro. Un cambio en la polarización indica la presencia de la secuencia del inserto transgénico/flanqueadora debido a una amplificación, hibridación y extensión de una sola base exitosas.

Taqman® (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) se describe como un procedimiento para detectar y cuantificar la presencia de una secuencia de ADN y se comprende completamente en las instrucciones proporcionadas por el proveedor. Brevemente, se diseña una sonda de oligonucleótidos FRET que se superpone a la unión del ADN genómico flanqueador y del inserto. La sonda FRET y los cebadores para PCR (un cebador en la secuencia del ADN insertado y uno en la secuencia genómica flanqueadora) se ciclan en presencia de una ADN polimerasa termoestable y los dNTPs. La hibridación de la sonda FRET resulta en el clivaje y la liberación de la fracción fluorescente desde la fracción neutralizante sobre la sonda FRET. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia flanqueadora/inserto transgénico debido a una amplificación e hibridación exitosas.

Se han descrito marcadores moleculares para su uso en la detección de secuencias tal como se describe en Tyangi, et al. (Nature Biotech. 14: 303-109, 1996). Brevemente, se diseña una sonda de oligonucleótidos FRET que se superpone a la unión del ADN genómico flanqueador y del inserto. La estructura única de la sonda FRET resulta en que contiene una estructura secundaria que conserva las fracciones fluorescente y neutralizante en estrecha proximidad. La sonda FRET y los cebadores para PCR (un cebador en la secuencia de ADN del inserto y el otro en la secuencia genómica flanqueadora) se ciclan en presencia de una polimerasa termoestable y los dNTPs. Después de una amplificación mediante PCR exitosa, la hibridación de la sonda FRET con la secuencia diana resulta en la eliminación de la estructura secundaria de la sonda y la separación espacial de las fracciones fluorescente y neutralizante. Se obtiene una señal fluorescente. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia flanqueadora/inserto transgénico debida a una amplificación e hibridación exitosas.

Los ejemplos siguientes se incluyen para demostrar los ejemplos de ciertas realizaciones preferidas de la invención. Las personas con conocimientos en la materia deberían tener en cuenta que las técnicas divulgadas en los ejemplos siguientes representan enfoques que los inventores han encontrado que funcionan bien con la práctica de la invención y, de esta manera, puede considerarse que constituyen ejemplos de los modos preferentes para la práctica de la misma.

Ejemplos

Ejemplo 1

El evento transgénico de maíz PV-ZMGT32 (nk603) (en adelante denominado nk603) se generó mediante bombardeo con microproyectiles de embriones de maíz (Songstad et al., *In Vitro Cell Plant* 62: 179-183, 1996) usando un fragmento de ADN Mlul lineal derivado de pMON25406 (Figura 1). Este fragmento de ADN contiene dos casetes de expresión transgénicos que colectivamente confieren tolerancia a glifosato a la planta de maíz. El primer casete está compuesto de promotor de actina 1 y el intrón de arroz (P-Os.Act1 e I-Os.Act1, patente US N°: 3.641.876), conectados operativamente a un péptido de tránsito a cloroplasto EPSPS de *Arabidopsis* (TS-At.EPSPS:CTP2, Klee et al., *Mol. Gen. Genet.* 210: 47-442, 1987), conectado operativamente a una 5-enol-piruvilshiquimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS) tolerante a glifosato de *Agrobacterium sp.* cepa CP4 (AGRTU.aroA:CP4, patente US N°: 5.633.435) y conectada operativamente a un terminador de transcripción de nopalina sintetasa (T-AGRTU.nos, Fraley et al. *Proc. Nati. Acad. Sci. EE.UU.* 80: 4803-4807, 1983). El segundo casete de expresión transgénico consiste en el promotor 35S del virus de mosaico de la coliflor que contiene una duplicación en tándem de la región potenciadora (P-CaMV.35S, Kay et al. *Science* 236: 1299-1302, 1987; patente US N°: 5.164.316), conectado operativamente al intrón Hsp70 de *Zea mays* (I-ZM.Hsp70, patente US N°: 5.362.865), conectado operativamente a un péptido de tránsito a cloroplasto EPSPS de *Arabidopsis* (TSAAt.EPSPS:CTP2, Klee et al., *Mol. Gen. Genet.* 310: 47-442, 1987), conectado operativamente a una 5-enol-piruvilshiquimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS) tolerante a glifosato de *Agrobacterium sp.* cepa CP4 (AGRTU.aroA:CP4, patente US N°: 5.633.435) y conectada operativamente a un terminador de transcripción de nopalina sintetasa (T-AGRTU.nos, Fraley et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 80: 4803-4807, 1983). Después del bombardeo, se seleccionaron callos transgénicos tolerantes a glifosato sobre un medio que contenía glifosato 3 mM y a continuación se regeneraron las plantas. Se produjeron trescientas cuatro plantas a partir de 91 eventos transgénicos independientes, nk603 se seleccionó de esta población en base a una combinación superior de características, incluyendo tolerancia a glifosato, rendimiento agronómico e inserción transgénica única. Las evaluaciones en invernadero y en campo del evento nk603 y de la progenie derivada del mismo indicaron que esta inserción transgénica confiere una tolerancia que supera las especificaciones comerciales de tolerancia vegetativa y reproductora total a 340 g de glifosato/acre (840 g de glifosato/hectárea; 32 onzas Roundup Ultra/acre) cuando se aplica en las etapas de hojas V4 y V8.

