

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 586 380**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/02** (2006.01)

**C12N 15/82** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.08.2010 E 10810539 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.06.2016 EP 2467500**

54 Título: **Detección del evento de AAD-1 DAS 40278-9**

30 Prioridad:

**19.08.2009 US 235248 P**  
**23.04.2010 US 327366 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**14.10.2016**

73 Titular/es:

**DOW AGROSCIENCES, LLC (100.0%)**  
**9330 Zionsville Road**  
**Indianapolis, Indiana 46268, US**

72 Inventor/es:

**CUI, YUNXING, CORY;**  
**GREENE, THOMAS, WILLIAM;**  
**NOVAK, STEPHEN y**  
**ZHOU, NING**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 586 380 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

Detección del evento de AAD-1 DAS 40278-9

## Antecedentes de la invención

5 El gen *aad-1* (originalmente de *Sphingobium herbicidovorans*) codifica la proteína ariloxialcanoato dioxigenasa (AAD-1). El rasgo confiere tolerancia a los herbicidas ácido 2,4-diclorofenoxiacético y ariloxifenoxipropionato (referidos comúnmente como herbicidas “fop” tales como diclofop y quizafop) y puede ser utilizado como un marcador de selección durante la transformación de plantas y en viveros de mejora vegetal. El gen *aad-1*, por sí solo, fue descrito para la tolerancia a herbicidas en plantas por primera vez en WO 2005/107437 (ver también US 2009-0093366).

10 Se conocen varios métodos de detección de eventos. Sin embargo, cada uno de ellos tiene problemas. Un método es la técnica de Pirosecuenciación tal como la describe Winge (Innov. Pharma. Tech. 00:18-24, 2000). En este método se diseña un oligonucleótido que solapa con la unión entre el ADN genómico adyacente y el ADN del inserto. El oligonucleótido se hibrida 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 flanqueante) y es incubado en presencia de ADN polimerasa, ATP, sulfúrico, luciferasa, apirasa, adenina 5' fosfosulfato y luciferina. Los dNTPs son añadidos individualmente y su incorporación resulta en una señal luminosa que es medida. La señal luminosa indica la presencia de la secuencia inserto transgénico/región flanqueante debido a la amplificación, hibridación y extensión con éxito de una o varias bases.

20 La Polarización Fluorescente es otro método que puede ser utilizado para detectar un amplicón de la presente invención. Siguiendo este método, se diseña un oligonucleótido que solapa la unión entre el ADN genómico flanqueante y el inserto. El oligonucleótido se hibrida con un producto de PCR de cadena simple de la región de interés (un cebador en el ADN insertado y uno en la secuencia de ADN genómico flanqueante) y se incuba en presencia de ADN polimerasa y ddNTPs marcados con fluorescencia. La extensión de una base da como resultado incorporación del ddNTP. La incorporación puede ser medida como un cambio en la polarización utilizando un fluorímetro. Un cambio en la polarización indica la presencia de la secuencia inserto transgénico/región flanqueante debido a la amplificación, hibridación y extensión con éxito de una base.

30 Se ha descrito el uso de Balizas Moleculares para la detección de secuencias. Brevemente, se diseña un oligonucleótido sonda FRET que solapa la unión entre el ADN genómico flanqueante y el inserto. La estructura única de la sonda FRET conlleva una estructura secundaria que mantiene las fracciones fluorescente y desactivadora de fluorescencia en estrecha cercanía. La sonda FRET y los cebadores de la PCR (un cebador en la secuencia de ADN del inserto y uno en la secuencia genómica flanqueante) son sometidos a un programa cíclico en presencia de polimerasa termoestable y dNTPs. Tras una exitosa amplificación mediante PCR, la hibridación de la sonda FRET con la secuencia objetivo da como resultado la eliminación de la estructura secundaria de la sonda y la separación espacial de las fracciones fluorescente y desactivadora de fluorescencia. El resultado es una señal fluorescente. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia región genómica flanqueante/inserto transgénico debido a una amplificación e hibridación exitosas.

40 El ensayo de sondas de hidrólisis, también conocido como TaqMan (PE Applied Biosystems, Foster City, Calif.), es un método para detectar y cuantificar la presencia de una secuencia de ADN. Brevemente, se diseña un oligonucleótido sonda FRET que solapa la unión entre el ADN genómico flanqueante y el inserto. La sonda FRET y los cebadores de la PCR (un cebador en la secuencia de ADN del inserto y uno en la secuencia genómica flanqueante) son sometidos a un programa cíclico en presencia de polimerasa termoestable y dNTPs. Durante la amplificación específica, la ADN polimerasa Taq limpia y libera la fracción fluorescente de la fracción inhibidora de la fluorescencia en la sonda FRET. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia región genómica flanqueante/inserto transgénico debido a una amplificación e hibridación exitosas.

45 Otro reto, entre muchos, es encontrar un gen de referencia adecuado para cada prueba. Por ejemplo, tal y como se declara en el resumen de Czechowski *et al.*, “Una colección excepcionalmente grande de datos procedentes de estudios de genoma completo utilizando Affymetrix ATH1 GeneChip aportó los medios para la identificación de una nueva generación de genes de referencia con unos niveles de expresión muy estables en la especie modelo para plantas *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*). Cientos de genes de *Arabidopsis* superaron a genes de referencia tradicionales en términos de estabilidad de expresión a lo largo del desarrollo y bajo una gran variedad de condiciones ambientales.” (Czechowski *et al.* (2005) Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 139, 5-17.)

55 Brodmann *et al.* (2002) se refiere a la detección mediante PCR cuantitativa en tiempo real del contenido de maíz transgénico en comida para cuatro variedades diferentes de maíz aprobadas en la Unión Europea. Brodmann, P.D., P.D., Ilg E.C., Berthoud H., y Herrmann, A. Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction Methods for Four Genetically Modified Maize Varieties and Maize DNA Content in Food. *J. of AOAC international* 2002 85 (3)

Hernandez *et al.* (2004) menciona cuatro posibles genes para su uso en PCR en tiempo real. Hernandez, M., Duplan, M.-N., Berthier, G., Vaitilingom, M., Hauser, W., Freyer, R., Pla, M., y Bertheau, Y. *Development and*

comparison of four real-time polymerase chain reaction systems for specific detection and quantification of *Zea mays* L. J. Agric. Food Chem. 2004, 52, 4632-4637.

5 Costa *et al.* (2007) miró esos cuatro genes (también en el contexto de PCR en tiempo real) y concluyó que los genes alcohol deshidrogenasa y zein eran los mejores genes de referencia para la detección de un "evento" de muestra (un gen de la lectina) en problemas de contaminación de alimentos transgénicos. Costa, L.D., y Martinelli L. Development of a Real-Time PCR Method Based on Duplo Target Plasmids for Determining an Unexpected Genetically Modified Soybean Intermix with Feed Components. J. Agric, Food Chem. 2007, 55, 1264-1273.

10 Huang *et al.* (2004) usó el plásmido pMulM2 como molécula de referencia para la detección de los transgenes MON810 y NK603 en maíz. Huang y Pan, "Detection of Genetically Modified Maize MON819 and NK603 by Multiplex and Real-Time Polymerase Chain Reaction Methods," J. Agric. Food Chem., 2004, 52(11), pp3264-3268.

Gasparic *et al.* (2008) sugiere la tecnología LNA, a partir de una comparación con tecnología de sondas cíclicas, TaqMan, y varias químicas de PCR en tiempo real, para analizar cuantitativamente eventos en maíz (como MON810). Gašparič, Cankar, Žel, y Gruden, "Comparison of different real-time PCR chemistries and their suitability for detection and quantification of genetically modified organisms," BMC Biotechnol. 2008; 8:26.

15 US 20070148646 se refiere a un método de extensión de cebadores para la cuantificación que requiere la dispensación controlada de nucleótidos individuales que pueden ser detectados y cuantificados por la cantidad de nucleótidos incorporados. Esto es diferente al método de PCR TaqMan que utiliza un gen de referencia interno.

20 Se ha utilizado con éxito un ensayo Invader para distinguir entre genotipos homocigotos y heterocigotos en el evento TC1507. Gupta, M., Nirunskisiri, W., Schulenberg, G., Hartl, T., Novat, S., Bryan, J., Vanopdorp, N., Bing, J. y Thompson, S. A non-PCR-based Invader Assay Quantitatively Detects Single-Copy Genes in Complex Plant Genomes. Mol. Breeding 2008, 21, 173-181.

Huabang (2009) se refiere a un método de análisis de cigosidad basado en PCR en maíz transgénico. Sin embargo, parece que no se han usado genes de referencia. Huabang, "An Accurate and Rapid PCR-Based Zygosity Testing Method for Genetically Modified Maize," Molecular Plant Breeding, 2009, Vol.7 No.3, 619-623.

25 **Compendio de la invención**

La presente invención proporciona ensayos para detectar la presencia del evento de AAD-1 de maíz denominado DAS-40278-9 (que tiene semillas depositadas en la American Type Culture Collection (ATCC) con el número de orden PTA-10244) en una muestra (de granos de maíz, por ejemplo). También se proporcionan los kits y las condiciones útiles para llevar a cabo los ensayos.

30 Más específicamente, la presente invención se refiere parcialmente a ensayos de PCR TaqMan para el evento AAD-1 en maíz utilizando el gen endógeno de referencia de maíz invertasa. Algunas realizaciones están dirigidas a ensayos capaces de realizar análisis de cigosidad de alto rendimiento. La presente invención también se refiere, en parte, al descubrimiento de un gen invertasa de referencia para su uso preferente en la determinación de la cigosidad.

35 Por consiguiente, esta invención también se refiere en parte a la incorporación en mejora vegetal de cualquiera de los presentes métodos de detección. En algunas realizaciones, dicho evento puede "apilarse" con otros rasgos, incluyendo, por ejemplo, otros genes de tolerancia a herbicidas y/o proteínas inhibitoras de insectos. Los presentes procedimientos pueden ser utilizados para identificar unívocamente líneas de maíz que comprenden el evento de la presente invención.

40 **Descripción de las figuras**

La Figura 1 muestra una Estrategia de clonación para el Inserto de ADN en el Evento de Maíz DAS-70278-9.

45 La Figura 2 es un diagrama de los Cebadores Utilizados en la Amplificación mediante PCR para la Confirmación de las Regiones Límitrofes Flanqueantes del Evento de Maíz DAS-40278-9. El diagrama esquemático representa las posiciones de los cebadores para la confirmación de la secuenciación completa del evento de AAD-1 de maíz DAS-40278-9 desde los bordes 5' y 3'.

La Figura 3 muestra una Estrategia de clonación para las Secuencias Límitrofes flanqueantes del evento de maíz DAS-40278-9. ADN genómico del evento de maíz DAS-40278-9 fue digerido con *EcoRV*, *StuI*, o *Scal* y se generaron las correspondientes genotecas GenomeWalker™, que fueron utilizadas como moldes para la amplificación de las secuencias de ADN objetivo.

50 **Descripción de las secuencias**

SEQ ID NO: 1 proporciona una secuencia de las secuencias genómicas flanqueantes 5' y 3' a cada lado del inserto AAD-1, incluyendo el inserto, para el evento de maíz DAS-40278-9.

SEQ ID NOs: 2-7 son los cebadores y sondas utilizadas según la presente invención.

SEQ ID NO: 8 es el amplicón del evento ejemplificado.

SEQ ID NO: 9 es el amplicón de referencia ejemplificado.

