

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 590 177**

51 Int. Cl.:

A01H 1/04 (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: **26.02.2009 E 13158396 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.06.2016 EP 2602325**

54 Título: **Acontecimiento de planta de maíz MON87460 y composiciones y procedimientos para la detección del mismo**

30 Prioridad:

29.02.2008 US 32568 P

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

18.11.2016

73 Titular/es:

**MONSANTO TECHNOLOGY LLC (100.0%)
800 North Lindbergh Boulevard
St. Louis, Missouri 63167, US**

72 Inventor/es:

**BEAZLEY, KIM A.;
CASTIGLIONI, PAOLO;
DIZIGAN, MARK A.;
KELLY, REBECCA A.;
KORTE, JOHN A.;
ROCK, AMANDA y
VOYLES, CHRISTINE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 590 177 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

Acontecimiento de planta de maíz MON87460 y composiciones y procedimientos para la detección del mismo

Campo de la invención

5 En el presente documento se divulgan células, semillas y plantas transgénicas que incluyen ADN recombinante que expresa una proteína de choque frío que confiere a las plantas mejor tolerancia al estrés y/o mejor rendimiento. La divulgación también incluye procedimientos para usar y detectar dichas células, semillas y plantas. En particular, la presente invención se refiere a plantas de maíz tolerantes al estrés designadas MON87460 y a procedimientos y composiciones para detectar la presencia de ADN de MON87460 en una muestra.

Antecedentes de la invención

10 Tanto los agricultores como los productores de semillas desean plantas transgénicas con rasgos agronómicos mejorados, tales como rendimiento, tolerancia al estrés ambiental, resistencia a plagas, tolerancia a herbicidas, composiciones de semilla mejoradas y similares. Aunque los considerables intentos en el cultivo de plantas han proporcionado ganancias significativas en cuanto a los rasgos deseados, la capacidad para introducir ADN específico en los genomas vegetales proporciona oportunidades adicionales para la generación de plantas con rasgos mejorados y/o únicos.

Sumario de la invención

En el presente documento se proporcionan composiciones y procedimientos relacionados con plantas de maíz transgénicas tolerantes al estrés por déficit de agua designadas MON87460 la y descendencia y poblaciones de las mismas.

20 En un aspecto, la presente invención proporciona una planta de maíz transgénica que contiene un cromosoma que comprende un inserto de polinucleótido heterólogo que expresa un gen cspB regulado por un promotor de la actina de arroz truncado, en el que dicho cromosoma comprende una subsecuencia de la SEQ ID NO: 24 en la que se escinde el gen del marcador seleccionable de la neomicina fosfotransferasa de tipo II localizado entre los sitios lox y en el que dicho inserto de polinucleótido heterólogo confiere a dicha planta de maíz una mejor tolerancia al déficit de agua. Otro aspecto de la invención comprende plantas descendientes o semillas o partes regenerables de las plantas mencionadas anteriormente.

25 Otro aspecto de la invención proporciona polinucleótidos que comprenden una región de unión transgénica/genómica de la planta de maíz MON87460. En particular, se proporciona una composición que comprende una secuencia polinucleotídica que es diagnóstica de la presencia de ADN de MON87460, en la que el polinucleótido tiene la secuencia expuesta en las SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 25.

30 También se divulga un núcleo de una célula de maíz del acontecimiento MON87460, en el que dicho núcleo comprende un cromosoma que tiene un inserto de polinucleótido heterólogo que proporciona mejor tolerancia al déficit de agua, en el que dicho polinucleótido heterólogo comprende una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4. Es de particular interés un cromosoma en el que el polinucleótido heterólogo comprende un promotor de la actina de arroz truncado para la expresión de un gen cspB, y en el que dicho promotor de la actina de arroz truncado está adyacente a la secuencia genómica de maíz de SEQ ID NO: 5. También se divulga un cromosoma de maíz que comprende la SEQ ID NO: 1 y un inserto transgénico heterólogo que comprende un promotor de la actina de arroz truncado que está unido operativamente a un gen cspB. Un extremo 5' del inserto transgénico heterólogo puede solapar con un extremo 3' de la SEQ ID NO: 1 en ciertas realizaciones. El cromosoma de maíz puede comprender la SEQ ID NO: 7 o la SEQ ID NO: 24. Un cromosoma se puede localizar dentro de una célula de maíz que también contiene un segundo polinucleótido heterólogo no ligado para la expresión de una proteína 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato sintasa (CP4 EPSPS) resistente a glifosato. También se divulgan plantas o semillas que comprenden cualquiera de los cromosomas de maíz.

35 Otro aspecto de la invención es un producto alimenticio procesado para alimentación humana o animal preparado a partir de una semilla de maíz que tiene un cromosoma que comprende un polinucleótido de la unión transgénico/genómico de SEQ ID NO: 1 y un inserto transgénico heterólogo que comprende un promotor de la actina de arroz truncado que está unido operativamente a un gen cspB, en el que el extremo 5' de dicho inserto solapa con un extremo 3' de la SEQ ID NO: 1, en el que el producto alimenticio procesado para alimentación humana o animal comprende una cantidad detectable de un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2, o una complementaria de las mismas. En ciertas realizaciones, el producto alimenticio procesado para alimentación humana o animal comprende sémola de maíz, harina de maíz o gluten de maíz. En ciertas realizaciones, el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 4 o una complementaria de las mismas. En otras realizaciones, el polinucleótido puede comprender además una secuencia de nucleótidos contenida en las SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 24.

55 En un procedimiento de detección de ADN se puede usar un par de cebadores de nucleótidos, en el que el par de cebadores, cuando se utiliza en un procedimiento de amplificación de ácido nucleico, produce un amplicón que

contiene una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4. La detección de una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4 en un amplicón producido de esta manera es diagnóstica de la presencia de ácidos nucleicos de una planta de maíz MON87460 en la muestra analizada en el procedimiento de detección. Dichos procedimientos comprenden: (a) poner en contacto la muestra que comprende el ADN genómico de MON87460 con un par de cebadores del ADN; y (b) realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico, produciendo de este modo un amplicón; y (c) detectar el amplicón, en el que el amplicón comprende las SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4.

También se divulgan procedimientos para detectar la presencia de ADN que corresponde específicamente al ADN de la planta de maíz MON87460 en una muestra. Dichos procedimientos comprenden: (a) poner en contacto la muestra que comprende ADN de MON87460 con una sonda de ADN que comprende una cualquiera de la SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4, o moléculas de ADN sustancialmente homólogas a la SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4 que hibridan en condiciones de hibridación rigurosas con el ADN genómico de la planta de maíz MON87460 y que no hibridan en condiciones de hibridación rigurosas con ADN de planta de maíz que no es MON87460; (b) someter la muestra y la sonda a condiciones de hibridación rigurosas; y (c) detectar la hibridación de la sonda con el ADN de la planta de maíz MON87460.

También se divulgan procedimientos para producir plantas de maíz tolerantes al estrés por déficit de agua y comprenden la etapa de cruzar una primera planta de maíz homocigota parental de acontecimiento MON87460 con una segunda planta de maíz homocigota parental que carece del rasgo de tolerancia al estrés por déficit de agua, produciendo de este modo plantas descendientes híbridas tolerantes al estrés por déficit de agua. En ciertas realizaciones se proporciona un procedimiento para producir una planta de maíz tolerante a la sequía que comprende cruzar una primera planta de maíz parental tolerable a la sequía que comprende una SEQ ID NO: 1 y un inserto transgénico heterólogo que comprende un promotor de actina de arroz truncado que está unido operativamente a un gen *cspB*, y una segunda planta de maíz parental, produciendo de este modo una pluralidad de plantas descendientes tolerantes a la sequía. En otras realizaciones, el inserto puede comprender la SEQ ID NO: 7 o la SEQ ID NO: 24.

Otro aspecto de la invención es un procedimiento para determinar la cigosidad de un inserto de polinucleótido heterólogo que confiere a una planta de maíz transgénica una tolerancia mejorada al déficit de agua, en el que dicho procedimiento comprende poner en contacto una muestra de ADN de una planta de maíz transgénica o semilla que contiene un cromosoma que tiene el inserto de polinucleótido heterólogo de la secuencia SEQ ID NO: 24 o de una subsecuencia de la SEQ ID NO: 24, en el que el gen marcador seleccionable de la neomicina fosfotransferasa de tipo II localizado entre los sitios *lox* es escindido con un conjunto de cebadores que comprenden un primer conjunto de cebadores para la producción de un amplicón de ADN de maíz transgénico que tiene SEQ ID NO: 1 o 2 que es diagnóstico del cromosoma que tiene el inserto de polinucleótido heterólogo, un segundo conjunto de cebadores para la producción de un amplicón de ADN de maíz no transgénico en el sitio de inserción, someter la muestra contactada a amplificación del polinucleótido y uso de sondas para la detección del amplicón de ADN de maíz transgénico y el amplicón de ADN de maíz no transgénico, en el que la presencia de únicamente el amplicón de ADN de maíz transgénico del primer conjunto de cebadores indica que el ADN es homocigoto para el inserto de polinucleótido heterólogo y la presencia de amplicones producidos a partir del primero y el segundo conjuntos de cebadores indica que el ADN es heterocigoto para el inserto de polinucleótido heterólogo, de modo que se determina la cigosidad del inserto de polinucleótido heterólogo.

También se divulgan semillas de maíz híbridas que comprenden en su genoma una cualquiera de la SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4, en las que al menos un padre en el cruce usado para crear dicha semilla híbrida es MON87460.

Otras realizaciones específicas de la invención se divulgan en la siguiente descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 proporciona un mapa plasmídico de pMON73608.

La figura 2 ilustra la organización genómica del inserto del transgén en la planta de maíz MON87460.

La figura 3 proporciona la secuencia (SEQ ID NO: 24) del transgén y la región de unión de ADN genómico de MON87460. La secuencia de ADN flanqueante genómica de maíz se muestra en letras minúsculas. La secuencia del transgén insertada de pMON73608 se muestra en letras mayúsculas.

Descripción detallada de la invención

Una planta de maíz transgénica, denominada en el presente documento "MON87460" o "Acontecimiento CspB-Zm MON87460" es tolerante al estrés por déficit de agua como resultado de la expresión de una proteína *cspB* de *E. coli* en las células de dicha planta transgénica. El uso del maíz tolerante al estrés por déficit de agua proporcionará beneficios importantes a los cultivadores de maíz, proporcionando por ejemplo rendimientos de cosechas un 5-10 % mayor en acres de tierra firme occidental donde las precipitaciones medias anuales son insuficientes para mantener un rendimiento agrícola eficaz de plantas de maíz silvestres. Adicionalmente, las plantas de maíz MON87460 proporcionan el beneficio de garantía de sequía en el cinturón del maíz central, oriental y meridional proporcionando mayores producciones de cultivo en condiciones de sequía en comparación con las plantas de maíz silvestres. Los

cultivadores de maíz también se beneficiarán de ahorros en el coste de la irrigación en las regiones en las que el maíz típicamente se cultiva con irrigación.