Ejemplo 2

El evento nk603 de maíz tolerante a glifosato se comparó con el estándar comercial actual, GA21 (patente US N°: 6.040.497), con relación a la tolerancia por lesiones vegetativas y efecto del glifosato sobre el rendimiento. GA21 contiene al menos 3 casetes de expresión transgénicos dispuestos en tándem en el genoma del maíz del evento GA21 (SCP/GMO/232-Final European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General). El casete transgénico de GA21 consiste en un promotor de actina 1 y un intrón de arroz conectados a un péptido de tránsito a cloroplasto ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa, conectado a una EPSPS modificada de maíz resistente a glifosato y una región de terminación de transcripción 3' nopalina sintetasa. Las plantas nk603 y GA21 se plantaron en filas de lotes replicados. Los tratamientos fueron 1) sin rociar, 2) rociado con una dosis de 4,48 kg/hectárea (64 onzas/acre) de Roundup Ultra® en la etapa de hojas V4 y de nuevo con 4,48 kg/hectárea (64 onzas/acre) de Roundup Ultra® en la etapa de hojas V8; 3) rociado con una dosis de 6,72 kg/hectárea (96 onzas/acre) de Roundup Ultra® en la etapa de hojas V4 y de nuevo con 6,72 kg/hectárea (96 onzas/acre) de Roundup Ultra® en la etapa de hojas V8. La tolerancia vegetativa se midió como un porcentaje de daños vegetativos determinados por la cantidad de malformación en las hojas observada 10 días después del tratamiento con el herbicida en la etapa de hojas VB. El rendimiento de cada lote se midió en toneladas/hectárea (fanegas/acre) y se determinó el porcentaje de reducción del rendimiento para cada tratamiento con el herbicida con relación al tratamiento sin rociado. Los resultados mostrados en la Tabla 1 ilustran que nk603 presenta un menor porcentaje de nivel de daños vegetativos que las plantas GA21 y el porcentaje de reducción del rendimiento observado es también menor para el evento nk603. Se observó una baja incidencia de daños vegetativos en los lotes no rociados, esta observación es atribuible a diversos factores ambientales distintos de la exposición al herbicida glifosato. El casete de expresión doble de pMON25496 en nk603 se comparó con los daños vegetativos y la calificación de fertilidad de 3 eventos de maíz independientes obtenidos solo a partir de la expresión del gen de tolerancia a glifosato (AGRTU.aroA:CP4) dirigida por el promotor CaMV 35S. Se observó el casete de expresión doble confería un nivel más alto de tolerancia vegetativa y de tolerancia reproductiva que los tres eventos de maíz independientes (ev. 1, ev. 2 y ev. 3) que contenían solo el casete de expresión en el que la expresión del gen de tolerancia a glifosato era dirigido por el promotor CaMV.35S. Se observó un nivel más alto de tolerancia vegetativa a daños por el herbicida glifosato para nk603 más 3 eventos adicionales de maíz derivados de pMON25496 en comparación con el daño promedio de 6 eventos de maíz derivados de un constructo en el que la expresión del gen de tolerancia a glifosato era dirigida solamente por el promotor de actina y el intrón de arroz (P-Os.Act1/I-Os.Act1). Las plantas transformadas con el casete de expresión doble poseían un nivel más alto de tolerancia a daños vegetativos y de fertilidad debido al glifosato que las plantas derivadas de una transformación con los casetes de expresión individuales, esto resultó en una resistencia mejorada a la pérdida de rendimiento debida a la aplicación del herbicida glifosato. El constructo pMON25496 proporciona dos casetes de expresión vegetales en una única ubicación en nk603

que confiere un nivel más alto de tolerancia a glifosato que la inserción triple en tándem en el estándar comercial, GA-21.

Tabla 1. Tolerancia a glifosato de nk603 - Daños vegetativos, rendimiento y calificación de fertilidad

<u>Evento</u>	<u>Tratamiento</u>	<u>% daño vegetativo*</u>	<u>Rendimiento t/ha (fanegas/acre)</u>	<u>% red. rendimiento</u>
GA21	Sin rociado	0,3	8,92 (142,2)	
	1,81 kg (64 onzas) de RoundUp Ultra® en V4 seguido de 1,81kg (64 onzas) en V8	5,3	8,42 (134,1)	5,7
	2,72 kg (96 onzas) de RoundUp Ultra® en V4 seguido de 2,72 kg (96 onzas) en V8	8,3	8,10 (129,1)	9,2
nk603	Sin rociado	0,9	9,14 (145,6)	
	1,81 kg (64 onzas) de RoundUp Ultra® en V4 seguido de 1,81 kg (64 onzas) en V8	2,9	8,69 (138,5)	4,9
	2,72 kg (96 onzas) de RoundUp Ultra® en V4 seguido de 2,72 kg (96 onzas) en V8	4,7	8,79 (140,1)	3,8