### Descripción detallada de la invención

- 5 Maíz transgénico con el evento de AAD-1 DAS-40278-9 (que confiere tolerancia a herbicidas) fue generado a través de transformación mediada por Whisker. Ambas secuencias flanqueantes 5' y 3' del inserto transgénico AAD-1 fueron clonadas, secuenciadas, y caracterizadas tal y como se detalla en USSN 61/125.248 (presentada el 15 de Agosto de 2009).
- 10 Los cebadores y una sonda específicos para TaqMan fueron diseñados, tal como se detalla en la presente memoria, parcialmente a partir de las secuencias de ADN localizadas en la unión 5' entre el inserto y la planta. La especificidad de los cebadores y la sonda para el evento fue analizada exitosamente en formato dúplex con la invertasa de maíz como gen de referencia mediante PCR en tiempo real contra 16 eventos de AAD-1 de maíz diferentes y dos variedades no transgénicas de maíz. Se desarrollaron los protocolos para los ensayos TaqMan específicos del evento de AAD-1 de maíz DAS-40278-9, tal y como se detalla en la presente memoria.
- 15 La presente solicitud describe los ensayos para detectar la presencia del evento de maíz transgénico DAS-40278-9 (también conocido como pDAS1740-278) en una muestra. Algunos aspectos de la presente descripción incluyen métodos para el diseño y/o la producción de cualquier molécula diagnóstica de ácido nucleico ejemplificada o sugerida en la presente memoria.
- 20 Esta solicitud también describe la mejora vegetal que incorpora cualquiera de estos métodos. En algunas realizaciones, el evento puede ser "apilado" con otros rasgos (como otros genes de tolerancia a herbicidas y/o genes que codifican para proteínas inhibidoras de insectos, por ejemplo). Líneas vegetales que comprendan el evento pueden ser detectadas utilizando las secuencias descritas y sugeridas en la presente memoria.
- 25 En algunas realizaciones, esta solicitud describe la identificación de líneas de maíz tolerantes a herbicida. La presente solicitud describe la detección de la presencia del evento para determinar si la progenie de un cruzamiento contiene el evento de interés. Además, se describe un método para la detección del evento que es útil, por ejemplo, para cumplir con los requisitos de las regulaciones que requieren una aprobación y un etiquetado de los alimentos procedentes de cultivos recombinantes antes de su comercialización.
- 30 La presente invención se refiere en parte a un ensayo de PCR TaqMan basado en la fluorescencia utilizando el gen endógeno invertasa como control de referencia (número de copias) para un análisis de cigosidad de alto rendimiento del evento de AAD-1 de maíz. La presente invención también se refiere, en parte, al descubrimiento de un gen de referencia prioritario, *invertasa*. Varios genes de referencia fueron identificados como posibles opciones.
- La presente invención también se refiere en parte al desarrollo de una PCR TaqMan bplex de punto final para el análisis de cigosidad específico del evento de AAD-1. Además, la presente invención está relacionada en parte con el desarrollo de kits para la mejora vegetal con AAD-1.
- 35 Los ensayos TaqMan de punto final están basados en una estrategia más/menos, por la que "más" significa que la muestra es positiva para el gen analizado y "menos" significa que la muestra es negativa para el gen analizado. Estos ensayos utilizan típicamente dos conjuntos de oligonucleótidos para la identificación de la secuencia del transgén AAD-1 y de la secuencia del gen silvestre respectivamente, así como sondas de doble etiqueta para medir el contenido de secuencia del transgén o el gen silvestre.
- 40 Aunque el ensayo Invader ha sido una técnica robusta para la caracterización de eventos, es muy sensible a la calidad del ADN. Además, el ensayo requiere una gran cantidad de ADN. El Invader también requiere un paso de desnaturalización adicional que, si no es realizado adecuadamente, puede dar lugar a un ensayo fallido. Adicionalmente, el mayor tiempo de ensayo de los ensayos Invader limita su flexibilidad en el manejo de un gran número de muestras de AAD-1 de forma eficiente para su análisis en un marco comercial. Una de las ventajas principales de la presente invención es el ahorro de tiempo y la eliminación del paso de desnaturalización.
- 45 El presente análisis TaqMan para la detección de eventos de AAD-1 ofrece ventajas sorprendentes respecto a Invader, particularmente en el análisis de un gran número de muestras.
- Esta invención puede tener impacto en el desarrollo y caracterización de rasgos de tolerancia a herbicida relacionados con AAD-1 en especies cultivadas que incluyen el maíz, la soja y el algodón.
- 50 En la presente memoria se proporcionan definiciones y ejemplos para ayudar en la descripción de la presente invención y para guiar al experto en la técnica para realizar la invención. Los términos han de ser entendidos según su uso convencional por parte de expertos en la técnica relevante excepto cuando se indique lo contrario. Se utiliza la nomenclatura de las bases de ADN según está descrita en 37 CFR § 1.822. El término "progenie", tal y como se

emplea en esta memoria, denota la descendencia de cualquier generación de una parcela progenitora que contenga el evento de AAD-1 de maíz DAS-40278-9.

5 Un "evento" transgénico se produce por la transformación de células vegetales con ADN heterólogo, p. ej., una construcción de ácidos nucleicos que incluye el transgén de interés, la regeneración de la población de plantas que resulta de la inserción del transgén en el genoma de la planta, y la selección de una planta particular caracterizada por la inserción en una región particular del genoma. El término "evento" se refiere al transformante original y la progenie del transformante que incluye el ADN heterólogo. El término "evento" también se refiere a la progenie producida por un cruzamiento entre el transformante y otra variedad que incluya el ADN genómico/transgén. Incluso tras retrocruzamientos repetidos con el mismo parental recurrente, el ADN del transgén insertado y el ADN genómico flanqueante (ADN genómico/transgén) del parental transformado está presente en la progenie del cruzamiento en la misma localización cromosómica. El término "evento" también se refiere al ADN del transformante original y su misma progenie que comprende el transformante original y la progenie que resulta de su autofecundación y la línea parental que no contiene el ADN insertado.

15 Una "secuencia de unión" abarca el punto en el que el ADN insertado en el genoma se une con el ADN del genoma nativo de maíz que flanquea el punto de inserción. Se incluyen las secuencias de ADN que abarcan las inserciones en los eventos descritos en la presente memoria y de ADN flanqueante de longitud similar.

La presente solicitud describe la identificación del presente evento. Los cebadores de PCR y amplicones relacionados se incluyen en la presente invención. Estas moléculas pueden ser utilizadas para detectar o identificar variedades o líneas de maíz transgénico comercializadas que deriven de las líneas de maíz transgénico objeto.

20 La secuencia entera del inserto, junto con porciones de las secuencias flanqueantes respectivas, se proporcionan en la presente memoria como SED ID NO: 1. Las coordenadas de las secuencias del inserto y flanqueantes para este evento respecto a SEQ ID NO: 1 (8.557 pares de bases en total) están impresas debajo.

|                  | Flanqueante 5' | Inserto     | Flanqueante 3' |
|------------------|----------------|-------------|----------------|
| Restos (SEQ:29): | 1-1.873        | 1.874-6.689 | 6.690-8.557    |
| Longitud (pb):   | 1.873 pb       | 4.816 pb    | 1.868 bp       |

25 Los componentes del inserto AAD-1 y las secuencias flanqueantes para este evento están además ilustradas en las Figuras 1 hasta 3.

30 Las técnicas de detección de la presente invención pueden ser utilizadas en conjunción con la mejora vegetal, para determinar qué plantas de la progenie contienen un evento determinado, tras el cruzamiento de la planta parental que contiene un evento de interés con otra línea vegetal en un esfuerzo para impartir uno o más rasgos de interés adicionales en la progenie. Los métodos presentes son de utilizad, por ejemplo, en programas de mejora vegetal de maíz así como en controles de calidad, especialmente para semillas de maíz transgénico comercializadas. Esto también puede beneficiar el registro y administración de productos. Estos métodos pueden ser utilizados para acelerar las estrategias de mejora vegetal.

35 En algunas realizaciones, el ensayo TaqMan de punto final basado en fluorescencia para el análisis de cigosidad permite que los resultados para la identificación del evento de AAD-1 de maíz y el gen de referencia sean leídos directamente en un lector de placas.

La presente solicitud describe aplicaciones en mejora vegetal como el análisis de la introgresión del evento de AAD-1 en otras líneas de maíz.

40 Los métodos de detección y kits para la presente solicitud pueden ser utilizados para identificar eventos de acuerdo con la presente solicitud. Los métodos y kits de la presente invención pueden ser utilizados para estrategias de mejora vegetal aceleradas y para establecer la información de ligamiento.

45 Las técnicas de detección de la presente solicitud son especialmente útiles en conjunción con la mejora vegetal, para determinar que plantas de la progenie contienen un evento determinado, tras el cruzamiento de la planta parental que contiene un evento de interés con otra línea vegetal en un esfuerzo para impartir uno o más rasgos de interés adicionales en la progenie. Estos métodos de análisis mediante PCR Taqman benefician a los programas de mejora vegetal de maíz así como a los controles de calidad, especialmente para semillas de maíz transgénico comercializadas. También se pueden hacer y utilizar los kits de detección mediante PCR Taqman para estas líneas de maíz transgénico. Esto también puede beneficiar el registro y la administración de productos.

50 Todavía más, los presentes métodos pueden ser utilizados para estudiar y caracterizar los procesos de integración de transgenes, las características de los sitios de integración genómicos, la clasificación de los eventos, la estabilidad de los transgenes y sus secuencias flanqueantes, y la expresión génica (especialmente relacionada con

el silenciamiento génico, los patrones de metilación de los transgenes, los efectos de posición, y elementos potencialmente relacionados con la expresión como MARS [Matrix Attachment Regions], y similares).

Como se emplea en esta memoria, el término “maíz” se refiere a *Zea mays* e incluye todas las variedades que asimismo pueden reproducirse con el maíz.

5 Esta solicitud describe además procesos para realizar cruzamientos utilizando métodos de la presente invención. Por ejemplo, la presente solicitud describe un método para producir semillas híbridas F<sub>1</sub> mediante el cruzamiento de una planta ejemplificada con una planta diferente (p. ej. un parental endógamo), la cosecha de las semillas híbridas resultantes, y la detección del evento objeto. Las características de las plantas resultantes también pueden ser mejoradas mediante la incorporación de métodos de la presente invención.

10 Una planta de maíz tolerante a herbicidas puede ser obtenida mediante el cruzamiento entre una primera planta de maíz parental consistente en una planta de maíz crecida a partir de semillas de una línea referida en la presente memoria, y una segunda planta de maíz parental, produciendo de este modo una multitud de plantas de la primera progenie; y entonces la selección de la primera planta de la progenie que sea resistente a un herbicida (o que posea el evento objeto); y la autofecundación de la planta de la primera progenie, produciendo de este modo una multitud  
15 de plantas de la segunda progenie; y entonces la selección, de entre las plantas de la segunda progenie, de una planta que sea resistente a un herbicida (o que posea al menos uno de los eventos). Estos pasos pueden además incluir el retrocruzamiento de la planta de la primera progenie o de la planta de la segunda progenie con la segunda planta de maíz parental o con una tercera planta de maíz parental. Un cultivo de maíz compuesto por semillas de maíz de la presente invención, o su misma progenie, puede entonces ser sembrado.