Como se usa en el presente documento, “déficit de agua” significa un periodo en el que el agua disponible para una planta no se repone a la velocidad a la que es consumida por la planta. Un largo periodo de déficit de agua se denomina coloquialmente sequía, que puede dar como resultado la pérdida de un cultivo, incluso un cultivo activado con los cromosomas de la presente invención. La falta de lluvia o irrigación puede no producir un inmediato estrés por agua si hay un depósito de agua subterránea disponible para la tasa de crecimiento de las plantas. Las plantas cultivadas en suelo con abundante agua subterránea pueden sobrevivir días sin lluvia o irrigación, sin que se produzcan efectos adversos en la producción. Las plantas cultivadas en suelo seco probablemente padezcan efectos adversos con periodos mínimos de déficit de agua. El estrés grave por agua puede provocar marchitamiento y muerte de las plantas; la sequía moderada puede provocar reducción de la producción, atrofia del crecimiento o retraso del desarrollo. Las plantas pueden recuperarse de algunos periodos de estrés por agua sin que haya afectado significativamente a la producción. Sin embargo, el estrés por agua en el momento de la polinización puede tener un efecto irreversible de reducción de la producción. Por lo tanto, un periodo útil en el ciclo de vida del maíz para observar la tolerancia al estrés por agua es el estadio vegetativo tardío del crecimiento antes del espigamiento. La prueba de la tolerancia al estrés por agua con frecuencia se realiza mediante la comparación con plantas de control. Por ejemplo, las plantas de la presente invención pueden sobrevivir al déficit de agua con una producción mayor que las plantas de control. En el laboratorio y en ensayos de campo, la sequía puede simularse proporcionando a las plantas de la presente invención y a las plantas de control menos agua que una planta de control regada de forma óptima y midiendo las diferencias en los rasgos.

La planta de maíz MON87460 se produjo por transformación mediada por *Agrobacterium* de una línea de maíz endogámica con el vector pMON73608 (Figura 1). Este vector contiene la región de codificación *mspB* regulada por el promotor de la actina de arroz, el intrón de la actina de arroz y la secuencia de poliadenilación tr7 3', y una región de codificación *nptII* regulada por el promotor 35S del CaMV, y la secuencia de poliadenilación NOS 3'. Se caracterizaron los acontecimientos generados a partir del vector pMON73608 mediante análisis molecular detallado.

Un acontecimiento transgénico en una planta se produce cuando se inserta ADN recombinante en una localización en un cromosoma en el núcleo. Es estadísticamente improbable que dos acontecimientos transgénicos separados cualesquiera sean iguales. Las plantas reproducidas a partir de un acontecimiento específico generalmente tienen homogeneidad en el rasgo. No todos los acontecimientos transgénicos proporcionarán semillas de plantas, plantas o núcleos transgénicos de la presente invención debido a diversos factores tales como la localización, el número de copias y la integridad del ADN recombinante en el cromosoma, la inserción no intencionada de otro ADN. Como resultado se identifica un acontecimiento transgénico deseado mediante detección selectiva de la planta transformada o su semilla descendiente con respecto a la tolerancia potenciada al déficit de agua.

Se sabe que la expresión de genes extraños en plantas está influida por su posición en el cromosoma, quizás a causa de la estructura de la cromatina (por ejemplo, heterocromatina) o a la proximidad de los elementos de regulación de la transcripción (por ejemplo, potenciadores) cercanos al sitio de integración (Weising y col., Ann. Rev. Genet 22:421–477, 1988). Por esta razón, a menudo es necesario realizar una detección selectiva de un gran número de plantas con el fin de identificar una planta caracterizada por la expresión óptima de un gen de interés introducido. Por ejemplo, se ha observado en plantas y en otros organismos que puede haber una amplia variación en los niveles de expresión de un transgén introducido entre las plantas. También puede haber diferencias en los patrones de expresión espaciales y temporales, por ejemplo diferencias en la expresión relativa de un transgén en varios tejidos vegetales, que pueden no corresponder con los patrones previstos a partir de elementos reguladores de la transcripción presentes en la construcción génica introducida. Una planta que tiene los niveles o patrones deseados de la expresión del transgén es útil para la introgresión del transgén en otros fondos genéticos mediante cruzamiento sexual usando procedimientos de cultivo convencionales. La descendencia de dichos cruces mantiene las características de expresión del transgén del transformante original. Esta estrategia se usa para garantizar una expresión génica fiable en una serie de variedades que están bien adaptadas a las condiciones de crecimiento locales y a las demandas del mercado.

Los acontecimientos generados por la transformación con pMON73608 se sometieron a detección selectiva con respecto al número de insertos (número de sitios de integración dentro del genoma de maíz), número de copias (el número de copias del ADN-T dentro de un locus), la integridad de los casetes insertados y la ausencia de secuencia de cadena principal usando análisis de transferencia de tipo Southern. Las sondas incluyeron las regiones de codificación *mspB* and *nptII* intactas y sus respectivos promotores, intrones y secuencias de poliadenilación y la cadena principal del plásmido vector. A partir de aproximadamente 140 transformantes iniciales, se seleccionaron acontecimientos basándose en el número de copias y el análisis de la cadena principal con respecto al análisis fenotípico para identificar plantas que tienen un fenotipo mejorado a partir de la expresión de *mspB*. Los resultados de un ensayo basado en invernadero con respecto a la tolerancia al déficit de agua identificaron varios transformantes independientes que tenían tolerancia al déficit de agua. Los ensayos de campo de 22 transformantes seleccionados con respecto a la tolerancia al déficit de agua en condiciones de cultivo en campo dieron como resultado la identificación de 10 acontecimientos mejorados que se analizaron adicionalmente con respecto a la tolerancia al déficit de agua y estabilidad y mejora de la producción. Los resultados de estos análisis adicionales identificaron que MON87460 tenía fenotipos mejorados superiores. La caracterización molecular extensa de

MON87460 demostró que el acontecimiento contiene una única inserción de ADN-T con una copia de los casetes tanto *csxB* como *nptII*. El análisis de transferencia de tipo Northern confirmó que los transcritos del tamaño esperado tanto para *csxB* como para *nptII* se generaron en MON87460. Los datos también demuestran sorprendentemente que el fragmento del extremo derecho de *Agrobacterium* no está presente en MON87460 y que se ha producido un truncamiento del promotor de la actina de arroz que regula la expresión del gen *csxB*, de modo que solamente están presentes 108 pb (de 844 pb presentes en pMON73608) del ADN de promotor.

Se realizaron PCR y análisis de la secuencia del ADN para determinar los puntos de unión en 5' y 3' del inserto en el genoma de la planta, confirmar la organización de los elementos dentro del inserto (figura 2) y determinar la secuencia de ADN completa del inserto en la planta de maíz MON87460 (SEQ ID NO: 5). Los análisis confirmaron que el ADN-T en la planta en MON87460 es idéntico a la secuencia correspondiente de pMON73608. El análisis de la secuencia también identificó 1.060 pb en 5' y 1.260 pb en 3' de la secuencia flanqueante para el inserto de MON87460. La comparación con la secuencia del ADN silvestre de la línea endogámica usada para transformación mostró que se producía una delección de 22 pb del ADN genómico de maíz en el sitio de la integración del ADN-T de MON87460.

Es ventajoso poder detectar la presencia de ADN genómico/transgén de MON87460 para determinar si la descendencia de un cruce sexual contiene el ADN genómico/transgén de interés. Además, un procedimiento para detectar MON87460 es útil cuando se cumplen las regulaciones que requieren la aprobación previa a su comercialización y el marcaje de alimentos derivados de las plantas de cultivos recombinantes. Es posible detectar la presencia de un transgén mediante cualquier procedimiento de detección de ácido nucleico conocido, tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o hibridación de ADN usando sondas polinucleotídicas. Estos procedimientos de detección generalmente usan moléculas de sonda y de cebador de ADN que son específicas de los elementos genéticos, tales como promotores, líderes, intrones, regiones codificantes, terminadores de la transcripción 3' y genes marcadores, que son los componentes de los transgenes de una construcción de ADN. Dichos procedimientos pueden no ser útiles para diferenciar entre diferentes acontecimientos transgénicos, particularmente los producidos usando la misma construcción de ADN transgénico, a no ser que la secuencia de ADN genómico adyacente al ADN transgénico insertado sea conocida. También se divulgan secuencias y ensayos para la detección de nuevos puntos de unión de los extremos de ADN genómico/transgén de MON87460.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos científicos y técnicos usados tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención. Generalmente, la nomenclatura usada y los procedimientos de fabricación o de laboratorio descritos posteriormente se conocen bien y se emplean habitualmente en la técnica. Se usan procedimientos convencionales para estos procedimientos, tales como los proporcionados en la técnica y en diversas referencias generales. A menos que se indique lo contrario, se proporcionan las secuencias de ácido nucleico en el texto de la presente memoria descriptiva, cuando se lee de izquierda a derecha, en la dirección 5' a 3'. Las secuencias de ácido nucleico pueden proporcionarse como ADN o como ARN, según se especifique; la divulgación de una necesariamente define la otra, como sabe un experto habitual en la técnica. Además, la divulgación en el presente documento de una secuencia de ácido nucleico dada define necesariamente su secuencia complementaria, como sabe un experto habitual en la técnica. Cuando se proporciona un término en singular, los inventores también contemplan aspectos de la invención descritos por el plural de ese término. La nomenclatura usada y los procedimientos de laboratorio descritos posteriormente son los bien conocidos y empleados habitualmente en la técnica. Cuando haya discrepancias en términos y definiciones usados en las referencias que se incorporan por referencia, los términos usados en la presente solicitud tendrán las definiciones dadas. Otros términos técnicos usados tienen su significado habitual en la técnica en la que se usen, como se ilustra mediante diversos diccionarios técnicos. Pueden encontrarse definiciones de términos habituales en biología molecular en Rieger y col., *Glossary of Genetics: Classical and Molecular*, 5ª edición, Springer-Verlag: New York, 1991; y Lewin, *Genes V*, Oxford University Press: New York, 1994.

Como se usa en el presente documento, el término "maíz" significa *Zea mays* e incluye todas las variedades de plantas que se pueden cultivar con la planta de maíz MON87460.

Un "acontecimiento" transgénico se produce mediante la transformación de células vegetales con ADN heterólogo, es decir una construcción de ácido nucleico que incluye un transgén de interés, regeneración de una población de plantas resultante de la inserción del transgén en el genoma de la planta y selección de una planta concreta caracterizada por la inserción en una localización genómica concreta. Se dice que la descendencia transgénica que tiene el mismo núcleo con cromosomas heterocigotos u homocigotos para el ADN recombinante representa el mismo acontecimiento transgénico. Una vez que se ha introducido un transgén para un rasgo en una planta, ese gen puede introducirse en cualquier planta sexualmente compatible con la primera planta mediante cruce, sin necesidad de transformar directamente la segunda planta. El ADN heterólogo y la secuencia genómica flanqueante adyacente al ADN insertado se transferirá a la descendencia cuando el acontecimiento se use en un programa de cultivo y el rasgo potenciado resultante de la incorporación del ADN heterólogo en el genoma de la planta se mantendrá en la descendencia que recibe el ADN heterólogo.

El término "acontecimiento" también se refiere a la presencia de ADN del transformante original, que comprende el ADN insertado y la secuencia genómica flanqueante inmediatamente adyacente al ADN insertado, en una descendencia que recibe el ADN insertado que incluye el transgén de interés como resultado de un cruce sexual de

una línea parental que incluye el ADN insertado (por ejemplo, el transformante original y la descendencia resultante de la autofecundación) y una línea parental que no contiene el ADN insertado. El término "descendencia" indica los descendientes de cualquier generación de una planta parental preparada de acuerdo con la presente invención. Por tanto, un "acontecimiento" transgénico puede ser de cualquier generación. El término "acontecimiento" se refiere al transformante original y a la descendencia del transformante, que incluyen el ADN heterólogo. El término "acontecimiento" también se refiere a la descendencia producida por un cruzamiento sexual entre el transformante y otra variedad que incluya el ADN heterólogo. Incluso después de un retrocruzamiento repetido con un padre recurrente, el ADN insertado y el ADN flanqueante del padre transformado está presente en la descendencia del cruce en la misma localización cromosómica.