	<u>Tratamiento</u>	<u>Calificación de fertilidad**</u>
nk603	1,81 kg (64 onzas) de RoundUp Ultra® en V8	4,5
CaMV.35S ev. 1	1,81 kg (64 onzas) de RoundUp Ultra® en V8	2,0
CaMV.35S ev. 2	1,81 kg (64 onzas) de RoundUp Ultra® en V8	2,2
CaMV.35S ev. 3	1,81 kg (64 onzas) de RoundUp Ultra® en V8	2,4

5

	<u>Tratamiento</u>	<u>% promedio de daño vegetativo*</u>
nk603 más 3 eventos pMON25496 adicionales	3,63 kg (128 onzas) de RoundUp Ultra® en V4 seguido de 128 onzas a V8	22,9
Seis eventos de casete P.Os.Act1 individuales	3,63 kg (128 onzas) de RoundUp Ultra® a V4 seguido de 128 onzas en V8	28,9

* Los daños vegetativos observados 10 días después del tratamiento en V8 son una medición tomada para evaluar los daños vegetativos como respuesta al tratamiento con glifosato. ** Calificación de fertilidad macho: 4-5 = completamente fértil; 3 = liberación de polen significativamente reducida; 0-3 = completamente estéril - altamente estéril, no adecuado para uso comercial.

10

Ejemplo 3

La correspondiente molécula de ADN flanqueador de nk603 se clonó usando adaptadores ligados y PCR anidado como se describe en el kit Genome Walker™ (N° catálogo K1807-1, CloneTech Laboratories, Inc, Palo Alto, CA). Primero, se purificó el ADN genómico del evento nk603 mediante el procedimiento de purificación CTAB (Rogers et al., Plant Mol. Biol. 5: 69-76. 1985). Se prepararon bibliotecas de ADN genómico para la amplificación según las instrucciones del proveedor (Genome Walker®, CloneTech Laboratories. Inc. Palo Alto. CA). En reacciones separadas,

15

se digirió el ADN genómico durante la noche a 37°C con las siguientes endonucleasas de restricción para extremos cohesivos: EcoRV, Seal, DrawI, PvuII y StuI (CloneTech Laboratories, Inc. Palo Alto, CA). Las mezclas de reacción se extrajeron con fenol:cloroformo, el ADN se precipitó mediante la adición de etanol a la fase acuosa, se peleteó mediante centrifugación, a continuación se resuspendió en tampón Tris-EDTA (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM).

5 Los fragmentos de ADN genómico de extremos cohesivos purificados se ligaron con los adaptadores Genome Walker™ según el protocolo del proveedor. Después de la ligación, cada reacción se trató con calor (70°C durante 5 min) para terminar la reacción y a continuación se diluyó 10 veces con tampón Tris-EDTA. A continuación, un µl de cada ligación respectiva se amplificó en una reacción de 50 µl que incluía 1 µl de la respectiva biblioteca ligada al adaptador, 1 µl de cebador adaptador Genome Walker™ 10 µM AP1 (5'GTATATCGACTCACTATAGGGC 3', SEQ ID N°: 1), 1 µl de oligonucleótido específico del transgén nk603 10 µM

10 (5' TGACGTATCAAAGTACCGACAAAACATCC 3' SEQ ID N°: 2), 1 µl de desoxirribonucleótidos 10 mM, 2,5 µl de dimetilsulfóxido, 5 µl de tampón para PCR 10X que contenía MgCl₂, 0,5 µl (2,5 unidades) de ADN polimerasa termoestable Ampliqaq (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) y H₂O hasta completar 50 µl. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador usando control de temperatura calculada y las siguientes condiciones de ciclado: 15 ciclo de 95°C durante 9 minutos; 7 ciclos de 94°C durante 2 segundos, 70°C durante 3 minutos; 36 ciclos de 94°C durante 2 segundos, 65°C durante 3 minutos; 1 ciclo de 65°C durante 4 minutos. Un µl de cada reacción primaria se diluyó 50 veces con agua y se amplificó en una reacción secundaria (1 µl de la reacción primaria diluida respectiva, 1 µl del cebador adaptador anidado Genome Walkern™ AP2 10 mM (5'ACTATAGGGCACGCGTGGT 3', SEQ ID N°: 3, suministrado por el proveedor), 1 µl de oligonucleótido anidado específico del transgén nk603 10 mM

20 (5' CTTTGTTTTATTTTGGACTATCCCGACTC 3', SEQ ID N°: 4), 1 µl de desoxirribonucleótidos 10 mM, 2,5 µl de dimetilsulfóxido, 5 µl de tampón para PCR 10X que contenía MgCl₂, 0,5 µl (2,5 unidades) de ADN polimerasa termoestable Ampliqaq (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) y H₂O hasta completar 50 µl con las siguientes condiciones de ciclado: 1 ciclo de 95°C durante 9 minutos; 5 ciclos de 94°C durante 2 segundos, 70°C durante 3 minutos; 24 ciclos de 94°C durante 2 segundos, 65°C durante 3 minutos; 1 ciclo de 65°C durante 4 minutos.