20 También se puede entender que dos plantas transgénicas diferentes pueden cruzarse también para producir una descendencia que contenga dos genes exógenos añadidos que segreguen independientemente. La autofecundación de la progenie adecuada puede producir plantas que sean homocigotas para ambos genes exógenos añadidos. El retrocruzamiento con una planta parental o el cruzamiento con una planta no transgénica también han sido contemplados, así como la propagación vegetativa. Se conocen en la técnica otros métodos de mejora vegetal  
25 utilizados comúnmente para diferentes rasgos y cultivos. La mejora vegetal mediante retrocruzamientos ha sido utilizada para transferir genes de un rasgo altamente heredable de herencia simple en un cultivar homocigoto de interés o línea endógama, que es el parental recurrente. La fuente del rasgo a ser transferido es denominado parental donante. Se espera que la planta resultante tenga atributos del parental recurrente (p. ej., un cultivar) y el rasgo de interés transferido desde el parental donante. Tras el cruzamiento inicial, se seleccionan individuos que poseen el fenotipo del parental donante y son cruzados (retrocruzados) repetidamente con el parental recurrente. Se  
30 espera que el parental resultante tenga los atributos del parental recurrente (p.ej. un cultivar) y el rasgo de interés transferido desde el parental donante.

La presente invención puede ser utilizada en conjunción con métodos de mejora vegetal asistida por marcadores (MAB). Del mismo modo, moléculas de ADN de la presente invención pueden ser utilizados con otros métodos (tal  
35 como marcadores AFLP, marcadores RFLP, marcadores RAPD, SNPs y SSRs) que identifican rasgos de interés agronómico ligados genéticamente. El rasgo de tolerancia a herbicidas puede ser monitorizado en la progenie de un cruzamiento (o en su misma progenie con cualquier otro cultivar o variedad de maíz) utilizando los métodos de MAB. Los métodos de la presente invención pueden ser utilizados para identificar cualquier variedad de maíz que contenga el evento objeto.

40 Los métodos descritos en la presente solicitud incluyen un método para la producción de una planta de maíz tolerante a herbicida en el que dicho método comprende la mejora vegetal con una planta que contiene el evento. Los métodos preferidos comprenden además la selección de la progenie de dicho cruzamiento mediante el análisis de dicha progenie para un evento detectable conforme a la presente invención. Por ejemplo, la presente invención puede ser utilizada para monitorizar el evento objeto a lo largo de ciclos de mejora vegetal con plantas que incluyen  
45 otros rasgos de interés, como rasgos agronómicos. Por ejemplo, se pueden detectar, identificar, seleccionar, y usar rápidamente en futuras rondas de mejora vegetal plantas que incluyan el evento y el rasgo de interés. El evento/rasgo puede ser combinado a través de la mejora vegetal, y monitorizado de acuerdo con la presente invención, con rasgos de resistencia a insectos y/o más rasgos de tolerancia a herbicidas. Una realización preferida de los últimos es una planta que contenga evento objeto combinado con un gen que codifique la resistencia para un  
50 herbicida de imidazolinona, glifosato, y/o glufosinato. El gen de tolerancia al dicamba puede ser utilizado en algunas realizaciones.

Así, la presente invención puede ser combinada con, por ejemplo, rasgos que codifiquen resistencia al glifosato (p. ej., *EPSPS*, *GOX*, *GAT* de plantas resistentes o bacterianos), resistencia al glufosinato (p. ej., *Pat*, *bar*), resistencia a herbicidas inhibidores de la acetolactato sintasa (ALS) (p. ej., imidazolinonas [como imazetapir], sulfonilureas, triazolpirimidina sulfonanilida, pirmediniltiobenzoatos, y otros productos químicos [*Csr1*, *SurA*, et al.]), resistencia al bromoxinil (p. ej., *Bxn*), resistencia a inhibidores de la enzima HPPD (4-hidroxifenil piruvato dioxigenasa), resistencia a inhibidores de la fitoeno desaturasa (PDS), resistencia a herbicidas inhibidores del fotosistema II (p. ej., *pdbA*), resistencia a herbicidas inhibidores del fotosistema I, resistencia a herbicidas inhibidores de la protoporfirinógeno oxidasa IX (PPO), resistencia a herbicidas de fenilurea (p. ej., *CYP76B1*), enzimas degradadoras de la dicamba (ver,  
60 p. ej., US 20030135879), y otros pueden ser apilados por si mismos o en múltiples combinaciones para proporcionar

la habilidad de controlar de forma efectiva o prevenir cambios en la composición de las malas hierbas y/o la resistencia a cualquier herbicida de las clases anteriormente mencionadas.

5 Respecto a herbicidas adicionales, algunos otros inhibidores de la ALS (también denominados AHAS) preferidos incluyen las triazolopirimidina sulfonanilidas (como cloransulam metil, diclosulam, florasulam, metosulam, y penoxsulam), pirimidiniltiobenzoatos (como bispiribac y piritiobac), y flucarbazone. Algunos inhibidores de la HPPD preferidos incluyen mesotriona, isoxaflutol, y sulcotriona. Algunos inhibidores de la PPO preferidos incluyen flumiclorac, flumioxazina, flufenpir, piraflufen, flutiacet, butafenacil, carfentrazona, sulfentrazona, y los difeniléteres (como acifluorfen, fomesafeno, lactofeno, y oxifluorfen).

10 Como se emplea en esta memoria, una "línea" es un grupo de plantas que muestran poca o ninguna variación genética entre individuos para al menos un rasgo. Dichas líneas podrían ser creadas mediante varias generaciones de autofecundación y selección, o propagación vegetativa desde un solo parental utilizando técnicas de cultivo de tejidos o de células.

Como se emplea en esta memoria, los términos "cultivar" y "variedad" son sinónimos y hacen referencia a una línea que es utilizada para la producción comercial.

15 "Estabilidad" o "estable" significa que, respecto a un componente, dicho componente es mantenido de generación en generación y, preferiblemente, en al menos tres generaciones sustancialmente al mismo nivel, p. ej., preferiblemente al  $\pm 15\%$ , más preferiblemente al  $\pm 10\%$ , lo más preferible al  $\pm 5\%$ . La estabilidad puede ser afectada por la temperatura, la localización, el estrés y el momento de sembrado. La comparación de generaciones subsecuentes bajo condiciones de cultivo debe producir el componente de manera similar.

20 La "utilidad comercial" se define como tener un buen vigor de planta y una alta fertilidad, de manera tal que el cultivo puede ser producido por granjeros utilizando equipamiento de granja tradicional, y que el aceite con los componentes descritos puede ser extraído de las semillas utilizando equipamientos convencionales de trituración y extracción. Para que el rendimiento, medido como peso de las semillas, contenido en aceite, y producción total de aceite por acre, sea de utilidad comercial debe estar dentro de un rango del 15% del rendimiento promedio de otra  
25 variedad comercial de maíz comparable sin los rasgos de valor añadido cultivada en la misma región.

"Élite agronómica" significa que una línea contiene características agronómicas deseables como el rendimiento, la madurez, la resistencia a enfermedades, y similares, además de la resistencia a insectos debida de determinado evento o eventos. Los rasgos agronómicos pueden presentarse individualmente o en cualquier combinación.

30 Tal y como un experto en la técnica reconocerá a la luz de la descripción, las realizaciones preferidas de los kits de detección, por ejemplo, pueden incluir sondas y/o cebadores. Por ejemplo, esto incluye sondas de polinucleótidos, cebadores y/o amplicones tal y como se indica en la presente memoria.

35 Un experto en la técnica también reconocerá que los cebadores y las sondas pueden ser diseñadas para hibridar, bajo un rango condiciones de hibridación estándar y/o de PCR, con un segmento de SEQ ID NO: 1 (o la secuencia complementaria), y con sus mismas secuencias complementarias, en donde el cebador o la sonda no son perfectamente complementarias a la secuencia ejemplificada. Por tanto, se puede tolerar cierto grado de discordancia. Por ejemplo, para un cebador de aproximadamente 20 nucleótidos, típicamente un par nucleótidos no necesitan unirse a la cadena opuesta si las bases discordantes están situadas en la parte interna o en el extremo del cebador opuesto al amplicón. Más adelante se proveen varias condiciones de hibridación apropiadas. En las sondas también se pueden utilizar análogos sintéticos de nucleótidos, como la inosina. También se pueden utilizar sondas  
40 de ácidos peptidonucleicos (PNA) así como sondas de ADN y ARN. Lo que es importante es que dichas sondas y cebadores sean diagnósticos (capaces de identificar y distinguir inequívocamente) para la presencia de un evento de la presente invención.

45 Los componentes de cada uno de los "insertos" se ilustran en las Figuras 1 hasta 3. Las secuencias polinucleotídicas de ADN para esos componentes, o sus fragmentos, pueden ser utilizados como cebadores de ADN o sondas en los métodos de la presente invención.

50 Las secuencias de ADN que constituyen un fragmento contiguo de las regiones del nuevo transgén/inserción genómica son descritas en la presente memoria. También se incluyen las secuencias de ADN que están constituidas por una cantidad suficiente de polinucleótidos de la secuencia del inserto transgénico y una cantidad suficiente de polinucleótidos de la secuencia genómica del maíz y/o de secuencias que son útiles como cebadores para la producción de un amplicón diagnóstico para una o más de estas plantas de maíz.

55 Las realizaciones relacionadas pertenecen a secuencias de ADN que comprenden al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, o más nucleótidos contiguos de una porción transgénica de una secuencia de ADN identificada en la presente memoria, o su complementaria. Dichas secuencias pueden ser útiles como cebadores de ADN en métodos de amplificación de ADN. Los amplicones producidos utilizando estos cebadores son diagnósticos para el evento de maíz mencionado en la presente memoria. Por lo tanto, la invención también incluye amplicones y los amplicones producidos por dichos cebadores de ADN y sus cebadores homólogos.

Esta solicitud describe métodos para detectar la presencia de ADN, en una muestra, que se corresponda con el evento de maíz mencionado en la presente memoria. Dichos métodos pueden comprender: (a) poner en contacto la muestra que contiene ADN con el conjunto de cebadores que, cuando son utilizados en una reacción de amplificación de ácidos nucleicos con ADN de al menos uno de estos eventos de maíz, producen un amplicón que es diagnóstico para dicho evento o eventos; (b) llevar a cabo una reacción de amplificación de ADN, produciendo de esta manera el amplicón; y (c) detectar el amplicón.

Más métodos de detección de la presente describen un método para detectar la presencia de ADN, en una muestra, que corresponde con al menos uno de dichos eventos, en donde dicho método comprende: (a) poner en contacto la muestra que contiene ADN con una sonda que hibrida bajo condiciones de hibridación astringentes con ADN de al menos uno de dicho eventos de maíz y que no hibrida bajo condiciones de hibridación astringentes con una planta de maíz control (ADN no perteneciente al evento de interés); (b) someter la muestra y la sonda a condiciones de hibridación astringentes; y (c) detectar la hibridación de la sonda con el ADN.

Esta solicitud describe métodos para detectar la presencia de ADN, en una muestra, de al menos una planta de maíz referida en la presente memoria. Dicho métodos pueden comprender: (a) poner en contacto la muestra que contiene ADN con un conjunto de cebadores que, cuando son utilizados en una reacción de amplificación de ácidos nucleicos, de la presente invención, con ADN de al menos uno de estos eventos de maíz; (b) llevar a cabo reacciones de amplificación mediante PCR TaqMan utilizando un gen de referencia identificado en la presente memoria; y (c) análisis de los resultados.