Se divulga el ADN del acontecimiento MON87460, células vegetales, tejidos, semillas y productos procesados derivados de MON87460. Las plantas de maíz MON87460 pueden autofecundarse para producir líneas endogámicas que sean homocigotas para los polinucleótidos MON87460. La semilla homocigota puede cultivarse para producir plantas de maíz con acontecimiento MON87460 con descendencia homocigota útiles para cruzar con otras plantas de maíz endogámicas para producir semilla de maíz híbrida heterocigota. La semilla de maíz híbrida MON87460 puede cultivarse para hibridar plantas de maíz que muestren tolerancia al déficit de agua y una producción potenciada en condiciones de estrés en comparación con las plantas de control.

Los productos que pueden derivar de MON87460 incluyen productos alimentarios y productos básicos producidos a partir del acontecimiento de maíz MON87460. Se espera que dichos productos alimentarios y productos básicos contengan polinucleótidos que, si se detectan en niveles suficientes, son diagnósticos de la presencia de materiales del acontecimiento de maíz MON87460 dentro de dichos productos básicos y productos alimentarios. Entre los ejemplos de dichos productos alimentarios y productos básicos se incluyen aceite de maíz, sémola de maíz, harina de maíz y gluten de maíz.

También debe entenderse que se pueden cruzar dos plantas transgénicas diferentes para producir descendencia que contenga dos genes exógenos añadidos de segregación independiente. La autofecundación de la descendencia adecuada puede producir plantas que son homocigotas para ambos genes exógenos añadidos. Como alternativa, pueden cruzarse líneas endogámicas que contengan los genes exógenos individuales para producir semilla híbrida que sea heterocigota para cada gen y útil para la producción de plantas de maíz híbridas que muestran múltiples fenotipos beneficiosos como resultado de la expresión de cada uno de los genes exógenos. Pueden encontrarse descripciones de procedimientos de cultivo de uso habitual para diferentes rasgos y cultivos en diversas referencias, por ejemplo, Allard, "Principles of Plant Breeding," John Wiley & Sons, NY, U. of CA, Davis, CA, 50-98, 1960; Simmonds, "Principles of Crop Improvement," Longman, Inc., NY, 369-399, 1979; Sneep y Hendriksen, "Plant Breeding Perspectives," Wageningen (ed), Center for Agricultural Publishing and Documentation, 1979. Es de particular interés en la presente invención el desarrollo de plantas de maíz con acontecimiento MON87460 que expresen la proteína *csxB*.

Como se usa en el presente documento cuando se hace referencia a una "molécula de ADN aislada", se entiende que la molécula de ADN es una que está presente, sola o en combinación con otras composiciones, pero no dentro de su ambiente natural. Por ejemplo, una secuencia de codificación, secuencia de intrón, secuencia líder no traducida, secuencia promotora, secuencia de terminación de la transcripción, y similares, que se encuentran de forma natural dentro del ADN de un genoma de maíz no se considera que estén aisladas del genoma de maíz siempre que estén dentro del genoma de maíz. Sin embargo, cada uno de estos componentes, y subpartes de estos componentes, estarían "aislados" dentro del alcance de la presente divulgación siempre que las estructuras y componentes no estén dentro del genoma de maíz.

Para los fines de la presente divulgación, cualquier secuencia de nucleótidos transgénica, es decir, la secuencia de nucleótidos del ADN insertado en el genoma de las células del acontecimiento de planta de maíz MON87460 se consideraría que es una secuencia de nucleótidos aislada si está presente dentro del plásmido usado para transformar células de maíz de las que surgió el acontecimiento MON87460, dentro del genoma del acontecimiento MON87460, presente en cantidades detectables en tejidos, descendencia, muestras biológicas o productos básicos derivados del acontecimiento MON87460. La secuencia de nucleótidos o cualquier fragmento derivado de la misma se consideraría que está aislada o se puede aislar si la molécula de ADN puede extraerse de células, o tejidos, u homogeneizado de una planta o semilla u órgano vegetal; o puede producirse como un amplicón de ADN o ARN extraído de células, o tejidos, u homogeneizado de una planta o semilla u órgano vegetal, cualquiera de los cuales deriva de dichos materiales derivados del acontecimiento MON87460. En este sentido, las secuencias de unión como se exponen en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2, y las secuencias de nucleótidos derivadas del acontecimiento MON87460 que también contienen estas secuencias de unión se consideran aisladas o aislables, si estas secuencias están presentes dentro del genoma de las células del acontecimiento MON87460 o presentes en cantidades detectables en tejidos, descendencia, muestras biológicas o productos básicos derivados del acontecimiento MON87460.

Como se usa en el presente documento, una unión transgénica/genómica es el punto en el que el ADN heterólogo de un vector de transformación que está insertado en el genoma está ligado al ADN genómico de la planta de maíz. Un polinucleótido de unión abarca la unión transgénica/genómica y es nuevo en cualquier acontecimiento de planta transgénica particular. Por lo tanto, la detección de un polinucleótido de unión en una muestra biológica es

diagnóstica de la presencia de un acontecimiento de planta específico. La presencia de polinucleótidos de unión de la SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4 en una muestra es diagnóstico de la presencia de ADN MON87460 en una muestra.

Una "sonda" es un polinucleótido al que está unido un marcador detectable o molécula indicadora convencional, por ejemplo un isótopo, ligando, agente quimioluminiscente o enzima radiactivo. Las sondas son complementarias de una cadena de un ácido nucleico diana, en el caso de la presente invención, de una cadena de ADN genómico de MON87460, bien de una planta MON87460 o bien de una muestra que incluye ADN de MON87460. Las sondas no solo incluyan ácidos desoxirribonucleicos o ribonucleicos sino también poliamidas y otros materiales sonda que se unen específicamente a una secuencia de ADN diana y que se puedan usar para detectar la presencia de dicha secuencia de ADN diana.

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

Las sondas de ADN y los cebadores de ADN son generalmente de 11 polinucleótidos o más de longitud, con frecuencia 18 polinucleótidos o más, 24 polinucleótidos o más o 30 polinucleótidos o más. Dichas sondas y cebadores se seleccionan de modo que tengan una longitud suficiente para hibridar específicamente con una secuencia diana en condiciones de hibridación de alta rigurosidad. Las sondas y cebadores pueden tener una similitud de secuencia completa con la secuencia diana, aunque las sondas que difieren de la secuencia diana y que conservan la capacidad de hibridar con las secuencias diana se pueden diseñar mediante procedimientos convencionales.

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

Las sondas y cebadores de ácido nucleico hibridan en condiciones rigurosas con una molécula de ADN diana. Cualquier procedimiento convencional de hibridación o amplificación de ácido nucleico se puede usar para identificar la presencia de ADN a partir de una planta transgénica en una muestra. Las moléculas de ácido polinucleico, también denominadas segmentos de ácido nucleico, o fragmentos de los mismos, son capaces de hibridar específicamente con otras moléculas de ácido nucleico en ciertas circunstancias. Como se usa en el presente documento, se dice que dos moléculas de ácido polinucleico son capaces de hibridar específicamente con otra su las os moléculas son capaces de formar una estructura de ácido nucleico bicatenario antiparalelo. Se dice que una molécula de ácido nucleico es la "complementaria" de otra molécula de ácido nucleico si exhiben una complementariedad completa. Como se usa en el presente documento, se dice que las moléculas exhiben una "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 pueden hibridar entre sí con una estabilidad suficiente como para permitirles que permanezcan hibridadas entre sí en, al menos, condiciones de "rigurosidad baja". De un modo similar, se dice que dos moléculas son "complementarias" si pueden hibridar entre sí con una estabilidad suficiente como para permitirles que permanezcan hibridadas entre sí en condiciones convencionales de "rigurosidad alta". Las condiciones de rigurosidad convencionales se describen en Sambrook y col., 1989, y en Haymes y col., en: *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, DC (1985). Por tanto, se permiten desviaciones de la complementariedad completa, siempre que dichas desviaciones no impidan completamente la capacidad de las moléculas para formar una estructura bicatenaria. Con el fin de que una molécula de ácido nucleico sirva como cebador o sonda, solo tiene que ser suficientemente complementaria en su secuencia para poder formar una estructura bicatenaria estable en las concentraciones de disolvente y de sales concretas usadas.

Como se usa en el presente documento, una secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia de ácido nucleico que hibridará específicamente con la complementaria de la secuencia de ácido nucleico con la que se está comparando en condiciones de rigurosidad alta. Las condiciones de rigurosidad adecuadas que estimulan la hibridación de ADN, por ejemplo, 6,0 x cloruro sódico/citrato sódico (SSC) a aproximadamente 45 °C, seguido de un lavado de 2,0 x SSC a 50 °C, las conocen los expertos en la materia o pueden encontrarse en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Por ejemplo, la concentración salina en la etapa de lavado puede seleccionarse de una baja rigurosidad de aproximadamente 2,0 x SSC a 50 °C hasta una rigurosidad alta de aproximadamente 0,2 x SSC a 50 °C. Además, la temperatura en la etapa de lavado puede aumentarse

desde condiciones de rigurosidad baja a temperatura ambiente, aproximadamente 22 °C, hasta condiciones de rigurosidad alta a aproximadamente 65 °C. Tanto la temperatura como la sal pueden variarse o puede mantenerse constante bien la temperatura o bien la concentración salina mientras que la otra variable se cambia.

5 Un polinucleótido de hibridará específicamente con una o más de las moléculas de ácido nucleico expuestas en la SEQ ID NO: 1 – 7 o complementarias o fragmentos de las mismas en condiciones moderadamente rigurosas, por ejemplo a aproximadamente 2,0 x SSC y aproximadamente a 65 °C. Un ácido nucleico hibridará específicamente con una o más moléculas de ácido nucleico expuestas en las SEQ ID NO: 1 – 7 o complementarias o fragmentos de las mismas en condiciones de alta rigurosidad.

10 Como se usa en el presente documento, “ADN amplificado” o “amplicón” se refiere a los polinucleótidos que se sintetizan usando técnicas de amplificación, tales como PCR. El término “amplicón” como se usa en el presente documento excluye específicamente dímeros de cebadores que pueden formarse en una reacción de amplificación de ADN.

15 Con respecto a la amplificación de una secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, mediante PCR) usando un par de cebadores de amplificación concreto, “condiciones rigurosas” son condiciones que permiten que el par de cebadores hibride únicamente con la secuencia de ácido nucleico diana a la que el cebador que tiene la correspondiente secuencia silvestre (o su complementaria) se uniría y, preferentemente, para producir un producto de amplificación único, el amplicón, en la reacción de amplificación térmica de ADN. La expresión “específico de (una secuencia diana)” indica que una sonda o cebador hibrida en condiciones de hibridación rigurosas únicamente con la secuencia diana en una muestra que comprende la secuencia diana.