25 Los productos de la PCR, que representan las regiones 5' que abarcan la unión entre la inserción transgénica nk603 y el ADN vecino flanqueador de maíz se purificaron mediante electroforesis sobre gel de agarosa, seguido de purificación a partir de matriz de agarosa con el kit de extracción de gel QIAquick (N° catálogo 28704, Qiagen Inc., Valencia, CA) y clonación directa en el vector pGEM-T Easy (N° catálogo A1360, Promega, Madison, WI). La identidad de los productos clonados de la PCR y la relación con el fragmento Mlu I de pMON25496 se confirmó mediante análisis de secuencia de ADN (ABI Prism™ 377, PE Biosystems, Foster City, CA) y el software para análisis de secuencia DNASTAR, DNASTAR Inc., Madison, WI).

30 De manera similar, la secuencia de ADN flanqueadora 3' del nk603 de maíz se amplificó y clonó usando cebadores anidados específicos de gen, tales como la SEQ ID N°:5 (5' AGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGC 3') y la SEQ ID N°:6 (5' GCGGTGCATCTATGTTACTAGATCGGG 3') que se alinean con el terminador de transcripción T-AGRTU.nos. Hay dos terminadores de transcripción T-AGRTU.nos presentes en la inserción transgénica/genómica nk603, uno Interno en el constructo y uno en el extremo 3' del constructo adyacente al ADN genómico de maíz. Los productos de PCR producidos en esta reacción se secuenciaron y la secuencia de ADN que abarca la unión entre el transgén y la secuencia flanqueadora se distinguió de los productos del T-AGRTU.nos interno mediante comparación con las secuencias de los elementos genéticos conocidos del constructo pMON25496 descrito anteriormente.

40 Se determinó la secuencia del ADN de maíz que flanquea ambos lados de la inserción transgénica para nk603 mediante secuenciación de los productos de amplificación derivados de Genome Walker™ y alineación con una secuencia transgénica conocida. En el extremo 5' de la inserción transgénica, se determinó la secuencia de un segmento de 498 pb alrededor de la unión de la inserción (SEQ ID N°: 7). Este segmento consistía en 304 pares de base (pb) de la secuencia de ADN genómico flanqueador de maíz (nucleótidos 1-304 de la SEQ ID N°: 7), 45 pb de la secuencia de ADN del constructo pMON25496 (nucleótidos 305-349 de la SEQ ID N°: 7) y 149 pb de secuencia de ADN del extremo 5' de P-Os.Act1 (nucleótidos 350-498 de la SEQ ID N°: 7).

50 Se determinó la secuencia de ADN de un segmento de 1.183 pb alrededor de la unión de la inserción en 3' (SEQ ID N°: 8), que comienza con 164 pb del terminador de transcripción T-AGRTU.nos (nucleótidos 1-164 de la SEQ ID N°: 8), 217 pb de la secuencia de ADN del constructo pMON25496 (nucleótidos 165-381 de la SEQ ID N°: 8), 305 pb de los genes de plástidos de maíz, rps11 y rpoA (segmentos parciales de cada gen correspondientes a las bases 63-363 de Genbank, N° Acceso X07810, correspondientes a las bases 382-686 de la SEQ ID N°: 8) y la secuencia de ADN restante consistía en la secuencia de ADN genómico de maíz que flanqueaba el sitio de integración (correspondiente a las bases 687-1.183 de la SEQ ID N°: 8).

55 Las moléculas de ADN de la unión, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, SEQ ID N°: 11 y SEQ ID N°: 12 son moléculas de ADN nuevas en nk603 y son diagnósticos de las plantas de maíz nk603 y su progenie. Las moléculas de la unión en las SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10 y SEQ ID N°: 11 representan aproximadamente 9 nucleótidos a cada lado del sitio de inserción del fragmento de ADN transgénico y del ADN genómico de maíz. La SEQ ID N°: 9 se encuentra en las

5 posiciones de nucleótidos 296-314 de la SEQ ID N°: 7. Las secuencias de unión de las SEQ ID N°: 10 y 11 están ubicadas en las posiciones de nucleótidos 373-390 y 678-695, respectivamente, de la SEQ ID N°: 8 y representan una molécula de ADN de unión de la secuencia de ADN del constructo con la secuencia de ADN de plástido de maíz (SEQ ID N°: 10) y de la secuencia del constructo con la secuencia de ADN genómico de maíz (SEQ ID N°: 11). La SEQ ID N°: 12 está ubicada en las posiciones de nucleótidos 156-173 de la SEQ ID N°: 8 y representa una molécula de ADN nueva en nk603 ya que es una fusión de la secuencia del terminador T-AGRTU.nos con un fragmento invertido de la secuencia de ADN del promotor de actina de arroz.