En todavía más realizaciones, la presente solicitud describe métodos para producir una planta de maíz que incluya el evento AAD-1 de la presente invención, en el que dicho método comprende los pasos de: (a) cruzar la primera línea parental de maíz (que incluye casetes de expresión de la presente invención, que confiere dicho rasgo de resistencia a herbicidas en plantas de dicha línea) con una segunda línea parental de maíz (que carece de este rasgo de tolerancia a herbicidas) produciendo de este modo una multitud de plantas de la progenie; y (b) seleccionar una planta de la progenie mediante el uso de marcadores moleculares. Dichos métodos pueden comprender opcionalmente un paso más de retrocruzamiento de la planta de la progenie con la segunda línea parental de maíz para producir una línea pura de maíz que incluya dicho rasgo de tolerancia a herbicidas.

Según otro aspecto de la invención, se proporcionan los métodos para determinar la cigosidad de la progenie de un cruzamiento que incluya el presente evento. Dichos métodos pueden comprender poner en contacto una muestra, que comprende ADN de maíz, con un conjunto de cebadores de la presente invención. Dichos cebadores, cuando son utilizados en una reacción de amplificación de ácidos nucleicos con ADN genómico de al menos uno de dichos eventos de maíz, produce un primer amplicón que es diagnóstico para al menos uno de dichos eventos. Dichos métodos pueden comprender además llevar a cabo una reacción de amplificación de ácidos nucleicos, produciendo de este modo el primer amplicón; detectar el primer amplicón; y poner en contacto la muestra que incluye ADN de maíz con dicho conjunto de cebadores que, cuando son utilizados en una reacción de amplificación de ácidos nucleicos con ADN genómico de plantas de maíz, produce un segundo amplicón que incluye ADN genómico de maíz que es homólogo a la región genómica de maíz; y llevar a cabo una reacción de amplificación de ácidos nucleicos, produciendo de este modo el segundo amplicón. Los métodos comprenden además detectar el segundo amplicón, y comparar el primer y segundo amplicones en una muestra, en el que la presencia de ambos amplicones indica que la muestra es heterocigota para la inserción del transgén.

Pueden desarrollarse kits de detección de ADN utilizando las composiciones descritas en la presente memoria y métodos conocidos en la técnica de detección de ADN. Los kits son útiles para la detección del presente evento de ADN de maíz en una muestra y pueden ser aplicados a métodos para la mejora vegetal de plantas de maíz que contengan este ADN. Los kits contienen secuencias de ADN homólogas o complementarias de los amplicones, por ejemplo, descritas en la presente memoria, o de secuencias de ADN homólogas o complementarias del ADN contenido en los elementos genéticos del transgén de los presentes eventos. Estas secuencias de ADN pueden ser utilizadas en reacciones de amplificación de ADN o como sondas en un método de hibridación de ADN. Los kits también pueden contener los reactivos y materiales necesarios para llevar a cabo el método de detección.

Una "sonda" es una molécula aislada de ácido nucleico que está unida a una etiqueta o molécula reportera convencional (como un isótopo radiactivo, un ligando, un agente quimioluminiscente, o una enzima). Dicha sonda es complementaria a una cadena del ácido nucleico objetivo, en el caso de la presente invención, a una cadena de ADN genómico de uno de dicho eventos de maíz, tanto de una planta de maíz como de una muestra que contenga ADN del evento. De acuerdo de con la presente invención, las sondas no sólo incluyen los ácidos desoxirribonucleico o ribonucleico sino también poliamidas y otros materiales sonda que se unen específicamente con una secuencia de ADN objetivo y que pueden ser utilizadas para detectar la presencia de esa secuencia de ADN objetivo.

Los "cebadores" son ácidos nucleicos aislados/sintetizados que se alinean con una cadena de ADN complementaria objetivo mediante la hibridación de ácidos nucleicos para formar un híbrido entre el cebador y la cadena de ADN objetivo, que es alargada a lo largo de la secuencia de ADN objetivo por una polimerasa, p. ej., una ADN polimerasa. Los pares de cebadores de la presente invención hacen referencia a su uso para la amplificación de una secuencia

de ácidos nucleicos objetivo, p. ej., mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otros métodos convencionales de amplificación de ácidos nucleicos.

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

30 Se han descrito métodos para la preparación y el uso de sondas y cebadores, por ejemplo, en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., vol. 1-3, ed. Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989. Los pares de cebadores de PCR pueden derivar de una secuencia conocida, por ejemplo, utilizando programas de ordenador para dicho propósito.

35 Los cebadores y sondas basados en las secuencias de ADN flanqueantes y del inserto que se describen en la presente memoria pueden ser utilizados para confirmar (y, si es necesario, corregir) las secuencias descritas mediante métodos convencionales, p. ej., mediante la repetición de la clonación molecular y la secuenciación de dichas secuencias.

40 Las sondas y cebadores de ácido nucleico de la presente invención hibridan bajo condiciones astringentes con la secuencia de ADN objetivo. Cualquier método convencional de hibridación o amplificación de ácidos nucleicos puede ser utilizado para identificar la presencia de ADN de un evento transgénico en una muestra. Las moléculas o fragmentos de ácido nucleico son así mismo capaces de hibridar específicamente con otras moléculas de ácido nucleico bajo ciertas circunstancias. Tal y como se emplea en la presente memoria, se dice que dos moléculas de ácido nucleico son capaces de hibridar específicamente la una con la otra si las dos moléculas son capaces de formar una estructura de ácido nucleico antiparalela de doble cadena. Se dice que una molécula de ácido nucleico es el "complemento" de otra molécula de ácido nucleico si muestran complementariedad completa. Tal y como se emplea en la presente memoria, se dice que unas moléculas muestran "complementariedad completa" cuando cada nucleótido de una de las moléculas es complementario a un nucleótido de las otras. Se dice que dos moléculas son "mínimamente complementarias" si pueden hibridar la una con la otra con suficiente estabilidad como para permitir que se mantengan alineadas la una con la otra bajo condiciones convencionales de como mínimo "baja astringencia". De manera similar, se dice que las moléculas son "complementarias" si pueden hibridar la una con la otra con suficiente estabilidad como para permitir que se mantengan alineadas la una con la otra bajo condiciones convencionales de "alta astringencia". Las condiciones convencionales de astringencia se describen en Sambrook *et al.* 1989. Las desviaciones de la complementariedad completa son por tanto permisibles, siempre y cuando dichas desviaciones no descarten completamente la capacidad de las moléculas de formar una estructura de doble cadena. Para que una molécula de ácido nucleico sirva como cebador o sonda sólo necesita ser suficientemente complementaria en su secuencia como para ser capaz de formar una estructura de doble cadena bajo las concentraciones particulares de disolvente y sal empleadas.

60 Tal y como se emplea en la presente memoria, una secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia de ácido nucleico que hibrida específicamente a la secuencia de ácido nucleico complementaria con la que está siendo comparada bajo condiciones de alta astringencia. El término "condiciones astringentes" se define funcionalmente respecto a la hibridación de una sonda de ácido nucleico con un ácido nucleico objetivo (esto es, a una secuencia particular de ácido nucleico de interés) mediante el protocolo de hibridación específico discutido en Sambrook *et al.* 1989, en 9.52-9.55. Ver también en Sambrook *et al.* 1989 en 9.47-9.52 y 9.56-9.58. Por lo tanto, las secuencias

nucleotídicas de la invención pueden ser utilizadas por su habilidad de formar selectivamente moléculas de cadena doble con regiones complementarias de fragmentos de ADN.

Dependiendo de la aplicación concebida, se pueden utilizar condiciones variables de hibridación para conseguir grados variables de selectividad de la sonda hacia la secuencia objetivo. Para aplicaciones que requieran alta selectividad, se emplean normalmente condiciones relativamente astringentes para formar los híbridos, p. ej., se seleccionarían condiciones de baja salinidad y/o alta temperatura, como las que proporcionan entre 0,02 M a 0,15 M de NaCl y temperaturas de entre 50°C y 70°C. Las condiciones astringentes, por ejemplo, pueden suponer lavar el filtro de hibridación al menos dos veces con un tampón de lavado de alta astringencia (0,2X SSC, 0,1% SDS, 65°C). Los expertos en la técnica conocen las condiciones de astringencia apropiadas que promueven la hibridación de ADN como, por ejemplo, 6,0X cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a unos 45°C, seguido de un lavado de 2,0X SSC a 50°C. Por ejemplo, se puede elegir la concentración de sal en la etapa de lavado para una baja astringencia con alrededor de 2,0X SSC a 50°C hasta una alta astringencia con alrededor de 0,2X SSC a 50°C. Además, la temperatura de la etapa de lavado se puede incrementar desde unas condiciones de baja astringencia a temperatura ambiente, alrededor de 22°C, hasta condiciones de alta astringencia a alrededor de 65°C. Tanto la temperatura como la sal se pueden variar, o tanto la temperatura como la concentración de sal se pueden mantener constantes mientras la otra variable se varía. Unas condiciones tan selectivas toleran muy poca, o ninguna, discrepancia entre la sonda y la cadena molde u objetivo. La detección de secuencias de ADN mediante hibridación es conocida por los expertos en la técnica, y las enseñanzas de U.S. Patent Nos. 4.965.188 y 5.176.995 son ejemplares para los métodos de análisis de hibridación.

En una realización particularmente preferida, un ácido nucleico de la presente invención hibridará específicamente con uno o más de los cebadores (o amplicones u otras secuencias) ejemplificadas o sugeridas en la presente memoria, incluyendo complementos y fragmentos de las mismas, bajo condiciones de alta astringencia. En un aspecto de la presente invención, una molécula de ácido nucleico de la presente invención tiene la secuencia de ácido nucleico descrita en SEQ ID NOS: 2-7, o complementos y/o fragmentos de la misma.

En otro aspecto de la presente invención, una molécula marcadora de ácido nucleico de la presente invención comparte entre el 80% y el 100%, o el 90% y el 100% de la identidad de secuencia con dichas secuencias de ácido nucleico. En otro aspecto de la presente invención, una molécula marcadora de ácido nucleico de la presente invención comparte entre el 95% y el 100% de identidad de secuencia con dicha secuencia. Dichas secuencias pueden ser utilizadas como marcadores en métodos de mejora vegetal para identificar la progenie de cruzamientos. La hibridación de la sonda con la molécula de ADN objetivo puede ser detectada mediante los métodos conocidos por los expertos en la técnica, que pueden incluir, pero no se limitan a, etiquetas fluorescentes, radiactivas, basadas en anticuerpos, y quimioluminiscentes.

En relación con la amplificación de la secuencia de ácido nucleico objetivo (p. ej., mediante PCR) utilizando un par de cebadores de amplificación particulares, las "condiciones astringentes" son condiciones que permiten al par de cebadores hibridar únicamente con la secuencia de ácido nucleico objetivo para la que un cebador que tiene la secuencia silvestre correspondiente (o su complementaria) se uniría y produciría preferiblemente un único producto de amplificación, el amplicón.

El término "específico para (una secuencia objetivo)" indica que una sonda o cebador hibrida bajo condiciones astringentes de hibridación solamente con la secuencia objetivo en una muestra que contiene la secuencia objetivo.