20 Un miembro de un par de cebadores derivado de la secuencia genómica de la planta adyacente al ADN del inserto transgén se localiza a una distancia de la secuencia de ADN insertada, esta distancia puede variar desde un par de bases nucleotídicas a aproximadamente veinte mil pares de bases nucleotídicas. De forma similar, un miembro de un par de cebadores derivado del ADN del inserto transgénico está localizado a una distancia de la unión de la secuencia genómica de la planta, esta distancia puede variar de un par de bases nucleotídicas hasta
25 aproximadamente la longitud completa del inserto transgénico. El amplicón puede variar en cuanto a su longitud desde la longitud combinada del par de cebadores más un par de bases nucleotídicas, pero tiene una longitud de, preferentemente, aproximadamente cincuenta pares de bases nucleotídicas o mayor, por ejemplo, hasta 500 o incluso 1000 nucleótidos. Se producen de forma más fiable amplicones de tamaño más pequeño en general en reacciones de PCR, posibilitan tiempos de ciclo más cortos y pueden separarse y visualizarse fácilmente en geles de agarosa o adaptarse para su uso en ensayos de TaqMan, tales como Taqman de punto final y en tiempo real. Como
30 alternativa, un par de cebadores puede derivar de la secuencia genómica en ambos lados del ADN heterólogo insertado para producir un amplicón que incluya la secuencia polinucleotídica del inserto completo (por ejemplo, un cebador directo aislado de SEQ ID NO: 5 y un cebador inverso aislado de SEQ ID NO: 6 que amplifica una molécula de ADN que comprende el fragmento de ADN pMON73608 que se insertó en el genoma MON87460, comprendiendo el inserto 3309 nucleótidos (SEQ ID NO: 7), mostrados en mayúsculas en la Figura 3.

Para determinar si una planta de maíz resultante de un cruce sexual contiene ADN genómico vegetal transgénico de la planta de maíz MON87460, se somete el ADN que se extrae de una muestra de tejido vegetal de maíz a un procedimiento de amplificación de polinucleótidos usando un par de cebadores que incluye un primer cebador derivado de la secuencia de ADN en el genoma de la planta MON87460 adyacente al sitio de inserción del ADN
40 heterólogo insertado (ADN transgénico) y un segundo cebador derivado del ADN heterólogo insertado para producir un amplicón que es diagnóstico de la presencia del ADN de la planta MON87460. El amplicón de diagnóstico tiene una longitud específica dependiendo de la localización de los cebadores y comprende una secuencia polinucleotídica de unión específica que es diagnóstica del ADN genómico del acontecimiento vegetal específico. La presencia de la secuencia polinucleotídica de unión en un amplicón puede determinarse, por ejemplo, secuenciando el ADN del amplicón o mediante hibridación con una sonda específica. La secuencia de ADN del amplicón diagnóstico de la presencia del MON87460 comprende la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2. Más específicamente, un amplicón diagnóstico de la presencia del MON87460 es de 68 nucleótidos de longitud y comprende la SEQ ID NO: 2, y puede detectarse mediante hibridación con una sonda marcada que comprende una cualquiera de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 16.

50 La amplificación del polinucleótido se puede conseguir mediante cualquiera de los procedimientos de amplificación conocidos en la técnica, incluyendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En la técnica se conocen varios procedimientos de amplificación y se describen en, entre otros, las patentes de EE.UU. N.º 4.683.195 y 4.683.202 y en PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, ed. Innis y col., Academic Press, San Diego, 1990. Se han desarrollado procedimientos de amplificación por PCR para amplificar hasta 22 kb (kilobases) del ADN genómico y hasta 42 kb del ADN del bacteriófago (Cheng y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5695-5699, 1994). Estos
55 procedimientos, además de otros procedimientos conocidos en la técnica de amplificación del ADN, se pueden usar en la práctica de la presente invención. La secuencia del inserto de ADN heterólogo o secuencia de ADN genómico flanqueante de MON87460 puede verificarse (y corregirse si es necesario) amplificando dichas moléculas de ADN de la semilla MON87460 o las plantas cultivadas a partir de la semilla depositada en la ATCC con el n.º de referencia PTA-8910, usando cebadores derivados de las secuencias proporcionadas en el presente documento, seguido de secuenciación de ADN convencional del amplicón de PCR o fragmentos de ADN clonados del mismo.

Los kits de detección de ADN que se basan en procedimientos de amplificación de ADN contienen moléculas de cebadores de ADN que hibridan específicamente con un ADN diana y amplifican un amplicón de diagnóstico en las condiciones de reacción apropiadas. Un amplicón de cualquier longitud se puede producir a partir de ADN de MON87460 en el que el amplicón comprende la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2. El experto en la materia reconocerá que no se requiere que la primera y la segunda moléculas de cebadores de ADN consistan solamente en ADN sino que también pueden estar comprendidas exclusivamente por ARN, una mezcla de ADN y ARN, o una combinación de ADN, ARN u otros nucleótidos o análogos de los mismos que no actúan como moldes para una o más polimerasas. Además, el experto en la materia reconocerá que una sonda o un cebador como se expone en el presente documento será de al menos aproximadamente 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20 nucleótidos consecutivos de longitud y se seleccionará del grupo de nucleótidos expuesto en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 3 (designado de forma arbitraria unión 5'), la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 4 (designado de forma arbitraria unión 3'), la SEQ ID NO: 5 (designado de forma arbitraria secuencia flanqueante 5'), la SEQ ID NO: 6 (designado de forma arbitraria secuencia flanqueante 3') y la SEQ ID NO: 7 (secuencia transgénica insertada). Las sondas y cebadores de al menos 21 a 50 o más nucleótidos consecutivos de longitud son posibles cuando se seleccionan del grupo de nucleótidos como se expone en la SEQ ID NO: 5 a la SEQ ID NO: 7.

El kit puede proporcionar un procedimiento de detección basado en gel de agarosa o cualquier variedad de procedimientos para detectar el amplicón de diagnóstico que se conocen en la técnica. Un kit que contiene cebadores de ADN que son homólogos o complementarios de cualquier parte de la región genómica de maíz de SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6 y de cualquier parte de la región del inserto transgénico de SEQ ID NO: 7 es un objeto de la invención. Se identifica específicamente como un par de cebadores útil en un procedimiento de amplificación de ADN la SEQ ID NO: 8 y la SEQ ID NO: 9 que amplifican un amplicón de diagnóstico homólogo de una parte de la región transgénica/genómica 5' de MON87460, en el que el amplicón comprende la SEQ ID NO: 2. Otras moléculas de ADN útiles como cebadores de ADN pueden seleccionarse de la secuencia de ADN transgénica/genómica divulgada de MON87460 por los expertos en la materia de la amplificación de ADN.

El amplicón diagnóstico producido mediante estos procedimientos se puede detectar mediante una pluralidad de técnicas. Uno de estos procedimientos es en Análisis Genético de un bit (Nikiforov, y col., Nucleic Acid Res. 22:4167-4175, 1994), en el que se diseña un oligonucleótido de ADN que solapa tanto la secuencia de ADN genómica flanqueante adyacente como la secuencia de ADN insertada. El oligonucleótido se inmoviliza en pocillos de una placa de microtitulación. Tras la PCR de la región de interés (usando un cebador en la secuencia insertada y uno en la secuencia genómica flanqueante adyacente), y producto de PCR monocatenario se puede hibridar con el oligonucleótido inmovilizado y servir como molde para una reacción de extensión de una base usando una ADN polimerasa y dideoxinucleótido trifosfatos (ddNTP) marcados específicos de la siguiente base prevista. La lectura puede ser fluorescente o basarse en un ELISA. Una señal indica la presencia de la secuencia transgénica/genómica debido a una amplificación, hibridación y extensión de una base satisfactorios.

Otro procedimiento es la técnica de la pirosecuenciación como describen Winge (Innov. Pharma. Tech. 00:18-24, 2000). En este procedimiento se diseña un oligonucleótido que solapa el ADN genómico adyacente y la unión del ADN del inserto. El oligonucleótido hibrida con un producto de PCR monocatenario de la región de interés (un cebador en la secuencia insertada y uno en la secuencia genómica flanqueante) y se incuba en presencia de una ADN polimerasa. ATP, sulfurilasa, luciferasa, apirasa, adenosina 5' fosfosulfato y luciferina. Los dNTP se añaden individualmente y la incorporación da como resultado una señal luminosa que se mide. Una señal lumínica indica la presencia de la secuencia transgénica/genómica debido a una amplificación, hibridación y extensión de una o varias bases satisfactorias.

La polarización por fluorescencia como describen Chen, y col., (Genome Res. 9:492-498, 1999) es un procedimiento que se puede usar para detectar el amplicón de la presente invención. Usando este procedimiento se diseña un oligonucleótido que solapa la unión entre el ADN genómico flanqueante y el insertado. El oligonucleótido hibrida con un producto de PCR monocatenario 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 una ADN polimerasa y un ddNTP marcado con fluorescencia. La extensión de una sola base tiene como resultado la incorporación del ddNTP. La incorporación se puede medir como un cambio en la polarización usando un fluorímetro. Un cambio en la polarización indica la presencia de la secuencia transgénica/genómica debido a una amplificación, hibridación y extensión de una base satisfactorias.

Taqman® (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) se describe como un procedimiento de detección y cuantificación de la presencia de una secuencia de ADN y se describe completamente en las instrucciones proporcionadas por el fabricante. En resumen, se diseña una sonda oligonucleotídica FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia) que solapa la unión entre el ADN genómico flanqueante y el insertado. La sonda FRET y los cebadores para PCR (un cebador en la secuencia de ADN insertada y uno en la secuencia genómica flanqueante) se ciclan en presencia de una polimerasa termoestable y dNTP. La hibridación de la sonda de FRET da como resultado escisión y liberación del resto fluorescente, tal como 6FAM™ y VIC™, separado del colorante inactivador, tal como, TAMRA (tetrametil-6-carboxirodamina) para sondas convencionales, o compuestos de unión al surco menor no fluorescentes para sondas MGB. Con las sondas TAMRA o MGB, la polimerasa escinde una sonda unida durante la PCR, separando el fluoróforo y el inactivador hasta el punto en que no puede producirse FRET, y una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia transgénica/genómica.

Se han descrito balizas moleculares para su uso en la detección de secuencia, como se describe en Tyangi, y col., (Nature Biotech.14:303–308, 1996). En resumen, se diseña una sonda oligonucleotídica FRET que solapa la unión entre el ADN genómico flanqueante y el insertado. La estructura única de la sonda FRET tiene como resultado que contiene una estructura secundaria que conserva los restos fluorescentes y de inactivación muy cercanos. La sonda FRET y los cebadores para PCR (un cebador en la secuencia de ADN insertada y uno en la secuencia genómica flanqueante) se ciclan en presencia de una polimerasa termoestable y dNTP. Tras la amplificación por PCR con éxito, la hibridación de la sonda FRET a la secuencia diana tiene como resultado la eliminación de la estructura secundaria de la sonda y la separación espacial de los restos fluorescentes y de inactivación. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia del inserto transgénico/flanqueante debido a una amplificación e hibridación satisfactorias.

Otros procedimientos descritos, tales como microfluidos (publicación de patente de Estados Unidos N.º 2006068398, patente de Estados Unidos N.º 6.544.734) pueden usarse para separar y amplificar muestras de ADN. Los pigmentos ópticos se usan para detectar y cuantificar moléculas de ADN específicos (documento WO/05017181). Se han descrito dispositivos de nanotubos (documento WO/06024023) que comprenden un sensor electrónico para la detección de moléculas de ADN o nanoesferas que se unen a moléculas de ADN específicas.

Pueden desarrollarse kits de detección de ADN usando las composiciones divulgadas en el presente documento y los procedimientos bien conocidos en la técnica de detección de ADN. Los kits son útiles para la identificación del ADN de la planta de maíz MON89034 en una muestra y se puede aplicar a los procedimientos para cultivar plantas de maíz que contienen ADN de MON87460. Un kit contiene moléculas de ADN que son útiles como cebadores o sondas y que son homólogas o complementarias de al menos una parte de SEQ ID NO: 1-7. Las moléculas de ADN pueden usarse en procedimientos de amplificación de ADN (PCR) o como sondas en procedimientos de hibridación de ácido nucleico tales como análisis de tipo Southern y análisis de tipo Northern.