Ejemplo 4

10 Se usan los pares de cebadores del evento de ADN para producir un amplicón diagnóstico de nk603. Estos pares de cebadores del evento incluyen, pero no se limitan a, las SEQ ID N°: 13 y SEQ ID N°: 14 para la molécula de ADN del amplicón en 5' y las SEQ ID N°: 15 y SEQ ID N°: 16 para la molécula de ADN del amplicón en 3'. Además de estos pares de cebadores, cualquier par de cebadores derivado de las SEQ ID N°: 7 y SEQ ID N°: 8 que, cuando se usa en una reacción de amplificación de ADN, produce un amplicón de ADN diagnóstico para nk603, constituye un aspecto de la presente invención. Las condiciones de amplificación para este análisis se ilustran en la Tabla 2 y en la Tabla 3 para la región de unión del inserto transgénico/genómica en 5'. Se aplica el mismo procedimiento para la amplificación de la molécula de ADN del amplicón en 3' usando moléculas de ADN cebadoras de las SEQ ID N°: 15 y SEQ ID N°: 16, sin embargo, la persona con conocimientos en la materia puede efectuar cualquier modificación de estos procedimientos que use moléculas de ADN, o complementos de las mismas, para producir una molécula de ADN amplicón de diagnóstico para nk603. Además, se incluye un par de cebadores de control (SEQ ID N°: 17 y 18) para la amplificación de un gen endógeno de maíz como estándar interno en las condiciones de reacción. El análisis de una muestra de extracto de ADN del tejido de una planta nk603 debería incluir un extracto de ADN de tejido de control positivo de nk603, un extracto de ADN de tejido de control negativo de una planta de maíz que no es nk603 y un control negativo que no contiene ningún extracto de ADN de maíz plantilla. Las personas con conocimientos en la materia de los procedimientos de amplificación de ADN pueden seleccionar moléculas de ADN cebadoras adicionales, de longitud suficiente, de entre las SEQ ID N°: 7 y SEQ ID N°: 8 y las condiciones optimizadas para la producción de un amplicón que pueden diferir de los procedimientos mostrados en la Tabla 2 y Tabla 3 pero que resultan en un amplicón diagnóstico de nk603. El uso de estas secuencias de ADN cebadoras con las modificaciones de los procedimientos de la Tabla 2 y 3 se encuentra dentro del alcance de la invención. Un amplicón en el que al menos una molécula de ADN cebadora de longitud suficiente derivada de las SEQ ID N°: 7 y SEQ ID N°: 8 que sea diagnóstico para nk603 constituye un aspecto de la invención. Un amplicón en el cual por lo menos un ADN cebador de longitud suficiente derivado de cualquiera de los elementos genéticos de pMON25496 que sea diagnóstico para nk603 constituye un aspecto de la invención. El ensayo para el amplicón nk603 puede llevarse a cabo usando un equipo termociclador Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700, o Eppendorf Mastercycler Gradient, tal como se muestra en la Tabla 3, o mediante procedimientos y aparatos conocidos por las personas con conocimientos en la materia.

35 **Tabla 2.** Procedimiento de PCR y mezcla de reacción para la confirmación de la región de unión del inserto transgénico/genómico en 5' del nk603.

Etapa	Reactivo	Cantidad	Comentarios
1	Agua libre de nucleasas	añadir a un volumen final de 20 µl	-
2	10x Tampón de reacción (con MgCl ₂)	2,0 µl	Concentración final 1x de tampón, concentración final de MgCl ₂ 1,5 mM
3	Solución 10 mM de dATP, dCTP, dGTP y dTTP	0,4 µl	Concentración final de cada dNTP 200 µM
4	Cebador de evento (SEQ ID N°:13) (resuspendido en 1x tampón TE o agua libre de nucleasas a una concentración de 10 µM)	0,4 µl	Concentración final 0,2 µM
5	Cebador de evento (SEQ ID N°:14) (resuspendido en 1x tampón TE o agua libre de nucleasas a una concentración de 10 µM)	0,4 µl	Concentración final 0,2 µM

(Cont.)

6	Cebador de evento (SEQ ID N°:17) (resuspendido en 1x tampón TE o agua libre de nucleasas a una concentración de 10 µM)	0,2 µl	Concentración final 0,1 µM
7	Cebador de evento (SEQ ID N°:18) (resuspendido en 1x tampón TE o agua libre de nucleasas a una concentración de 10 µM)	0,2 µl	Concentración final 0,1 µM
8	Libre de RNasa, DNasa (500 ng/µl)	0,1 µl	50 ng/reacción
9	ADN polimerasa REDTaq (1 unidad/µl)	1,0 µl (se recomienda cambiar las pipetas antes de la etapa siguiente)	1 unidad/reacción
10	ADN extraído (plantilla): <ul style="list-style-type: none"> • Muestras a analizar *hojas individuales *hojas agrupadas (máx. 50 hojas/grupo) • Control negativo • Control negativo • Control positivo 	<ul style="list-style-type: none"> • 10-200 ng de ADN genómico • 200 ng de ADN genómico • 50 ng de ADN genómico de maíz (no nk603) • sin plantilla ADN • 50 ng de ADN genómico nk603 	-

Tabla 3. Parámetros sugeridos para la PCR con diferentes termocicladores

Mezclar suavemente y, si es necesario (en ausencia de la tapa termostatizada sobre el termociclador), añadir 1-2 gotas de aceite mineral sobre cada reacción. Continuar con la PCR en un termociclador Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700 o Eppendorf Mastercycler Gradient usando los siguientes parámetros de ciclado.