Tal y como se emplea en la presente memoria, "ADN amplificado" o "amplicón" se refiere al producto de una amplificación de ácidos nucleicos de una secuencia de ácido nucleico objetivo que forma parte de un molde de ácido nucleico. Por ejemplo, para determinar si la planta de maíz resultante de un cruzamiento contiene el ADN genómico del evento transgénico de la planta de maíz de la presente invención, el ADN extraído de una muestra de tejido foliar de la planta de maíz puede ser sometido a un método de amplificación de ácidos nucleicos utilizando un par de cebadores que incluya un cebador derivado de la secuencia flanqueante en el genoma de la planta adyacente al sitio de inserción del ADN heterólogo insertado, y un segundo cebador derivado del ADN heterólogo insertado para producir un amplicón que es diagnóstico para la presencia del ADN del evento. El amplicón tiene una longitud y una secuencia que son también diagnósticas para el evento. El amplicón puede oscilar en tamaño entre la longitud combinada del par de cebadores más un par de bases nucleotídicas, y/o la longitud combinada del par de cebadores más 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303,

304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, o 500, 750, 1.000, 1.250, 1.500, 1.750, 2.000 o más pares de bases nucleotídicas (más o menos cualquiera de los incrementos listados anteriormente). Alternativamente, un par de cebadores puede derivar de las secuencias flanqueantes a ambos lados del ADN insertado para producir así un amplicón que incluya la secuencia nucleotídica insertada entera. Un miembro del par de cebadores derivado de la secuencia genómica de la planta puede estar localizado a distancia de la secuencia de ADN insertado. Esta distancia puede oscilar entre un par de bases nucleotídicas hasta alrededor de veinte mil pares de bases nucleotídicas. El uso del término "amplicón" excluye específicamente los dímeros de cebadores que se pueden formar en la reacción de amplificación termal de ADN.

La amplificación de ácidos nucleicos puede ser conseguida mediante cualquiera de los varios métodos de amplificación de ácidos nucleicos conocidos en la técnica, incluyendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se conocen en la técnica una variedad de métodos de amplificación y están descritos, entre otros, en U.S. Patent No. 4.683.195 y U.S. Patent No. 4.683.202. Se han desarrollado métodos de amplificación mediante PCR para amplificar hasta 22 Kpb de ADN genómico. Estos métodos así como otros métodos conocidos en la técnica de amplificación de ADN pueden ser utilizados en la práctica de la presente invención. La secuencia del inserto de ADN heterólogo transgénico o la secuencia genómica flanqueante de un evento de maíz puede ser verificada (y corregida si es necesario) mediante la amplificación de dichas secuencias del evento utilizando cebadores derivados de las secuencias provistas en la presente memoria seguida de la secuenciación de ADN estándar del amplicón de PCR o del ADN clonado.

El amplicón producido por estos métodos puede ser detectado mediante una variedad de métodos. Un método común y bien conocido de detección de amplicones de ADN es la electroforesis en gel de agarosa y la tinción con bromuro de etidio. Otro método es el Genetic Bit Analysis en el que un oligonucleótido de ADN se diseña para solapar tanto la secuencia de ADN genómico flanqueante como la secuencia de ADN insertado. El oligonucleótido es inmovilizado en los pocillos de una placa de micropocillos. Después de una PCR de la región de interés (utilizando un cebador en la secuencia insertada y uno en la secuencia genómica flanqueante adyacente), el producto de PCR de cadena simple puede ser hibridado con el oligonucleótido inmovilizado y servir como molde para una reacción de extensión de una sola base utilizando polimerasa de ADN y ddNTP marcados específicos para la siguiente base esperada. La lectura puede estar basada en la fluorescencia o en ELISA. Una señal indica la presencia de la secuencia inserto/flanqueante debido al éxito en la amplificación, hibridación y extensión de una sola base.

Se utilizan las siguientes abreviaturas salvo que se indique lo contrario.

AAD-1: ariloxialcanoato dioxigenasa-1

40 pb: par de bases

°C: grados Celsius

ADN: ácido desoxirribonucleico

DIG: digoxigenina

EDTA: ácido etilenediaminotetraacético

45 kpb: kilobase

µg: microgramo

µl: microlitro

ml: mililitro

M: masa molar

50 OLP: sonda solapante

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PTU: unidad de transcripción vegetal

SDS: dodecilsulfato sódico

SOP: protocolo de operación estándar

SSC: una disolución tampón que contiene una mezcla de cloruro sódico y citrato sódico, pH 7,0

TBE: una disolución tampón que contiene una mezcla de Tris base, ácido bórico y EDTA, pH 8,3

5 V: voltios

**Ejemplos**

Ejemplo 1. Ensayo TaqMan específico de evento

Se desarrolló un ensayo TaqMan específico de evento para detectar la presencia en maíz del evento DAS-40278-9 y para determinar el estado de cigosidad de las plantas en poblaciones de mejora vegetal. Para desarrollar un ensayo específico de evento, se diseñaron cebadores y sondas TaqMan específicas de acuerdo con las secuencias de ADN localizadas en la unión 5' entre el inserto y la planta. Para la detección específica de DAS-40278-9, se amplificó un fragmento de ADN de 73 pb que abarca la unión 5' de la integración utilizando dos cebadores específicos. La amplificación de este producto de PCR fue medida mediante una sonda MGB específica para el objetivo sintetizada por Applied Biosystems que contiene el reportero FAM en su extremo 5'. Se analizó la especificidad de este método de detección TaqMan para el evento de AAD-1 de maíz DAS-40278-9 contra 16 eventos de AAD-1 de maíz diferentes y una variedad no transgénica de maíz en formato dúplex con el gen endógeno de referencia específico de maíz, Invertasa.

Ejemplo 1.1. Aislamiento de ADNg

Muestras de ADNg de 15 eventos de AAD-1 de maíz diferentes y variedades no transgénicas de maíz fueron analizados en este estudio. Se extrajo ADNg mediante dos aproximaciones, el kit de Qiagen o CTAB. Para las muestras de ADNg extraídas con el kit de Qiagen, se utilizaron ocho discos foliares frescos de maíz de acuerdo con un protocolo modificado de Qiagen DNeasy 96 Plant Kit. Para las muestras de ADNg extraídas mediante el uso del protocolo CTAB, se utilizaron alrededor de 0,3 g de tejido foliar liofilizado siguiendo el protocolo de Permingeat *et al.* 1998. El ADNg fue cuantificado mediante el método Pico Green de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Molecular Probes, Eugene, OR). Las muestras de ADNg se diluyeron con agua libre de DNAsas hasta una concentración de 10 ng/μl para el propósito de este estudio.

Ejemplo 1.2. Ensayo TaqMan y resultados

Se diseñaron cebadores y sondas TaqMan específicas para el ensayo TaqMan específico del evento DAS-40278-9. Estos reactivos pueden ser utilizados con las condiciones enumeradas más adelante para detectar el evento de AAD-1 de maíz DAS-40278-9. La Tabla 1 enumera las secuencias de cebadores y sondas que fueron desarrolladas específicamente para la detección del evento DAS-40278-9.

Tabla 1. Cebadores de PCR y sondas

| Reacción del evento objetivo                 |                 |   |
|--|-----------------|---|
| Nombre                                       | Descripción     | Secuencia de 5' a 3'                                    |
| Corn278-F                                    | Cebador Directo | Seq ID NO: 2: 5' - ATTCTGGCTTTGCTGTAAATCGT - 3'         |
| Corn278-R                                    | Cebador Inverso | Seq ID NO: 3 5' - TTACAATCAACAGCACCGTACCTT - 3'         |
| Corn278-Probe                                | Sonda           | Seq ID NO: 4: 5' - FAM - CTAACCTTCATTGTATTCC - MGB - 3' |
| Reacción del sistema de referencia Invertasa |                 |   |
| Nombre                                       | Descripción     | Secuencia de 5' a 3'                                    |
| IVF  | Cebador Directo | Seq ID NO: 5: 5' - TGGCGGACGACGACTTGT - 3'              |
| IVR  | Cebador Inverso | Seq ID NO: 6: 5'- AAAGTTTGGAGGCTGCCGT - 3'              |

| Reacción del evento objetivo |             |   |
|------------------------------|-------------|---|
| Nombre                       | Descripción | Secuencia de 5' a 3'  |
| IV-Probe                     | Sonda       | Seq ID NO: 7: 5' - HEX -<br>CGAGCAGACCGCCGTGTACTTCTACC -<br>BHQ2 - 3' |

5 Las condiciones de PCR multiplex para la amplificación son las siguientes: 1X tampón de PCR, 0,5 – 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs, 0,2 μM del cebador Corn278-F, 0,2 μM del cebador Corn278-R, 0,2 μM del cebador IVF, 0,2 μM del cebador IVR, 0,08 μM de la sonda Corn278-Probe, 0,08 μM de la sonda IV-Probe, 40 U/ml de HotStart Taq, 0,6 – 2,4 μg/ml de ADN en una reacción final de 25 μl. Se analizaron varias concentraciones de MgCl<sub>2</sub> y de ADN. Se utilizaron concentraciones de MgCl<sub>2</sub> de 0,5 mM, 1,0 mM, 1,8 mM y 2,5 mM. El cóctel fue amplificado utilizando las siguientes condiciones: i) 95°C durante 15 min., ii) 95°C durante 20 s., iii) 60°C durante 60 s., iv) repetición de los pasos ii-iii durante 50 ciclos, v) espera a 4°C. La PCR en tiempo real se llevó a cabo en un sistema Bio-rad iCycler™. El análisis de datos se basó en la medida del ciclo umbral (CT), que es el número de ciclo de PCR en el que la medida de la fluorescencia alcanza un valor determinado. El valor CT fue calculado automáticamente por el software iCycler.

Las secuencias de los amplicones generados utilizando los cebadores descritos anteriormente fueron las siguientes:

Corn278-F y Corn278-R: ttacaatcaacagcaccgtacctgaagcggaatacaatgaaggttagctacgatttacagcaaagccagaat (SEQ ID NO: 8).

15 IVF e IVR: tggcggacgacgactgtccgagcagaccgccgtgtacttctacctgctcaagggcacggacggcagcctccaaacttt (SEQ ID NO: 9).

20 El método de detección TaqMan para el evento de AAD-1 de maíz DAS-40278-9 fue analizado contra 16 eventos de AAD-1 de maíz diferentes y variedades no transgénicas de maíz en formato dúplex con el gen específico de maíz Invertasa como gen de referencia. Este ensayo detectó específicamente el evento de AAD-1 de maíz DAS-40278-9 y no produjo o amplificó ningún resultado falso positivo en los controles (esto es, los 15 eventos de AAD-1 de maíz diferentes y las variedades no transgénicas de maíz). Los cebadores y sondas específicas del evento pueden ser utilizadas para la detección del evento de AAD-1 de maíz DAS-40278-9 y estas condiciones y reactivos son aplicables en ensayos de cigosidad.