Un polinucleótido preferido que es diagnóstico de la presencia de ADN de MON87460 tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4 o la SEQ ID NO: 25. Las SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4 y los polinucleótidos de unión genómicos/transgénicos mayores, tales como los de la SEQ ID NO: 5–7 también se pueden usar como marcadores en procedimientos de cultivo de plantas para identificar la descendencia de los cruces genéticos similares a los procedimientos descritos para el simple análisis del marcador de ADN de repetición de secuencia, en "DNA markers: Protocols, applications, and overviews: (1997) 173-185, Cregan, y col., eds., Wiley-Liss NY. La hibridación de la sonda con la molécula de ADN diana se puede detectar mediante cualquier número de procedimientos conocidos por un experto en la técnica, estos pueden incluir marcadores fluorescentes, marcadores radioactivos, marcadores basados en anticuerpos y marcadores quimioluminiscentes. Una molécula de ácido nucleico marcadora preferida comparte entre el 80 % y el 100 % o el 90 % y el 100 % de identidad de la secuencia con la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 7 o complementarias de las mismas o fragmentos de las mismas. Una molécula de ácido nucleico marcadora preferida comparte entre el 95 % y el 100 % de identidad de la secuencia con la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 7 o complementarias de las mismas o fragmentos de las mismas.

En el presente documento se proporcionan plantas de maíz tolerantes al déficit de agua que carecen de un gen marcador seleccionable o que carecen de un gen marcador seleccionable intacto. Dichas plantas pueden obtenerse por procedimientos que comprenden exponer un cromosoma de maíz que comprende un inserto de transgén heterólogo que confiere tolerancia al déficit de agua y un gen marcador seleccionable a uno o más agentes inductores de recombinación y seleccionar una planta de maíz que comprende un inserto de transgén heterólogo que confiere tolerancia al déficit de agua cuando el gen marcador seleccionable se ha eliminado completa o parcialmente o cuando el gen marcador seleccionable se ha alterado. Los insertos de transgenes heterólogos que confieren tolerancia al déficit de agua y contienen un marcador seleccionable incluyen insertos que comprenden la SEQ ID NO: 7 o insertos que comprenden la SEQ ID NO: 1, un promotor de la actina de arroz truncado que está unido operativamente a un gen cspB, un gen marcador seleccionable y la SEQ ID NO: 2. Los cromosomas de maíz que comprenden un inserto de transgén heterólogo que confiere tolerancia al déficit de agua y un gen marcador seleccionable también incluyen un cromosoma de maíz que comprende la SEQ ID NO: 24, un cromosoma de maíz de una planta de maíz que se ha depositado con el N.º de referencia en la ATCC PTA-8910 (ATCC, 10801 University Blvd., Manassas, VA, Estados Unidos) y descendencia de la misma.. Los insertos de transgenes heterólogos que confieren tolerancia al déficit de agua incluyen insertos que comprenden la SEQ ID NO: 1 y un promotor de la actina de arroz truncado que está unido operativamente a un gen cspB, así como insertos que comprenden la SEQ ID NO: 1 y un promotor de la actina de arroz truncado que está unido operativamente a un gen cspB en el que un extremo 5' del inserto solapa con un extremo 3' de la SEQ ID NO: 1.

La expresión "unido operativamente", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la unión de secuencias de ácido nucleico de un modo tal que una secuencia pueda proporcionar una función requerida a una secuencia unida. En el contexto de un promotor, "unido operativamente" significa que el promotor está conectado a una secuencia de interés de modo que la transcripción de esa secuencia de interés está controlada y regulada por ese promotor. Cuando la secuencia de interés codifica una proteína y cuando se desea la expresión de esa proteína, "unido operativamente" significa que el promotor está unido a la secuencia de tal modo que el transcrito resultante se traducirá eficazmente. Si el enlace del promotor con la secuencia codificante es una fusión transcripcional y se desea la expresión de la proteína codificada, el enlace se hace de modo que el primer codón de iniciación de la

traducción en el transcrito resultante sea el codón de iniciación de la secuencia codificante. Como alternativa, si el enlace del promotor con la secuencia codificante es una fusión de traducción y se desea la expresión de la proteína codificada, el enlace se hace de modo que el primer codón de iniciación de la traducción contenido en la secuencia no traducida en 5' se asocie con el promotor y está unida de modo que el producto de la traducción resultante esté en el marco con el marco de lectura abierto traduccional que codifica la proteína deseada. Las secuencias de ácido nucleico que pueden unirse operativamente incluyen secuencias que proporcionan funciones de expresión génica (es decir, elementos de expresión génica tales como promotores, regiones no traducidas en 5', intrones, regiones codificantes de proteína, regiones no traducidas en 3', sitios de poliadenilación y/o terminadores de la transcripción), secuencias que proporcionan funciones de transferencia y/o integración de ADN (es decir, secuencias de extremo de ADN-T, sitios de reconocimiento de recombinasa específica de sitio, sitios de reconocimiento de integrasa), secuencias que proporcionan funciones selectivas (es decir, marcadores de resistencia a antibióticos, genes biosintéticos), secuencias que proporcionan funciones marcadoras puntuables (es decir, genes indicadores), secuencias que facilitan las manipulaciones *in vitro* o *in vivo* de las secuencias (es decir, secuencias polienlazadoras, secuencias diana para recombinasas específicas de sitio) y secuencias que proporcionan funciones de replicación (es decir, orígenes de replicación bacterianos, secuencias de replicación autónoma, secuencias centroméricas).

Los agentes inductores de la recombinación pueden comprender radiación ionizante y/o cualquier compuesto, proteína y/o un ácido nucleico que proporcione la eliminación o modificación de una secuencia polinucleotídica. Por tanto, los agentes inductores de recombinación incluyen, pero sin limitaciones, agentes que posibiliten la recombinación homóloga, la recombinación no homóloga, la recombinación específica de sitio y/o modificaciones genómicas. Las modificaciones genómicas proporcionadas por agentes inductores de la recombinación incluyen, por lo tanto, pero sin limitaciones, inserciones, deleciones, inversiones y/o sustituciones de nucleótidos. Se ha divulgado el uso de agentes inductores de la recombinación para inducir modificaciones genéticas en plantas (Lloyd y col., Proc Natl Acad Sci USA., 102(6):2232, 2005). Los agentes de recombinación pueden ser nativos o modificados por ingeniería genética. Las recombinasas específicas de sitio incluyen, pero sin limitaciones, una Cre recombinasa, una FLP recombinasa, una flipasa y similares. Los agentes inductores de la recombinación también incluyen, pero sin limitaciones, nucleasas. Entre las nucleasas que pueden usarse se incluyen meganucleasas y nucleasas en dedo de cinc. Entre otros agentes inductores de la recombinación se incluyen, pero sin limitaciones, secuencias de reemplazo homólogas y secuencias de reemplazo no homólogas. En ciertas realizaciones, los reactivos inductores de recombinación pueden comprender una nucleasa y una secuencia de reemplazo homóloga o no homóloga. En ciertas realizaciones, puede usarse una Cre recombinasa capaz de escindir el marcador seleccionable localizado entre los sitios lox de la SEQ ID NO: 24. Se ha desvelado la eliminación mediada por Cre de secuencias flanqueadas por sitios lox en plantas (patente de Estados Unidos N° 5.658.772).

La eliminación o alteración de un gen marcador seleccionable, una parte del mismo, u otra secuencia puede efectuarse induciendo una rotura bicatenaria en la secuencia diana, proporcionando una secuencia de reemplazo homóloga que carece del gen marcador seleccionable o una parte del mismo, y recuperando plantas en las que la secuencia de reemplazo se ha integrado en lugar de las secuencias residentes originalmente. Una secuencia de reemplazo homóloga puede comprender secuencias homólogas en ambos extremos de la rotura bicatenaria que se proporcionan para la recombinación homóloga y la sustitución de la secuencia residente en el cromosoma con la secuencia de reemplazo. Se ha divulgado recombinación homóloga inducida por rotura bicatenaria dirigida en plantas de cultivos tales como tabaco y maíz (Wright y col., Plant J. 44, 693, 2005; D'Halluin, y col., Plant Biotech. J. 6:93, 2008). También es posible insertar una secuencia de reemplazo homóloga en un sitio de escisión de nucleasa dirigido mediante unión de extremos no homólogos o una combinación de unión de extremos no homólogos y recombinación homóloga (revisado en Puchta, J. Exp. Bot. 56, 1, 2005). También se ha divulgado la inserción dirigida de secuencias de reemplazo homólogas en sitios genómicos de plantas específicos por unión de extremos no homólogos o una combinación de unión de extremos de no homólogos y recombinación homóloga (Wright y col., Plant J. 44, 693, 2005). En ciertas realizaciones, puede usarse una meganucleasa que cataliza al menos una rotura bicatenaria específica de sitio en el gen marcador seleccionable. Se ha mostrado que las meganucleasas son susceptibles de modificación genética de modo que pueden hacerse evolucionar o modificarse por ingeniería genética (documentos WO/06097853A1, WO/06097784A1, WO/04067736A2) o diseñarse racionalmente (documento U.S. 20070117128A1) para cortar dentro de una secuencia de reconocimiento que coincide exactamente o está estrechamente relacionada con una secuencia diana específica. En estos casos, dada una diana de tamaño razonable, tal como una secuencia de gen marcador seleccionable, se puede seleccionar o diseñar una nucleasa que cortará dentro de la secuencia génica marcadora seleccionable diana. Como alternativa, puede usarse una nucleasa en dedo de cinc que cataliza al menos una rotura bicatenaria específica de sitio en el gen marcador seleccionable. También se han divulgado dichas nucleasas en dedo de cinc, la capacidad para modificar por ingeniería genética las nucleasas en dedo de cinc específicas y su uso para permitir la recombinación homóloga en plantas (documentos WO 03/080809, WO 05/014791, WO 07014275, WO 08/021207).

La eliminación o alteración de un gen marcador seleccionable, una parte del mismo, u otra secuencia también puede efectuarse induciendo una rotura bicatenaria en la secuencia diana, proporcionando una secuencia de reemplazo no homóloga que carece del gen marcador seleccionable o una parte del mismo, y recuperando plantas en las que la secuencia de reemplazo no homóloga se ha integrado en la secuencia diana. Ciertas realizaciones, una secuencia de reemplazo no homóloga puede comprender secuencias monocatenarias en ambos extremos que son

complementarias de secuencias monocatenarias en ambos extremos de la rotura bicatenaria para proporcionar unión de extremos no homólogos de la secuencia de reemplazo y rotura bicatenaria.