Nota: El termociclador MJ Engine o Eppendorf Mastercycler Gradient debería ejecutarse en el modo calculado. El termociclador Perkin-Elmer 9700 se debe ejecutar con la velocidad de rampa establecida al máximo.

Nº de ciclo	Ajustes: Stratagene Robocycler
1	94°C 3 minutos
38	94°C 1 minuto 60°C 1 minuto 72°C 1 minuto y 30 segundos
1	72°C 10 minutos

(Cont.)

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

5 La empresa Monsanto Company ha realizado un depósito de semillas de maíz del evento PV-ZMGT32 (nk603) divulgado anteriormente bajo el Tratado de Budapest con la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110. El N° de Acceso ATCC es PTA-2478. El depósito permanecerá en la entidad depositaria durante el plazo más largo de entre un período de 30 años o 5 años después de la última solicitud o el tiempo de vigencia de la patente, y será reemplazado según sea necesario durante ese período.

Listado de secuencias

- 10 <110> Monsanto Technology LLC
- <120> Evento de maiz PV-ZMGT32(nk603) y composiciones y procedimientos
- <130> 38-21(52258)D
- 15 <140> EP 01202314.9
- <141> 2001-06-15
- 20 <160> 16
- <170> PatentIn version 3.0
- <210> 1
- 25 <211> 22
- <212> DNA
- <213> Secuencia artificial
- 30 <220>
- <221> características_diversas
- <222> (1)..(22)

<223> ADN completamente sintético
 <400> 1
 gtatatcgac tcaactatagg gc 22
 <210> 2
 5 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> características_diversas
 10 <222> (1)..(30)
 <223> ADN completamente sintético
 <400> 2
 tgacgtatca aagtaccgac aaaaacatcc 30
 <210> 3
 15 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> características_diversas
 20 <222> (1)..(19)
 <223> ADN completamente sintético
 <400> 3
 actatagggc acgctggt 19
 <210> 4
 25 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> características_diversas
 30 <222> (1)..(29)
 <223> ADN completamente sintético
 <400> 4
 cttgtttta ttttgacta tcccgactc 29
 <210> 5
 35 <211> 26

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> características_diversas
 5 <222> (1)..(26)
 <223> ADN completamente sintético
 <400> 5
 agattgaatc ctgtgccgg tcttgc 26
 <210> 6
 10 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> características_diversas
 15 <222> (1)..(28)
 <223> ADN completamente sintético
 <400> 6
 gcggtgcat ctatgttact agatcggg 28
 <210> 7
 20 <211> 498
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> características_diversas
 25 <222> (1)..(498)
 <223> ADN quimérico de Zea mays ADN genómico y promotor de Act1 Oryzae sativa DN
 <400> 7
 aatcgatcca aaatcgcgac tgaaatggtg gaagaaagag agaacagaga gcctcacgtt 60
 tccagggtga agtatcagag gatttacgcg ccatgccttt tatggagaca agaaggggag 120
 gaggtaaaca gatcagcatc agcgcctcgaa agtttcgtca aaggatgcgg aactgtttcc 180
 30 agccgcgctc gccattcggc cagactcctc ctctctcggc atgagccgat cttttctctg 240
 gcatttccaa ccctagagac gtgcgtccct ggtgggctgc tcggccagca agccttgtag 300
 cggcccacgc gtggtaccaa gcttgatata cctagggcgg ccgcgttaac aagcttactc 360
 gaggtcattc atatgcttga gaagagagtc gggatagtcc aaaataaaac aaaggtaaga 420
 ttaccgggtca aaagtgaaaa catcagttaa aaggtgtata aagtaaaata tcggtaataa 480
 35 aaggtggccc aaagtgaa 498

ES 2 564 464 T3

<210> 8

<211> 1183

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<221> características_diversas

<222> (1)..(1183)

<223> ADN quimérico de región de terminación de Agrobacterium tumefaciens nos y ADN plástido de Zea mays y ADN genómico de Zea mays