LISTADO DE SECUENCIAS

|       |  |      |
|-------|--|------|
| <110> | Dow AgroSciences LLC   |      |
| <120> | DETECCIÓN DEL EVENTO DE AAD-1 DAS-40278-9                          |      |
| <130> | DAS-P0169-01   |      |
| <160> | 9  |      |
| <170> | PatentIn versión 3.5   |      |
| <210> | 1  |      |
| <211> | 8557   |      |
| <212> | ADN  |      |
| <213> | Secuencia artificial   |      |
| <220> |  |      |
| <223> | Secuencias del inserto de AAD-1 y flanqueantes                     |      |
| <400> | 1  |      |
|       | actggtatatt aatatacttt aataaatatt attagattcc tcgtcaaaga actttttaca | 60   |
|       | atatatctat ttagaatcat atatgtcata gttttttttc taagagtcta gtttactagt  | 120  |
|       | aaaatccgac tcacattttt cgaacttggg atgcaacact taaatagtac aaaaccttgg  | 180  |
|       | tatgcagtat tttacattgt aagattcaaa atttctaaag cagtatata atgtttccag   | 240  |
|       | aaacttatag atatagaaaa aacagagaga cgtatgcaa aattcgataa aggtgtacat   | 300  |
|       | tggattcgca aggctaaata catattttatc gtggatccat gcagagtttg ggtaataaaa | 360  |
|       | ttagatactt ccaatcatgt gccacataat cacgtaacat tagtaattta aatgacatta  | 420  |
|       | ccatgtccaa ctgattttaa acacaaactc ttcttgaacc atatagtttg acaaaccaaa  | 480  |
|       | tatatataac tggagctact agttatgaat caattaaaa ttactttgaa gattcaacgt   | 540  |
|       | agtgccagtt tggctctagc acatctaacc agaagggcta aggctggctt caacaggaac  | 600  |
|       | agccaaatcc gagatcgagc catttgccat ttttgggtag ttagtttaac tttcatatat  | 660  |
|       | cttcccatcc ttttttgctt agcctaaatg gctttgatgt tgaagaccat attaatttgc  | 720  |
|       | ttcagtgcca ctaggacaac catattggct ttggctgacc cgtagagtt agcctaattg   | 780  |
|       | gtggaagggg agggaagggg aggatcgatg gtggcatgag agaggggttg acgatcacga  | 840  |
|       | tgatgatgcg agtgaggagg agaggggtggc gacgacacag gggagaaagg agagggacgc | 900  |
|       | taggagcgtc aagggcgtgg gggaggggag ggtcggaggg atgaaggatg acctaaatat  | 960  |
|       | tattgttgag tgatagaggg ttattcaact atccgaccgg tcgattttga tggtagtga   | 1020 |
|       | aatttgtgtg tcatttgttt gatggattta gtaaagggtta tgggtctaga ggtgattttt | 1080 |
|       | gttgggtggg ttttacagag tttaaactag cggattatat agtggatatag aagatatagt | 1140 |
|       | tttattagaa catctccaaa atgtgactcg aaataatacc cccaaaattt aaaatactac  | 1200 |
|       | atcattttga taaaaaaggt aaagtagagc actgttgga cagtttttaa aagttgtgcc   | 1260 |
|       | ctatatttta aaatagggtta ctgattttaa atattgttgt ggggataga tatccccggg  | 1320 |

ES 2 586 380 T3

tccactagaa ggcgagaagg cctcgcgtgt ggccacgggc cagttacccc gcaaggccat 1380  
 cccttcgtgg gtcgagctag aattactggg agaatgggct gaccgaagaa ggcaacagac 1440  
 tcgagcccaa acaatccatc ggctcgtgcg ctatccacag aaactaccgg actttccggc 1500  
 gcatggcatc ctagaatatc ggggcggtatt agggatgagt cagcgagatt ttcggaagat 1560  
 tagttcagtt tgttcgctat tatttaggag acatatgatc ctcatgtacg tatggagtgc 1620  
 cccacggtcg tgtatataag gtccagaggg taccatca tttctatcga ccctctacct 1680  
 atctcatcag cttttctcca ttcaggagac ctgcgttgta acccaccaca tatagatcca 1740  
 tccaagaag tagtgtatta cgctctcta agcggcccaa acttgcagaa aaccgcctat 1800  
 ccctctctcg tgcgtccagc acgaaccatt gagttacaat caacagcacc gtaccttgaa 1860  
 gcggaataca atgaaggtta gctacgattt acagcaaagc cagaatacaa tgaaccataa 1920  
 agtgattgaa gctcgaaata tacgaaggaa caaatatfff taaaaaata cgcaatgact 1980  
 tggaacaaaa gaaagtgata tattttttgt tcttaaaca gcatcccctc taaagaatgg 2040  
 cagttttcct ttgcatgtaa ctattatgct cccttcgtta caaaaatfff ggactactat 2100  
 tgggaacttc ttctgaaaat agtggccacc gcttaattaa ggcgcgccat gcccgggcaa 2160  
 gcggccgctt aattaaatff aaatgtttaa actaggaaat ccaagcttgc atgcctgcag 2220  
 atccccgggg atcctctaga gtcgacctgc agtgcagcgt gaccgggtcg tgcctctc 2280  
 tagagataat gagcattgca tgtctaagtt ataaaaaatt accacatatt ttttttgc 2340  
 cacttgtttg aagtgcagtt tatctatctt tatacatata tttaaactff actctacgaa 2400  
 taatataatc tatagtacta caataatatc agtgttttag agaatcatat aatgaacag 2460  
 ttagacatgg tctaaaggac aattgagtat tttgacaaca ggactctaca gttttatctt 2520  
 tttagtgtgc atgtgttctc cttttttttt gcaaatagct tcacctatat aatacttcat 2580  
 ccattttatt agtacatcca tttagggttt agggttaatg gtttttatag actaatffff 2640  
 ttagtacatc tattttattc tatttttagcc tctaaattaa gaaaactaaa actctatfff 2700  
 agttttttta tttaatagtt tagatataaa atagaataaa ataaagtgc taaaaattaa 2760  
 acaaatacc ttttaagaaat taaaaaaact aaggaaacat tttcttgtt tcgagtagat 2820  
 aatgccagcc tgttaaacgc cgtcgacgag tctaacggac accaaccagc gaaccagcag 2880  
 cgtcgcgtcg ggccaagcga agcagacggc acggcatctc tgtcgtgccc tctggacccc 2940  
 tctcgagagt tccgctccac cgttggactt gctccgctgt cggcatccag aaattgcgtg 3000  
 gcggagcggc agacgtgagc cggcacggca ggcggcctcc tctctctc acggcacccg 3060  
 cagctacggg ggattccttt cccaccgctc cttecgcttc ccttctcgc ccgccgtaat 3120  
 aaatagacac cccctccaca ccctctttcc ccaacctcgt gttgttcgga gcgcacacac 3180  
 acacaaccag atctccccc aatccaccgg tcggcacctc cgcttcaagg tacgccgctc 3240  
 gtctccccc ccccccccc tctctacctt ctctagatcg gcgttccggt ccatgcatgg 3300

ES 2 586 380 T3

ttagggccccg gtagttctac ttctgttcat gtttgtgtta gatccgtggt tgtgttagat 3360  
 ccgtgctgct agcgttcgta cacggatgcg acctgtacgt cagacacggt ctgattgcta 3420  
 acttgccagt gtttctcttt ggggaatcct gggatggctc tagccgttcc gcagacggga 3480  
 tcgatttcat gatttttttt gtttcgttgc atagggtttg gtttgcctt ttcctttatt 3540  
 tcaatatatg ccgtgcactt gtttgtcggg tcatcttttc atgctttttt ttgtcttggg 3600  
 tgtgatgatg tggctctggtt gggcggctgt tctagatcgg agtagaattc tgtttcaaac 3660  
 tacctggtgg atttattaat tttggatctg tatgtgtgtg ccatacatat tcatagttac 3720  
 gaattgaaga tgatggatgg aaatatcgat ctaggatagg tatacatggt gatgcggggt 3780  
 ttactgatgc atatacagag atgctttttg ttcgcttggg tgtgatgatg tgggtgtggt 3840  
 gggcggctgt tcattcgttc tagatcggag tagaatactg tttcaaacta cctggtgtat 3900  
 ttattaattt tggaaactgta tgtgtgtgtc atacatcttc atagttacga gtttaagatg 3960  
 gatggaata tcgatctagg ataggtatac atgttgatgt gggttttact gatgcatata 4020  
 catgatggca tatgcagcat ctattcatat gctctaacct tgagtaccta tctattataa 4080  
 taaacaagta tgttttataa ttatttcgat cttgatatac ttggatgatg gcatatgcag 4140  
 cagctatatg tggatttttt tagccctgcc ttcatacgtc atttatttgc ttggtactgt 4200  
 ttcttttgtc gatgctcacc ctggtgtttg gtgttacttc tgcagggtac ccccggggtc 4260  
 gaccatggct catgctgcc tcagccctct ctcccaacgc tttgagagaa tagctgtcca 4320  
 gccactcact ggtgtccttg gtgctgagat cactggagtg gacttgaggg aaccacttga 4380  
 tgacagcacc tggaatgaga tattggatgc ettccacact taccaagtca tctactttcc 4440  
 tggccaagca atcaccaatg agcagcacat tgcattctca agaaggtttg gaccagtga 4500  
 tccagtgcct cttctcaaga gcattgaagg ctatccagag gttcagatga tccgcagaga 4560  
 agccaatgag tctggaaggg tgattggtga tgactggcac acagactcca ctttccttga 4620  
 tgcacctcca gctgctggtg tgatgagggc catagatggt cctgagcatg gcggagacac 4680  
 tgggttcctt tcaatgtaca cagcttggga gacctgtct ccaaccatgc aagccaccat 4740  
 cgaagggtc aacgttgtgc actctgccac acgtgtgttc ggttcctct accaagcaca 4800  
 gaaccgtcgc ttcagcaaca cctcagtcaa ggtgatggat gttgatgctg gtgacagaga 4860  
 gacagtccat cccttgggtg tgactcatcc tggctctgga aggaaaggcc tttatgtgaa 4920  
 tcaagtctac tgtcagagaa ttgagggcat gacagatgca gaatcaaagc cattgcttca 4980  
 gttcctctat gagcatgcca ccagatttga cttcacttgc cgtgtgaggt ggaagaaaga 5040  
 ccaagtccct gtctgggaca acttgtgcac catgcaccgt gctgttcctg actatgctgg 5100  
 caagttcaga tacttgactc gcaccacagt tgggtggagtt aggccctgcc gctgagtagt 5160  
 tagcttaatc acctagagct cgtttaaact gagggcactg aagtcgcttg acgtgctgaa 5220