5 También se divulgan procedimientos para generación *de novo* de una planta de maíz que es sustancialmente equivalente a una planta de maíz del acontecimiento MON87460 y plantas resultantes. Dichos procedimientos pueden comprender el uso de agentes inductores de la recombinación. Las plantas de maíz que son sustancialmente equivalentes a una planta de maíz del acontecimiento MON87460 incluyen plantas de maíz que comprenden un cromosoma que tiene un inserto transgénico heterólogo que comprende un promotor que está unido operativamente a un gen *cspB*, en el que el inserto transgénico está presente en la misma, o sustancialmente en la misma, localización cromosómica o sitio de integración cromosómico que en MON87460. Los promotores que están unidos operativamente a un gen *cspB* son promotores de la actina de arroz truncados. En ciertas realizaciones, se puede seleccionar, hacer evolucionar o diseñar una nucleasa para cortar dentro de una secuencia de reconocimiento diana que coincide exactamente o está estrechamente relacionada con una secuencia diana en la SEQ ID NO: 5, en la SEQ ID NO: 6, en una secuencia cromosómica de maíz que abarca la SEQ ID NO: 5 y la SEQ ID NO: 6 en una planta de maíz no transgénica, o en la SEQ ID NO: 23. Una planta de maíz modificada genéticamente que contiene un promotor unido operativamente a un gen *cspB* se puede producir del siguiente modo: i) introduciendo en una célula de planta de maíz una secuencia de reemplazo homóloga que comprende un promotor que está unido operativamente a un gen *cspB* y secuencias flanqueantes que son sustancialmente idénticas a una secuencia diana y una nucleasa que escinde la secuencia diana; y ii) seleccionando una célula de maíz o planta de maíz en la que la secuencia de reemplazo homóloga se ha integrado en la secuencia diana. Dado que se ha descubierto que las secuencias diana cromosómicas de maíz divulgadas en el presente documento son sitios favorables para inserción de transgenes, también se proporcionan procedimientos para obtener plantas con inserciones de uno o más transgenes que confieren rasgos distintos de tolerancia al déficit de agua o transgenes que comprenden genes distintos de *cspB* que confieren tolerancia al déficit de agua en sitios diana divulgados en el presente documento.

25 La disponibilidad de agentes inductores de la recombinación y diversas secuencias de reemplazo homólogas también proporciona plantas de maíz tolerantes al déficit de agua que comprenden uno o más genes adicionales integrados en la misma localización cromosómica que el inserto del transgén heterólogo que confiere tolerancia al déficit de agua. La integración de los genes adicionales en la misma localización que el gen que confiere tolerancia al déficit de agua es ventajosa porque cualquier rasgo portado por los genes adicionales se unirá genéticamente al rasgo de tolerancia al déficit de agua, facilitando de este modo el cultivo. En ciertas realizaciones, un gen o genes adicionales pueden ser un gen o genes que actúan en concierto con el inserto del transgén heterólogo residente que confiere tolerancia al déficit de agua para proporcionar tolerancia al déficit de agua adicional. En ciertas realizaciones, un gen o genes adicionales pueden ser un gen o genes que proporcionen un rasgo particular y útil distinto de la tolerancia al déficit de agua. Por lo tanto, uno o más genes que confieren uno o más rasgos incluyen genes que confieren resistencia a herbicidas, resistencia a plagas, rendimiento mejorado en condiciones de agua suficiente, aceite de semillas mejorado, almidón de semillas mejorado, proteína de semillas mejorada y/o utilización mejorada de nitrógeno. Dichas plantas pueden obtenerse por procedimientos que comprenden exponer un cromosoma de maíz que comprende un inserto de transgén heterólogo que confiere tolerancia al déficit de agua a una secuencia de reemplazo homóloga que comprende uno o más genes adicionales y seleccionar una planta de maíz que comprende un inserto de transgén heterólogo que confiere tolerancia al déficit de agua y uno o más genes adicionales. La inserción de la secuencia de reemplazo homóloga puede facilitarse mediante el uso de un agente inductor de recombinación adicional. Los agentes inductores de la recombinación adicionales usados incluyen una meganucleasa, una nucleasa en dedo de cinc u otro agente que induzca una rotura bicatenaria en un sitio deseado de recombinación homóloga inducida por rotura bicatenaria. Los insertos de transgenes heterólogos que confieren tolerancia al déficit de agua incluyen insertos que comprenden la SEQ ID NO: 1 y un promotor de la actina de arroz truncado que está unido operativamente a un gen *cspB*, así como insertos que comprenden la SEQ ID NO: 1 y un promotor de la actina de arroz truncado que está unido operativamente a un gen *cspB* en el que un extremo 5' del inserto solapa con un extremo 3' de la SEQ ID NO: 1. La secuencia de reemplazo homóloga comprende una secuencia que proporciona el reemplazo de un gen marcador seleccionable que está en un inserto de transgén heterólogo residente con uno o más genes adicionales. Los insertos de transgenes heterólogos que confieren tolerancia al déficit de agua y que contienen un marcador seleccionable incluyen insertos que comprenden la SEQ ID NO: 7 o insertos que comprenden la SEQ ID NO: 1 y un promotor de la actina de arroz truncado que está unido operativamente a un gen *cspB*. Los cromosomas de maíz que comprenden un inserto de transgén heterólogo que confiere tolerancia al déficit de agua y un gen marcador seleccionable también incluyen un cromosoma de maíz que comprende la SEQ ID NO: 24, un cromosoma de maíz de una planta de maíz que se ha depositado con el N.º de referencia de la ATCC PTA-8910, y descendencia de la misma. Un gen o gen adicional puede insertarse también en la SEQ ID NO: 5 y/o la SEQ ID NO: 6.

60 También se prevé que cualquiera del gen o los genes adicionales mencionados anteriormente puede integrarse en un cromosoma que comprende la SEQ ID NO: 1 y un promotor de la actina de arroz truncado que está unido operativamente a un gen *cspB* y uno o más sitios *lox* por recombinación específica de sitio. Los sistemas de recombinación específica de sitio usados para este fin incluyen FLP recombinasa/FRT, Cre recombinasa/*lox* y combinaciones de los mismos. Se ha divulgado el uso de sistemas de recombinación específicos de sitio en plantas y otros organismos eucariotas (patente de Estados Unidos n.º 5.801.030, patente de Estados Unidos n.º 5.658.772 y

patente de Estados Unidos n.º 6.262.341). La presencia de sitios de recombinación específicos del sitio lox en cromosomas de maíz que comprenden la SEQ ID NO: 7 o la SEQ ID NO: 24 y un cromosoma de maíz de una planta de maíz que se ha depositado con el n.º de referencia de la ATCC PTA-8910, y descendencia de la misma, proporciona de este modo integración específica de sitio de genes adicionales en estos cromosomas de maíz. La secuencia marcadora seleccionable que está flanqueada por los sitios lox en los cromosomas de maíz se pueden escindir en primer lugar por la Cre recombinasa, dejando un sitio lox único en el cromosoma. A continuación se pueden introducir genes adicionales en una molécula de ADN circular que comprende los genes adicionales y un sitio lox unido operativamente e integrado en el cromosoma de maíz en el único sitio lox que se dejó en el cromosoma. Se han divulgado esquemas de ejemplo para crear moléculas de ADN circulares e integración específica de sitio de genes en cromosomas (Vergunst y col., Nucleic Acid Res. 26(11), 279, 1998). También se divulga la introducción de sitios de recombinación específicos de sitio distintos de lox en la localización cromosómica de la inserción en la SEQ ID NO: 24 y la inserción de genes adicionales en dichos sitios de recombinación.

Los ejemplos siguientes se incluyen para demostrar ejemplos de determinadas realizaciones preferidas de la invención. Los ejemplos no cubiertos por el alcance de las reivindicaciones son para fines ilustrativos.

15 Ejemplos

Ejemplo 1 Producción de plantas de maíz transgénicas

Se produjeron plantas de maíz transgénicas mediante transformación mediada por *Agrobacterium* de maíz LH59 con el vector pMON73608 (Figura 1). Este vector contiene la región de codificación *cspB* regulada por el promotor de la actina de arroz, el intrón de la actina de arroz y la secuencia de poliadenilación tr7 3', y una región de codificación *nptII* regulada por el promotor 35S del CaMV, y la secuencia de poliadenilación NOS 3'.

Tabla 1: Resumen de los elementos genéticos en pMON73608

Elemento genético	Posición en la Figura1	Función (Referencia)
CR-Ec.rop-1:1:3	53-244	Secuencia de codificación para el represor de la proteína cebador
OR-Ec.ori-ColE1-1:1:1	672 - 1260	Origen de replicación de pBR322 para el mantenimiento de plásmido en <i>E. coli</i>
P-Ec.aadA-SPC/STR-1:1:1		Promotor bacteriano y secuencia de codificación para una enzima modificadora de aminoglucósidos, 3'(9)-O-nucleotidiltransferasa del transposón Tn7 (acceso en GenBank X03043)
CR-Ec.aadA-SPC/STR-1:1:3	1793-2681	
T-Ec.aadA-SPC/STR-1:1:1		
B-AGRtu. extremo derecho-1:1:12	2816 - 3172	Secuencia del extremo derecho esencial para la transferencia de ADN-T derivada de <i>Agrobacterium</i>
P-Os.Act1-1:1:8	3205 - 4048	
L-Os.Act1-1:1:5	4049 - 4128	Promotor, líder e intrón del gen de la actina de arroz
I-Os.Act1-1:1:3	4129 - 4605	
CR-Bs.cspB-1:4:1	4608 - 4811	Región de codificación de la proteína CSPB de <i>Bacillus subtilis</i> con un cambio en el aminoácido de la segunda posición de leucina a valina (documento WO05033318)
T-AGRtu.tr7-1:1:5	4842 - 5349	Región no traducida en 3' de la secuencia de codificación del transcrito 7 de <i>Agrobacterium</i> que dirige la poliadenilación
RS-P1.lox1-1:1:1	5424 - 5457	Sitio de recombinación reconocido por la Cre recombinasa
P-CaMV.35S-1:1:6	5484 - 5776	Promotor de virus del mosaico de la coliflor (CaMV)
CR-Ec.nptII-Tn5-1:1:3	5841 - 6635	Región de codificación aislada de Tn5 que codifica la fosfotransferasa de tipo II. La expresión de este gen en células vegetales confiere resistencia a kanamicina y actúa como marcador seleccionable para la transformación
T-AGRtu.nos-1:1:13	6667 - 6919	Región no traducida en 3' de la secuencia de codificación de la nopalina sintasa (NOS) de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> que dirige la poliadenilación
RS-P1,1ox1-1:1:1	6945 - 6978	Sitio de recombinación reconocido por la Cre recombinasa
B-AGRtu.extremo izquierdo-1:1:5	6999 - 7440	Secuencia del extremo izquierdo esencial para la transferencia de ADN-T derivada de <i>Agrobacterium</i>
OR-Ec.oriV-RK2-1:1:6	7527 - 7923	Origen de replicación para <i>Agrobacterium</i> derivado del plásmido de amplia gama de huéspedes RK2

El callo LH59 se inició a partir de embriones inmaduros. Se escindieron embriones inmaduros, de 1,5 mm a 2,0 mm de plantas de maíz en desarrollo y se cultivaron con el eje embrionario hacia abajo en medio de inicio de callos durante 8-21 días.

5

Se preparó *Agrobacterium* mediante procedimientos convencionales y se transfirieron de 50 a 100 trozos de callo a una placa de Petri que contenía aproximadamente 15 ml de suspensión de *Agrobacterium* de 0,1 a 1,0 x 10⁹ ufc/ml. Se incubaron trozos de callo de 2 mm a 8 mm de diámetro durante aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente con la suspensión de *Agrobacterium*, seguido la eliminación del líquido por aspiración. Se añadieron aproximadamente 50 µl de agua destilada estéril a papel de filtro en una placa de Petri de 60 x 20 mm. Se transfirieron de quince a 20 trozos del callo inoculado a cada papel de filtro y la placa se selló. El callo y *Agrobacterium* se cultivaron conjuntamente durante aproximadamente 3 días a 23 °C en oscuridad.