10 <400> 8

gacggtatatt atgagatggg tttttatgat tagagtcccg caattataca ttttaatacgc 60

gatagaaaaac aaaatatagc gcgcaaaacta ggataaatta tcgcgcgcgcg tgatcatctat 120

gttactagat cgggggatatc cccgggggaat tcggtaccaa gctttttataa tagtagaaaa 180

15 gagtaaattt cactttgggc caccttttat taccgatatt ttactttata ccacctttta 240

actgatgttt tcaacttttga ccaggtaatc ttacctttgt tttattttgg actatcccga 300

ctctcttctc aagcatatga atgacctcga gtaagcttgt taacgcgggc gccctagggg 360

tatcaagctt ggtaccacgc gacacacttc cactctagtg tttgagtgga tctgtttatc 420

20 tcttctcgaa ccataacaga ctagtattat ttgatcattg aatcgtttat ttctcttgaa 480

agcggtttca ttttttttta cagacgtctt tttttaggag gtcgacatcc attatgcggc 540

ataggtgtta catcgcgat acaacttaac cgtacaccac ttttagcaat ggctcgtaat 600

gcggcacctc ttcogctacc agcacctttt accataactt ctgctcgttg caaacccaact 660

25 gtacgaatag catctactgc tgttctgctg actttatttt ttttaataaa gtgaaaaacc 720

ataaaatgga caacaacacc ctgccttca ctaccggtcg gagcgacgcc gaagatgggg 780

ttcaacacgg tcgogacacg gatgcaacgg accctccaag ccaatactcg aggccggacc 840

gacgacgtag gcaggggtgg ccataacgac ggtggcggca tccaacttgt tctttccctt 900

30 tctctgtctt caacttgccg cggcagtctg ctagaccag gggatgctgt gtggaggaga 960

ggctcgcgggg ccogattttt atagcctggg cgaggacgag cttggccgaa ccgatccaga 1020

gctctgcgca aatcacgaag aaccagtggg gccgctcggc cctagcccac cgccaggagc 1080

ggggcttgtt gcgagccgta gcgtcgggaa ggggacgacc cgctaggggg gcccatgctc 1140

35 cagcgcccag agagaaaaaa agaaaggaag gcgcgagatg atg 1183

<210> 9

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <221> características_diversas

<222> (1)..(19)

<223> ADN quimérico de Zea mays ADN genómico y ADN de inserto transgénico

<400> 9

tgtagcggcc cacgcgtgg 19

10 <210> 10

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <221> características_diversas

<222> (1)..(18)

<223> ADN quimérico de ADN de inserto transgénico y ADN plástido de Zea mays

<400> 10

taccacgcca cacacttc 18

20 <210> 11

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <221> características_diversas

<222> (1)..(18)

<223> ADN quimérico de Zea mays ADN plástido y ADN de inserto transgénico

<400> 11

tgctgttctg ctgacttt 18

30 <210> 12

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <221> características_diversas

ES 2 564 464 T3

<222> (1)..(18)

<223> ADN quimérico of Agrobacterium tumefaciens nos ADN de región de terminación y ADN de promotor Act1 de Oryzae sativa

<400> 12

5 accaagcttt tataatag 18

<210> 13

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<221> características_diversas

<222> (1)..(22)

<223> ADN completamente sintético

<400> 13

15 aatcgatcca aaatcgcgac tg 22

<210> 14

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<221> características_diversas

<222> (1)..(22)

<223> ADN completamente sintético

<400> 14

25 ttcaacttgg gccaccttt at 22

<210> 15

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<221> características_diversas

<222> (1)..(22)

<223> ADN completamente sintético

35 <400> 15

gacgttatt atgagatggg tt 22

<210> 16

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<221> características_diversas

<222> (1)..(22)

<223> ADN completamente sintético

<400> 16

10 catcatctcg cgccttcctt tc

22

REIVINDICACIONES

1. Una planta, célula, semilla de maíz o progenie de la misma tolerante a glifosato, que comprende:

5 un constructo de ADN que comprende: un primer y un segundo casete de expresión, en el que dicho primer casete de expresión comprende, en una unión operativa, (i) un promotor de actina 1 de arroz; (ii) un intrón de actina 1 de arroz; (iii) una molécula de ADN que codifica un péptido de tránsito a cloroplasto; (iv) una molécula de ADN que codifica EPSPS tolerante a glifosato; y (v) una molécula de ADN terminadora de transcripción; y en el que dicho segundo casete de expresión comprende, en una unión operativa, (a) un promotor 35S CaMV; (b) un intrón Hsp70; (c) una molécula de ADN que codifica un péptido de tránsito a cloroplasto; (d) una molécula de ADN que codifica EPSPS resistente a glifosato; (e) una molécula de ADN terminadora de transcripción,

10 en la que la secuencia de superposición de la unión entre el ADN genómico de maíz y el flanco 5' del constructo comprende la SEQ ID N°: 9 y la unión de solapamiento entre el ADN genómico de maíz y el flanco 3' del constructo comprende la SEQ ID N°: 11, y en el que el constructo de ADN está presente en el evento de maíz ZMGT32 (nk603) depositado en la American Type Culture Collection (ATCC) N° de Acceso PTA-2478.

15 2. Planta, célula, semilla de maíz o progenie de la misma tolerante a glifosato, que comprende incorporado en el genoma de la célula vegetal el constructo de ADN según la reivindicación 1 y ADN que tienen secuencias de nucleótidos de las SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, SEQ ID N°: 11 y SEQ ID N°: 12.

3. Célula de planta de maíz tolerante a glifosato según la reivindicación 1 o 2, que es capaz de producir un amplicón de diagnóstico de evento ZMGT32 (nk603).

20 4. Célula de planta de maíz tolerante a glifosato según la reivindicación 3, en la que dicho amplicón de diagnóstico se hibrida bajo condiciones rigurosas con las SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, SEQ ID N°: 11 o SEQ ID N°: 12.

5. Semilla de maíz tolerante a glifosato según la reivindicación 1 o 2, que es capaz de producir un amplicón de diagnóstico de evento ZMGT32 (nk603).

6. Semilla de maíz tolerante a glifosato según la reivindicación 5, en la que dicho amplicón de diagnóstico se hibrida bajo condiciones rigurosas con las SEQ ID N°: 8, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, SEQ ID N°: 11 o SEQ ID N°: 12.