ES 2 586 380 T3

|             |             |             |             |             |             |      |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| ttgtttgtga  | tgttggtggc  | gtatthttgtt | taaataagta  | agcatggctg  | tgatthttatc | 5280 |
| atatgatcga  | tctttgggggt | tttatttaac  | acattgtaaa  | atgtgtatct  | attaataact  | 5340 |
| caatgtataa  | gatgtgttca  | ttcttcggtt  | gccatagatc  | tgcttatttg  | acctgtgatg  | 5400 |
| ttttgactcc  | aaaaaccaa   | atcacaactc  | aataaactca  | tggaatatgt  | ccacctgttt  | 5460 |
| cttgaagagt  | tcatctacca  | ttccagttgg  | catttatcag  | tgttgcagcg  | gcgctgtgct  | 5520 |
| ttgtaacata  | acaattgtta  | cggcatatat  | ccaatagcgg  | ccggcctcct  | gcagggttta  | 5580 |
| aacttgccgt  | ggcctattht  | cagaagaagt  | tccaatagt   | agtccaaaat  | ttttgtaacg  | 5640 |
| aagggagcat  | aatagttaca  | tgcaaaggaa  | aactgccatt  | cttttagagg  | gatgcttggt  | 5700 |
| taagaacaaa  | aatatatca   | ctttcttttg  | ttccaagtca  | ttgcgtatth  | ttttaaaaat  | 5760 |
| atthgttctc  | tcgtatatth  | cgagcttcaa  | tcactthtat  | gthctthtga  | ttctggctth  | 5820 |
| gctgtaaadc  | gtagctaacc  | ttcttcctag  | cagaaattat  | taatacttgg  | gatatththt  | 5880 |
| tagaatcaag  | taaattacat  | attaccacca  | catcgagctg  | ctthtaaat   | catattacag  | 5940 |
| ccatataggc  | ttgattcatt  | ttgcaaaaat  | tccaggatat  | tgacaacgth  | aacttaataa  | 6000 |
| tatcttgaaa  | tattaaagct  | attatgatta  | ggggtgcaaa  | tggaaccgag  | tggttcggth  | 6060 |
| tatatcaaaa  | tcaaaccaa   | ccaactatat  | cggthtgat   | tggttcggth  | ttgccgggth  | 6120 |
| ttcagcattt  | tctggththt  | ththtgthtag | atgaatatta  | ththtaactt  | actthgtcaa  | 6180 |
| atththtgata | agtaaatata  | tgtgttagta  | aaaattaath  | thththtaca  | acatatgatc  | 6240 |
| tattaaaata  | ttcttatagg  | agaaththct  | taataacaca  | tgataththt  | thththtagt  | 6300 |
| cgtthtgacta | atththctgth | gatgtacact  | ttcaaagtht  | accaaathth  | gtaathaagt  | 6360 |
| ataaaaatca  | atatgatacc  | taaataatga  | tatgttctat  | thtaaththta | attatcgaaa  | 6420 |
| thtcaacttca | aattcgaaaa  | agatatataa  | gaaththtgat | agaththtgac | atatgaatat  | 6480 |
| ggaagaacaa  | agagattgac  | gcaththtagt | aacacttgat  | aagaaagtga  | tcgtacaacc  | 6540 |
| aathththta  | agthtaataa  | aatggagcac  | thcataththt | acgaaatath  | acatgccaga  | 6600 |
| agagtcgcaa  | ataththctag | atathththt  | aagaaaathc  | tataaaaagt  | cttaaaaggca | 6660 |
| tatatataaa  | aactatata   | thtataththt | tacccaaaag  | caccgcaagg  | ggtagccctg  | 6720 |
| ggtgtgcgga  | cggactctaa  | acaccgacag  | ctggcgcgcc  | aggtaggggg  | tgtgtctthg  | 6780 |
| atctgagcta  | gctcaatgac  | cattacctcc  | aatgcaaga   | tcgcccttcg  | ccccgggact  | 6840 |
| atgtthtgct  | ttggaaccat  | ctcatccata  | gcagatgaag  | agggaactct  | gcaccgcata  | 6900 |
| gcagatctat  | tggagaagaa  | gctthctctca | gaaatctoga  | ggggagccag  | ggcagaacag  | 6960 |
| cgggtggcac  | catcaccgc   | acctcaagcg  | aagatgacct  | cttacaacc   | gaaagtcggg  | 7020 |
| agctcaccta  | cccgaaaaac  | tccgctgtcc  | acttcgcca   | caaaggagtg  | gacacggatt  | 7080 |
| actcgaaaga  | aggaagcgag  | tgtcccgagt  | caggggacgg  | gaacacgcca  | agccatctth  | 7140 |
| ccgacgcctt  | cgcctcaaa   | tgaggatgga  | aagaagagcg  | ccatcgcgct  | ggctcctthc  | 7200 |

ES 2 586 380 T3

tacccccgacg tcctcttcat cagggggaga ttggagttag cacccttctt caacgatgag 7260  
ccaacccatgc aaggggaaga gcctccccag cgtgagggcg gacgacggag gaatagaagc 7320  
cagaacgtgc ggcgacatca cgaggctggg gaacgggatc cggcgcaacc cgtatccccg 7380  
gacgaagctt tagaagtagg aaaaactccc gacgagtggg tacaccgaga aaggcggaac 7440  
tctcgcgcc gtgatcgccg acaagcttag gaccgagaac gagagcaagc cgagcaaggt 7500  
gcaaggctgc gccgagagaa tgctctcttt gctcggaacc tgtaccccg cttcgtctgt 7560  
gcaatgaaca cgccgagtga agtcggaggg gtactggccc agatagctga cggcctcccc 7620  
cgaaccctag acacggaagg ctaccggcgg ctgcttactc gagcagttaa tcaccttcta 7680  
cccatcacta atcctccaag cgacctacgc catgcoatca acagccggcg agacacgcgg 7740  
agctccatca acgcttcgcg cgaccgatga cacgaaagtg agatagggaa ccgagaggag 7800  
tatgtccgag atcatgccat cctggcatga agtcatgcca cccgagctga gtcggttgcg 7860  
gcctcgacca gtgtcccgtt ccagggacga tcaagatgac acacaactgg ctccccctct 7920  
tgggaccgac ctacgaacg ccgacatgaa gacacgtgcg gagtcttcgc acttactccg 7980  
tgtctccggg ccatccagtg gccctaact tcaaggtctc caacgtcagc aagtatgagc 8040  
gcaagcagga cctgggtggc tggttagcca tctacacgat tgtcacatgg gccgccggag 8100  
cgacggagga cgtgatgaca gtgtattttc ccattgtcct agggcaagac gcaatgcagt 8160  
ggctccgaca tctaccccaa cattgcatag acaattggag cgacttcagt tgggtgcttca 8220  
tcgccaactt ccagtccctc tttgacaagc cggcgcagcc atgggaccta aatccattg 8280  
ggcatcaggg cgatgaaacg ctccggttgt acctcaagag gttttagacc atgaggaacc 8340  
acacccccga agtcgccgag gcgggggtga ttgaagactt ctaccgagga tccaatgact 8400  
cggctttcgt ccgagccata ctccagaaaa gcgtcggcca cctccgaaca cttgttccgg 8460  
gaggcagacc tctacatcac cacggattaa cgggccagg acctcatcgg aggcacgaaa 8520  
gccgcgccac acgcgccacg gtgtgacacg aaccagc 8557

<210> 2  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador directo del evento

<400> 2  
attctggctt tgctgtaaat cgt 23

<210> 3  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador inverso del evento  
  
 <400> 3  
 ttacaatcaa cagcaccgta cctt 24  
  
 <210> 4  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda del evento  
  
 <400> 4  
 ctaaccttca ttgtattcc 19  
  
 <210> 5  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador directo de referencia  
  
 <400> 5  
 tggcggacga cgacttgt 18  
  
 <210> 6  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador inverso de referencia  
  
 <400> 6  
 aaagtttgga ggctgccgt 19  
  
 <210> 7  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de referencia  
  
 <400> 7  
 cgagcagacc gccgtgtact tctacc 26  
  
 <210> 8  
 <211> 73  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Amplicón del evento  
  
 <400> 8  
 ttacaatcaa cagcaccgta ccttgaagcg gaatacaatg aaggtagct acgattaca 60

**gcaaagccag aat** **73**

**<210> 9**

**<211> 79**

**<212> ADN**

**<213> Secuencia artificial**

**<220>**

**<223> Amplicón de referencia**

**<400> 9**

**tggcggacga cgacttgtcc gagcagaccg ccgtgtactt ctacctgctc aagggcacgg** **60**

**acggcagcct ccaaacttt** **79**

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para determinar la cigosidad de una planta de maíz que comprende un evento de AAD-1 de maíz DAS-40278-9, comprendiendo dicho evento una construcción transgénica que comprende un gen AAD-1, estando dicha construcción transgénica flanqueada por ADN genómico de maíz flanqueante en 5' y por ADN genómico de maíz flanqueante en 3', comprendiendo dicho método:
  - a. un primer cebador del evento y un segundo cebador del evento, en los que dicho primer cebador del evento se une específicamente a dicha construcción transgénica tal y como se define por los restos 1.874-6.689 de la SEQ ID NO: 29, dicho segundo cebador del evento se une específicamente con dicho ADN genómico de maíz flanqueante en 5' tal y como se define por los restos 1-1.873 de SEQ ID NO: 29 o con dicho ADN genómico de maíz flanqueante en 3' tal y como se define por los restos 6.690-8.557 de SEQ ID NO: 29, y en donde dicho primer cebador del evento y dicho segundo cebador del evento producen un amplicón del evento cuando se someten a una reacción de PCR
  - b. un cebador directo de referencia y un cebador inverso de referencia que producen un amplicón de referencia a partir de un gen endógeno de referencia de maíz cuando se someten a una reacción de PCR, en donde dicho gen de referencia:
    - i. es un gen Invertasa endógeno *de Zea Mays*; o
    - ii. comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7 o una secuencia que tenga al menos un 90% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias mencionadas anteriormente,
  - c. una sonda fluorescente del evento que hibrida con dicho amplicón del evento,
  - d. una sonda fluorescente de referencia que hibrida con dicho amplicón de referencia;

someter dicha muestra de contacto a un ensayo de sondas de hidrólisis basado en la fluorescencia que libera la fracción fluorescente de la sonda de la fracción inhibidora de la fluorescencia de la sonda;

cuantificar dicha sonda fluorescente del evento que ha hibridado con dicho amplicón del evento;

cuantificar dicha sonda fluorescente de referencia que ha hibridado con dicho amplicón de referencia;

comparar la cantidad de sonda fluorescente hibridada del evento con la de sonda fluorescente hibridada de referencia; y

determinar la cigosidad de DAS-40278-9 mediante la comparación de los índices de fluorescencia de la sonda fluorescente hibridada del evento y de la sonda fluorescente hibridada de referencia.
2. El método de la reivindicación 1, en el que dichos amplicones consisten en 50-100 restos.
3. El método de la reivindicación 1, en el que dicho segundo cebador del evento se une a los restos 1.673-1.873 de SEQ ID NO: 29 o a su secuencia complementaria o a 6.690-6.890 de SEQ ID NO: 29.
4. El método de la reivindicación 1, en el que dicho método es utilizado para la identificación de líneas de maíz resistentes a herbicidas.
5. El método de la reivindicación 1, en el que dicho amplicón del evento tiene 73 pares de bases.
6. El método de la reivindicación 1, en el que dichos cebadores de referencia comprenden SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, y dicha sonda de referencia comprende SEQ ID NO: 7.
7. El método de la reivindicación 1, en el que dichas sondas están marcadas con un marcador de fluorescencia y con un inhibidor de fluorescencia.
8. El método de la reivindicación 7, en el que dicha sonda del evento comprende FAM como dicho marcador de fluorescencia en el extremo 5' de dicha sonda del evento y un inhibidor de fluorescencia MGB en el extremo 3' de dicha sonda del evento.
9. El método de la reivindicación 1, en el que dicho amplicón de referencia es un fragmento de 79 pares de bases amplificado por dichos cebadores.

10. El método de la reivindicación 1, en el que dicho amplicón del evento consiste en SEQ ID NO: 8 y dicho amplicón de referencia consiste en SEQ ID NO: 9.
11. El método de la reivindicación 1, en el que dicha sonda del evento comprende SEQ ID NO: 4.
- 5 12. El método de la reivindicación 1, en el que dichos cebadores del evento son seleccionados del grupo compuesto por SED ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3.
13. El método de la reivindicación 1, en el que los resultados de dicho método son leídos directamente en un lector de placas.
14. El método de la reivindicación 1, en el que dicha muestra de ADN es obtenida de una planta de maíz en un campo.
- 10 15. Un kit para llevar a cabo el método de la reivindicación 1, consistiendo dicho kit en un primer cebador del evento definido por SEQ ID NO: 2, un segundo cebador del evento definido por SEQ ID NO:3, un cebador directo de referencia definido por SEQ ID NO: 5, un cebador inverso de referencia definido por SEQ ID NO: 6, una sonda del evento definida por SEQ ID NO: 4, y una sonda de referencia definida por SEQ ID NO: 7.