10

Los callos se transfirieron desde el papel de filtro al medio de inicio de callo que contenía carbenicilina y se cultivaron en oscuridad a de 27 °C a 28 °C durante 2-5 días. La selección se inició transfiriendo callos al medio de

inicio de callos que contenía nitrato de plata, carbenicilina y paromomicina mg/l. Después de 2 semanas de cultivo en oscuridad de a de 27 °C a 28 °C, el callo se transfirió a medio que contenía mayores niveles de paromomicina. El callo se subcultivó después de dos semanas en medio recién preparado y se cultivó adicionalmente durante dos semanas en oscuridad a de 27 °C a 28 °C. Después, el callo se transfirió de nuevo al medio con mayores niveles de paromomicina. Después de 2-3 semanas de cultivo en oscuridad de 27 °C a 28 °C, se identificó el callo resistente a paromomicina.

Se regeneraron plantas (plantas R0) a partir de callos transformados, se transfirieron al suelo y se cultivaron en invernadero. Las plantas R0 se sometieron a detección selectiva mediante PCR con respecto a la presencia de las regiones de codificación *cspB* y *nptII*, y se realizó análisis de tipo Southern para determinar la copia del inserto. Se usó análisis Taqman para determinar la presencia o ausencia de secuencias de la cadena principal del vector. Se seleccionaron los acontecimientos transgénicos que eran positivos para la presencia de los genes *cspB* y *nptII*, negativos con respecto a la presencia de secuencias de la cadena principal del vector y que tenían uno o dos insertos (sitios de integración dentro del genoma de maíz) para el análisis fisiológico con respecto a la tolerancia a la sequía. Los acontecimientos positivos se cultivaron en invernadero hasta su madurez y se autofecundaron. Se recogieron semillas homocigotas, heterocigotas y no transgénicas de múltiples acontecimientos transgénicos obtenidos mediante inserciones genómicas del ADN-T de pMON73608 de las plantas positivas autofecundadas.

Ejemplo 2 Detección selectiva en invernadero con respecto a la tolerancia al estrés por déficit de agua

Se cultivaron plantas de maíz heterocigotas transgénicas a partir de semillas heterocigotas de acontecimientos transgénicos transformados con pMON73608 (Ejemplo 1) y se sometieron a detección selectiva respecto a la tolerancia al estrés por déficit de agua en comparación con plantas de control mediante un procedimiento de alto rendimiento de detección selectiva en invernadero en el que se les priva de agua para crear un "tratamiento de sequía". Se mide la eficacia del uso del agua mediante la tasa de crecimiento de la planta, por ejemplo, una mejora de al menos el 10 %, en altura y biomasa durante un tratamiento de sequía, en comparación con las plantas de control. También se mide el estado de hidratación de los tejidos de los brotes después de la sequía. La altura inicial de brote (AIB) es la altura de la planta después de 3 semanas de crecimiento en condiciones óptimas. La altura de marchitamiento del brote (ABB) es la altura de la planta al final de una sequía de 6 días. Los experimentos a lo largo del tiempo han mostrado que aproximadamente a los 3 días de tratamiento de sequía, las plantas de maíz silvestres básicamente dejan de crecer y comienzan a marchitarse. Por lo tanto, una planta de maíz transgénica con eficacia mejorada en el uso del agua continuará creciendo (aunque posiblemente en menor grado que con agua) y, por lo tanto, será significativamente más alta al final de un experimento de sequía. La masa de marchitamiento del brote (MMB) es la cantidad de materia húmeda y seca en el brote (planta separada del cepellón en la línea deL suelo) al final de la sequía; la MDB se mide después de 2 a 3 semanas en una cámara de secado. La masa Turgente del Brote (MTB) es la MMB más la masa del agua que se transporta a los tejidos vegetales en 3 días de inmersión en agua a 40 °C en oscuridad. Los experimentos han mostrado que la mayor parte del agua sale en 24 horas pero se tardan 2 días más antes de que el aumento adicional se vuelva insignificante. La MTB-MMB es indicativa de la eficacia de uso del agua en plantas cuando la recuperación del estrés es más importante que la tolerancia al estrés en sí misma. El contenido relativo de agua (CRA) es una medición de qué cantidad (%) de la planta es agua en la recolección. $CRA = (MMB - MDB) / (MTB - MDB) \times 100$. Las plantas de maíz completamente regadas tienen aproximadamente un 98 % del CRA. Típicamente, en una detección selectiva del marchitamiento, las plantas tienen aproximadamente un 60 % de CRA. Se considera que las plantas con mayor CRA al final de una sequía son plantas más sanas y más adecuadas para recuperarse y crecer después de la sequía. La tasa de crecimiento relativa (TCR) se calcula para cada brote usando la fórmula $TCR = (AMB - AIB) / ((AMB + AIB) / 2) \times 100$

Las plantas de maíz heterocigotas transgénicas de múltiples acontecimientos transgénicos que comprenden ADN-T de pMON73608, incluyendo MON87460, mostraron tolerancia al estrés por déficit de agua potenciada en comparación con las plantas de control.

Ejemplo 3 Rendimiento de campo mejorado de plantas de maíz MON87460 en condiciones de déficit de agua

Se realizaron ensayos de campo con agua limitada usando maíz híbrido de calidad comercial en ambientes que no recibieron lluvias durante el periodo diana para el tratamiento del déficit de agua, un lapso de 10 a 14 días inmediatamente antes de la floración.

Se plantaron parcelas de dos filas de 34 plantas por fila a una densidad de 79.070 plantas por hectárea (32.000 plantas por acre) en una localización del oeste de Kansas. Cada parcela transgénica se emparejó con una parcela no transgénica del mismo fondo híbrido. Se sembraron doce replicados de parcelas emparejadas de cada uno de los 21 acontecimientos de inserción independientes, y su par no transgénico, en un diseño en bloque aleatorio. Las plantas se mantuvieron en una condición bien regada usando irrigación aérea hasta el estadio V8 de desarrollo, momento en el cual se retuvo el agua durando un periodo de 14 días.

El 7º día del tratamiento de privación de agua se determinó la distancia desde la superficie del suelo a la punta de la hoja más joven completamente extendida para cada una de las 3 plantas positivas para el transgén y negativas para el transgén en cada parcela emparejada. Esta medición se repitió 5 días después usando la misma hoja que el día 7. A partir de las mediciones del día 7 y el día 12 se calculó una tasa de crecimiento, en cm/día, para cada planta

medida. Esta tasa se denomina velocidad de extensión de la hoja (VEH).

Al 8º día del tratamiento se realizó una estimación del contenido de clorofila usando el Minolta SPAD-502 (Spectrum Technologies, Plainfield, IL). Esta medición se tomó en una posición en mitad de la hoja (de la base a la punta) de la hoja más joven completamente extendida para 6 de los 21 acontecimientos. Se recogieron lecturas del SPAD para cada una de las 6 plantas positivas transgénicas y las 6 plantas negativas transgénicas en cada parcela emparejada, para cada repetición de parcela emparejada.

De forma similar, al 8º día del tratamiento, se midieron las tasas fotosintéticas a mediodía, usando la mitad de la hoja de la hoja más joven completamente extendida para los mismos 6 de los 21 acontecimientos. Se midieron las tasas fotosintéticas usando el sistema de fotosíntesis portátil Ciras-1 de PP System (Amesbury, MA). Se midió la fotosíntesis de la hoja a una presión atmosférica [CO₂] de 367 mol mol⁻¹, una presión de vapor de agua ambiental de 2,3 kPa, y un déficit de presión de vapor de aire en la hoja entre 0,6 y 1,5 kPa, con densidad de flujo fotónico fotosintético entre 1.200 y 1.400 mol·m⁻²·s⁻¹.

Se evaluaron veintidós acontecimientos CspB en el ensayo de campo de Kansas. El tratamiento del déficit de agua dio como resultado una reducción promedio de las tasas de crecimiento al 50 % de la velocidad con buena irrigación. Como una construcción, los transgénicos para CspB demostraron un aumento del 3,6 % de las velocidades de extensión de la hoja en relación con los controles no transgénicos (Tabla 2). MON87460 y un segundo acontecimiento de alto rendimiento demostraron aumentos de la tasa de crecimiento del 12 y el 24 %. Las plantas positivas para CspB también demostraron mejoras significativas en el contenido de clorofila y las tasas fotosintéticas (Tabla 2). En nivel de construcción, el contenido de clorofila aumentó en un 2,5 %, exhibiendo MON87460 y un segundo acontecimiento de alto rendimiento aumentos del 4,4 y el 3,3 %. Las mejoras de las tasas fotosintéticas fueron del 3,6 % a nivel de construcción, con aumentos del 8,5 y 7,7 % para MON87460 y un segundo acontecimiento de alto rendimiento.

Tabla 2 Crecimiento mejorado de los acontecimientos cspB en condiciones de déficit de agua en el campo

<u>Gen-Acontecimiento</u>	<u>% incremento de VEH (campo)</u>	<u>% incremento del contenido de clorofila</u>	<u>% incremento de la fotosíntesis</u>
CspB–Construcción	3,6 %	2,5 %	3,6 %
CspB–Zm Acontecimiento MON87460	12 %	4,4 %	8,5 %
CspB–Zm Acontecimiento 2	24 %	3,3 %	7,7 %

25 **Ejemplo 4 Rendimiento mejorado de plantas de maíz MON87460 con tratamiento de agua limitada**

El rendimiento de producción de 10 acontecimientos CspB integrados de forma independiente, la mayoría de los cuales habían demostrado previamente una mejora del rendimiento vegetativo en exploraciones en invernadero o ensayos de campo, se evaluó en un fondo genético híbrido de élite en 4 localizaciones en California central en las que se aplicó un tratamiento de agua limitada. El tratamiento de agua limitada se aplicó reduciendo la irrigación durante un periodo de 14 días durante el estadio de desarrollo vegetativo tardío, inmediatamente antes de la floración. El tratamiento dio como resultado una reducción neta de aproximadamente 49,2 cm³ de agua en relación con un régimen de buena irrigación. Esto se consiguió omitiendo dos de tres aplicaciones de 24,6 cm³ agua durante el periodo de estrés. El tratamiento redujo la tasa de crecimiento relativa durante el tratamiento en aproximadamente 50 % de las tasas de buena irrigación y redujo de forma similar la producción promedio de grano a final de temporada en un 50 %. Cada localización de ensayo se diseñó como un diseño en bloque desequilibrado de grupos de 4 factores y se plantaron 3 repeticiones por localización. Dentro de cada repetición, los genotipos se aleatorizaron como el primer factor y las construcciones, los acontecimientos y las parcelas positivas para el gen frente a negativas para el gen se aleatorizaron como el 2º, 3er y 4º factores, respectivamente. El diseño situó las entradas positivas y negativas para cada selección en parcelas de 2 filas adyacentes. La densidad de población final reflejó las prácticas de plantación locales y varió de 65 a 76 plantas por parcela de 2 filas. Las parcelas eran de 6,4 metros de longitud (21 pies) y la separación de las filas varió de 76 a 102 cm (30 a 40 pulgadas), lo que refleja las prácticas de plantación locales.

Se recogieron datos de producción de grano de los ensayos de campo con agua limitada y se proporcionan en la Tabla 3 más adelante. La producción media en los campos de California con agua limitada fue de 6,8 t/Ha, lo que representa una reducción del 50 % en la producción en relación con el promedio de la producción media de cultivos en el medio oeste. Los promedios de producción de las plantas positivas para CspB como una construcción fueron significativamente mayores, en un 7,5 % (p<0,01). Varios acontecimientos individuales mostraron también ventajas de producción significativas. CspB–Zm MON87460 fue el acontecimiento de mejor rendimiento y demostró una

mejora de la producción del 20,4 %.