25 7. Semilla de maíz tolerante a glifosato según la reivindicación 5, que comprende la célula de la planta de maíz según la reivindicación 3 o 4.

8. Planta de maíz tolerante a glifosato según la reivindicación 1 o 2, que es capaz de producir un amplicón de diagnóstico de evento ZMGT32 (nk603).

30 9. Planta de maíz tolerante a glifosato según la reivindicación 8, en la que dicho amplicón de diagnóstico se hibrida bajo condiciones rigurosas con las SEQ ID N°: 8, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, SEQ ID N°: 11, o SEQ ID N°: 12.

10. Planta de maíz tolerante a glifosato según la reivindicación 8, que comprende la célula de planta según la reivindicación 3 o 4.

11. Planta de maíz tolerante a glifosato según la reivindicación 1, que puede obtenerse mediante un procedimiento que comprende:

35 (a) cruzar una planta de maíz resistente al glifosato según la reivindicación 2 con otra planta de maíz;

(b) obtener al menos una planta progenie derivada del cruzamiento de (a); y

(c) seleccionar la progenie que es tolerante a glifosato y que comprende las regiones de unión de las SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, SEQ ID N°: 11 y SEQ ID N°: 12.

12. Un procedimiento de cultivo de una planta de maíz que tolera la aplicación del herbicida glifosato que comprende:

40 (a) plantar al menos una semilla de maíz según la reivindicación 2;

(b) permitir que una planta de maíz crezca a partir de dicha semilla de maíz;

(c) pulverizar dicha planta de maíz con herbicida glifosato, de manera que dicha planta de maíz tenga un daño vegetativo y una reducción del rendimiento reducidos en comparación con otras plantas de maíz que no comprenden las SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, SEQ ID N°: 11 y SEQ ID N°: 12.

45

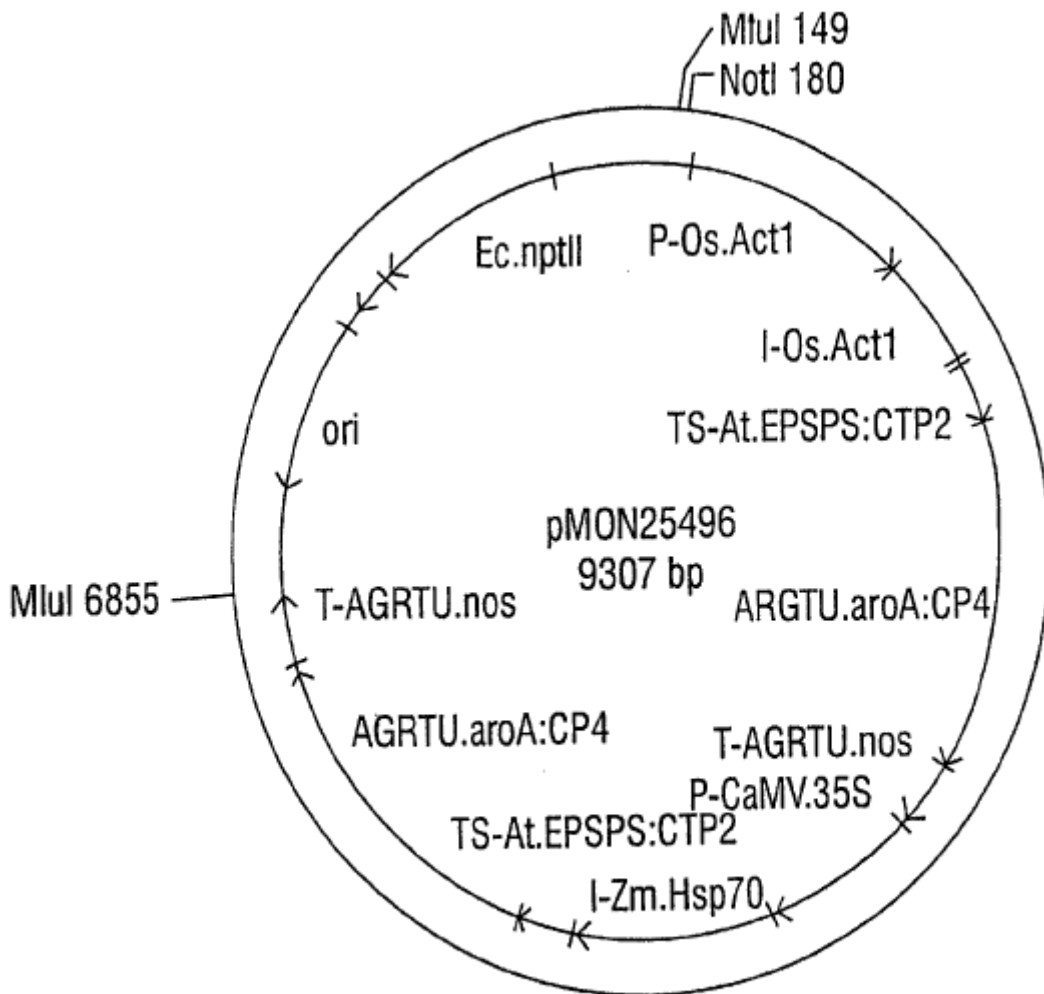


FIG. 1