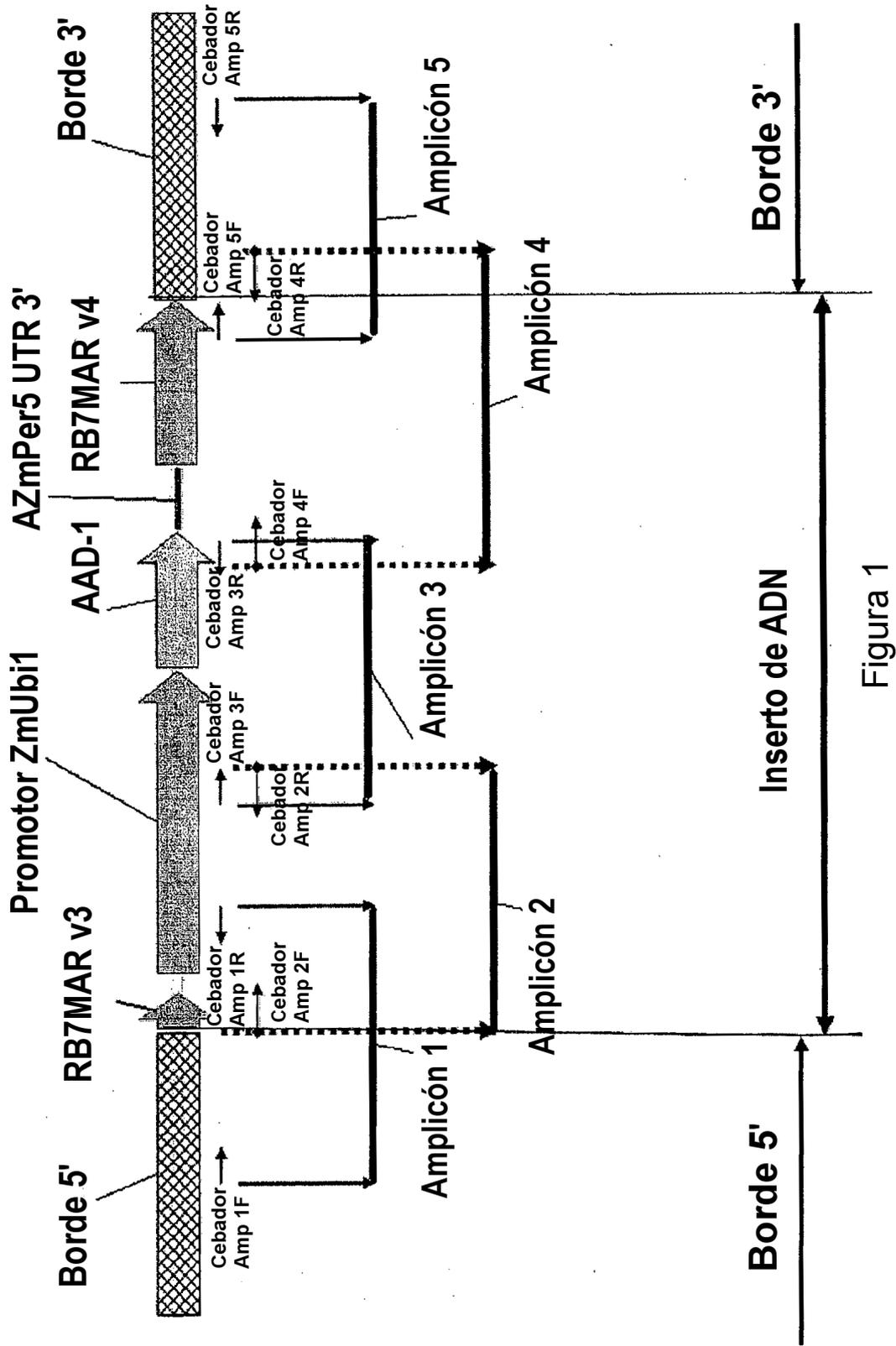


Figura 1

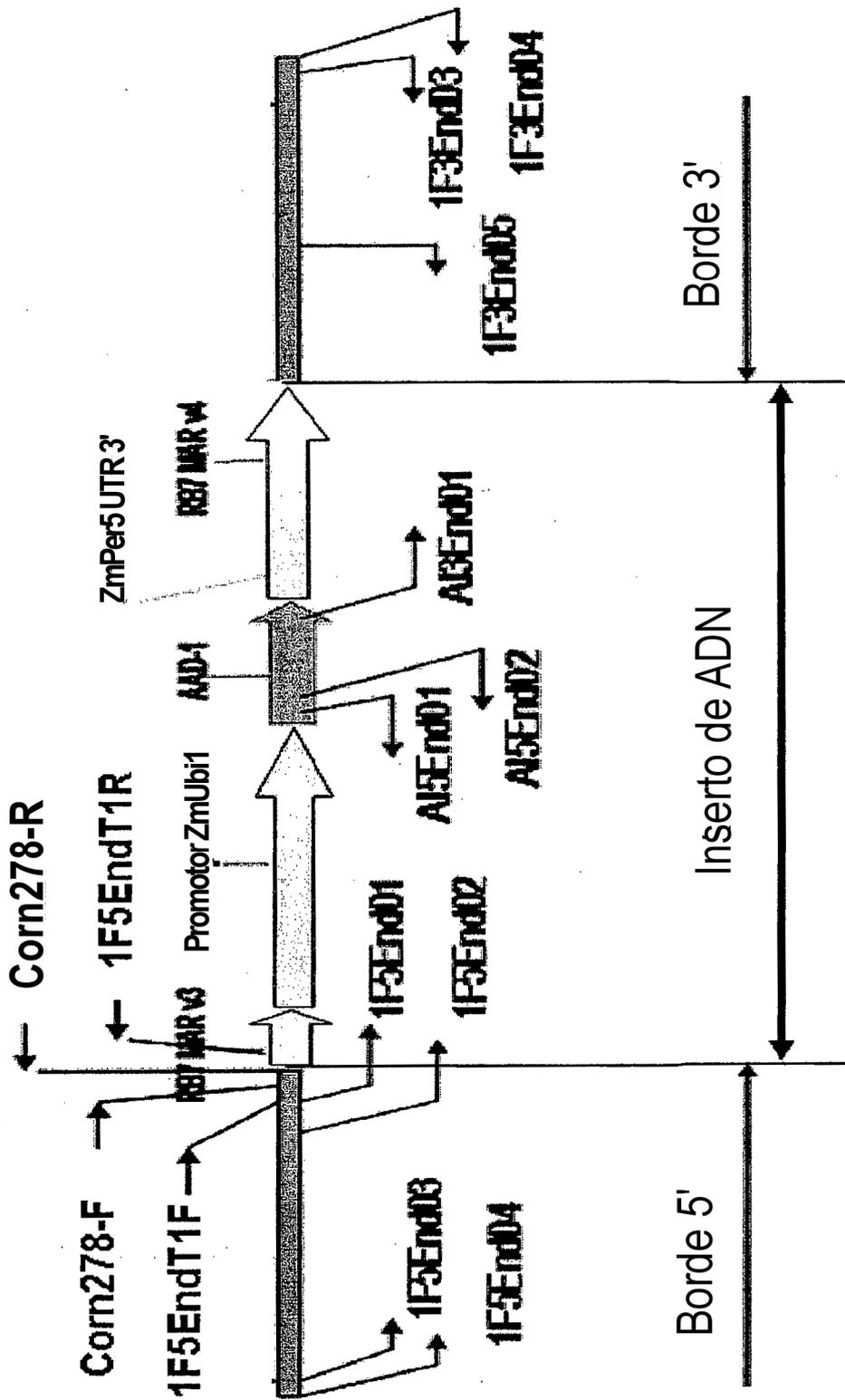


Figura 2

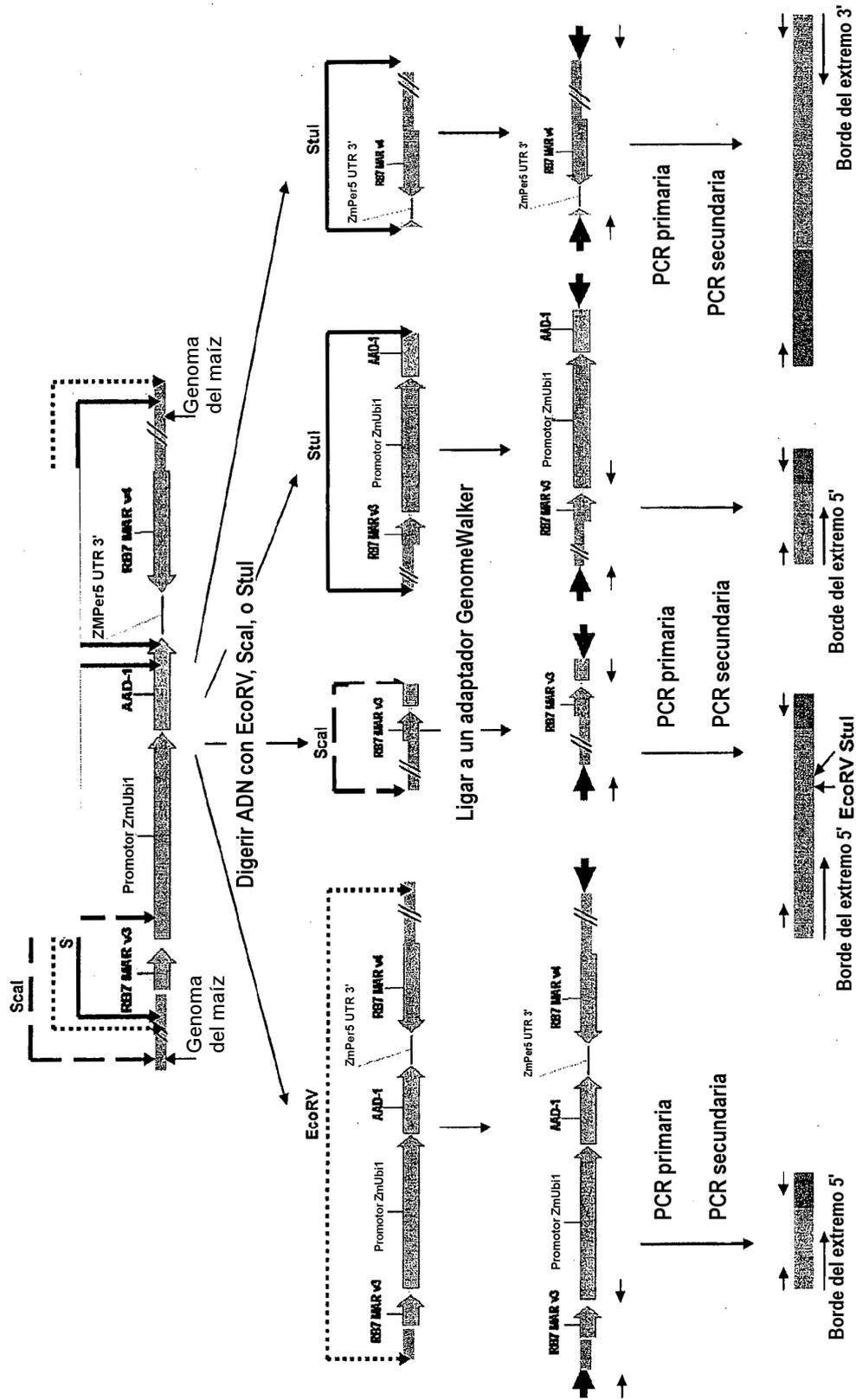


Figura 3