Tabla 3 Rendimiento mejorado de los acontecimientos *cspB* en condiciones de agua limitada en el campo

<u>Acontecimiento</u>	<u>Rendimiento (t/ha)</u>	<u>% de mejora</u>
Media de <i>CspB</i> no transgénica	6,86	
Media de <i>CspB</i> -Construcción	7,38	7,5 %
<i>CspB</i> -Zm Acontecimiento MON87460	8,26	20,4 %
<i>CspB</i> -Zm Acontecimiento 2	7,61	10,9 %

5 El acontecimiento MON87460 también demostró mejoras significativas en el crecimiento de las hojas, el contenido de clorofila y las tasas fotosintéticas, lo que proporciona signos de que estas mejoras en la productividad vegetativa se traducen en mejoras del rendimiento reproductivo y la producción de grano, con lo que se identifica a MON87460 como el de mejor rendimiento entre los múltiples acontecimientos transgénicos independientes analizados en estudios de invernadero o de campo.

Ejemplo 5 Análisis molecular

10 LMON87460 se caracterizó mediante análisis moleculares detallados, incluyendo detecciones selectivas para el número de insertos (número de sitios de integración dentro del genoma de maíz), número de copias (el número de copias del ADN-T dentro de un locus), la integridad de los casetes insertados y la ausencia de secuencia de cadena principal.

Análisis de transferencia de tipo Southern

15 Se secaron aproximadamente 2-3 g de tejido de la hoja en un liofilizador durante ~48 horas y se molieron añadiendo perlas metálicas pequeñas y agitando en un agitador de pintura. Cada muestra se mezcló con 6 ml de tampón de extracción (Tris 0,1M a pH 8, EDTA 0,05 M, NaCl 0,5M, SDS al 1 % con BME al 0,071 % añadido nuevo), se introdujo en un baño de agua a 65 °C durante 45 minutos y se mezcló ocasionalmente. Se añadió acetato potásico 5M (2 ml), los tubos se invirtieron después dos veces y se transfirieron a un baño de hielo durante 20 minutos. Se añadió cloroformo frío (3 ml) y se mezcló suavemente mediante inversión durante 10 minutos. Las muestras se centrifugaron a 3.500 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se transfirió a tubos nuevos y se combinó con 4 ml de isopropanol frío. Las muestras se centrifugaron a 3.500 rpm durante 15 minutos y el sobrenadante se descartó. El sedimento se resuspendió en 2 ml de tampón T50E10 con RNasa 0,1 mg/ml y se incubó a 65 °C durante 20 minutos. Para precipitar el ADN, se añadieron 3 ml de isopropanol/acetato de amonio 4,4M (7:1) a cada tubo y se invirtió para mezclar. Las muestras se centrifugaron a 3.500 rpm durante 15 minutos y el sobrenadante se descartó. Los sedimentos se aclararon con 0,5-1,0 ml de EtOH al 80 %, después se transfirieron a tubos de microcentrífuga. Después de una breve centrifugación en una microcentrífuga, el sobrenadante se descartó y se permitió que los sedimentos se secaran al aire. Los sedimentos se resuspendieron en ~ 200 µl de tampón TE.

30 Aproximadamente 10 µg de ADN genómico se digirieron usando 100 unidades de diversas enzimas de restricción en un volumen total de 500 µl. Las fracciones digeridas se incubaron a 37 °C durante una noche y se precipitaron con EtOH. ADN digerido se sedimentó después y se volvió a disolver en 20 µl de tampón TE. Se prepararon moldes de la sonda de ADN mediante amplificación por PCR del plásmido pMON73608. Se marcaron aproximadamente 25 ng de cada sonda con ~100 µCi de ³²P-dCTP (Amersham n.º de catálogo AA0075) usando cebado aleatorio (sistema de marcaje de ADN Radprime®, Invitrogen). Las sondas radiomarcadas se purificaron usando una columna Sephadex G-50 (Roche). Las muestras se cargaron en geles TAE al 0,8 % y se procesaron durante 14-18 horas a 30-35 V. Después de la electroforesis, los geles se tiñeron en 1,5 µg/ml de bromuro de etidio durante 10-15 minutos y después se fotografiaron. Los geles se introdujeron después en solución de despurinización (HCl 0,125 N) durante 10-15 minutos, seguido de una solución de desnaturalización (NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M), durante 30-40 minutos y después una solución neutralizadora (Tris-HCl 0,5 M pH 7,0, NaCl 1,5 M) durante 30-40 minutos. Los geles se transfirieron después a una solución de 20X SSC durante 5-15 minutos. La transferencia capilar de ADN (Southern, 1975) sobre una membrana de nylon Hybond-N (Amersham) se facilitó durante una noche usando un Turboblotter™ (Schleicher y Schuell) con tampón de transferencia de 20X SSC. El ADN se reticuló covalentemente con la membrana con un UV Stratalinker® 1800 (Stratagene) usando el ajuste de autoreticulación y se almacenó a 4 °C hasta que se requiriera. Las membranas se incubaron durante 1-4 horas a 60-65 °C en tampón de prehibridación (Na₂HPO₄·250mM, 7H₂O a pH 7,2, SDS al 7 % y ARNt 0,1 mg/ml). La sonda marcada con ³²P se añadió a tampón de prehibridación nuevo y se hibridó durante una noche a 60-65 °C. Las membranas se lavaron 3 veces en una solución acuosa de SDS al 0,1 % y 0,1X SSC durante 15-20 minutos.

Las sondas incluyeron las regiones de codificación *cspB* and *nptII* intactas y sus respectivos promotores, intrones y

secuencias de poliadenilación y la cadena principal del plásmido. No se identificaron en el genoma de estos acontecimientos de maíz elementos adicionales del vector de transformación original, unidos o no unidos a los casetes intactos. No se detectó ninguna secuencia de cadena principal.

5 Los datos muestran que el acontecimiento de maíz MON87460 contiene una única inserción de ADN-T con una copia de los casetes de *cspB* y *nptII*.

Los resultados de reacciones que usaban el promotor de la actina de arroz y sondas de secuencias de intrones indicaron que la secuencia promotora de la actina de arroz completa presente en pMON73608 no está presente en MON87460. Se confirmó que el elemento de intrón de actina de arroz estaba intacto en MON87460.

Análisis de transferencia de tip Northern

10 Se aisló ARN del acontecimiento de maíz MON87460 y tejido de hoja silvestre de plantas cultivadas en invernadero de muestras de tejido de un gramo usando un kit ToTALLY RNA™ (Ambion n.º de catálogo 1910). Se prepararon muestras que contenían 5, 10, 25 y 50 µg de MON87460 y ARN silvestre y se procesaron en un gel de agarosa al 1,0 % a 120V durante aproximadamente 2 horas. Después de la electroforesis, los geles se aclararon después en H₂O desionizada transferida a membranas de nylon. Se permitió la transferencia de los geles durante una noche. Las transferencias se reticularon covalentemente y se situaron a 4 °C para almacenamiento a corto plazo. Antes de la prehibridación, las transferencias se aclararon previamente en 10X SSC durante 2 minutos. Las transferencias se situaron después en frascos de hibridación individuales con 20 ml de tampón Sigma Hyb (n.º de catálogo H7033) y se prehibridaron a 65 °C durante 1 hora.

20 Se marcaron aproximadamente 25 ng de los moldes de sonda *cspB* and *nptII* con ~50 µCi de ³²P-dCTP usando cebado aleatorio (sistema de marcaje de ADN Radprime®, Invitrogen). A continuación, las sondas radiomarcadas *cspB* y *nptII* desnaturalizadas se añadieron a tubos separados que contenían 5 ml de tampón de hibridación precalentado. El tampón que contenía cada sonda se mezcló después y se añadió al frasco de hibridación apropiado y se hibridó durante una noche. Después de una hibridación durante una noche, se retiraron las transferencias del frasco y se introdujeron en tampón de lavado de baja rigurosidad (2X SSC, SDS al 0,1 %) en una bandeja de vidrio y se introdujeron en un agitador durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las transferencias se colocaron sobre papel de transferencia y después en frascos de hibridación nuevos con 25 ml de tampón de lavado precalentado de baja rigurosidad (65 °C). Las transferencias se lavaron a 65 °C, dos veces en tampón de lavado de baja rigurosidad durante 15 minutos y una vez a 65 °C, en tampón de lavado de alta rigurosidad (0,5X SSC, SDS al 0,1 %) durante 15 minutos.

30 El análisis de transferencia de tipo Northern confirmó que los transcritos del tamaño esperado tanto para *cspB* (~600 nucleótidos) como para *nptII* (~1100 nucleótidos) se generaron en MON87460.

Secuenciación del inserto de ADN-T y ADN genómico de maíz flanqueante en el clon lambda

35 Se aisló ADN genómico de alta calidad del acontecimiento de maíz MON87460 usando un procedimiento de extracción con cloroformo SDS. El ADN genómico de MON87460 se digirió con *MfeI* y se purificó usando el Kit de Extracción en Gel QIAEX® II (Qiagen), para asegurar la purificación de fragmentos mayores de 10 kb. Este ADN genómico digerido y purificado se usó para ligación en el kit del vector Lambda DASH® II/EcoRI (Stratagene). Se exploraron aproximadamente 2,5 x 10⁵ colonias usando intrón Ract marcado con ³²P y sondas de *cspB*. Se usó ADN purificado de un clon lambda de bacteriófago puro como molde en reacciones de secuenciación para confirmar la secuencia de nucleótidos de ADN-T del inserto de MON87460 y el ADN genómico de maíz que flanquea los extremos 5' y 3' del inserto de MON87460.

45 El análisis de la secuencia de ADN confirma que el ADN-T en la planta en MON87460 es idéntico a la secuencia correspondiente en pMON73608. Este análisis de secuencia también caracterizó el alcance del truncamiento del extremo 5' del promotor de la actina de arroz que se había observado en el análisis de tipo Southern. El análisis de secuencia reveló que el RB de *Agrobacterium* y la mayor parte del promotor P-ract no están presentes en el acontecimiento MON87460. El promotor P-ract en MON87460 consiste solamente en 108 pb del extremo 3' de la región promotora de actina de arroz completa (~ 850 nucleótidos) en pMON73608. Este resultado también confirma que la secuencia en la planta para *cspB* y *nptII* en el acontecimiento del maíz MON87460 coincide con las regiones de codificación exactas dentro del vector de transformación pMON73608. Este clon también confirmó 1.060 pb de la secuencia flanqueante 5', 3.309 pb del inserto de ADN-T y 1.260 pb de la secuencia flanqueante 3' para el inserto de MON87460.

Análisis de alelos silvestres

55 Se realizó PCR en ADN genómico de la línea de maíz no transgénico usada en la transformación usando cebadores que hibridan con las regiones flanqueantes 5' y 3' del inserto de MON87460. Se realizó múltiples combinaciones de cebadores consistiendo cada combinación en un cebador que hibrida con la región flanqueante 5' y 3', respectivamente. El análisis PCR se realizó usando ~50 ng de molde de ADN genómico en un volumen de reacción de 50 µl. Después se secuenciaron los amplicones resultantes. El análisis del alelo silvestre mostró que se había producido una delección de 22 pb del ADN genómico de maíz (SEQ ID NO: 23) tras la integración del ADN-T

de MON87460 en el cromosoma de maíz.

Ejemplo 6 Detección de polinucleótidos del acontecimiento MON87460

La detección del acontecimiento MON87460 en la descendencia resultante del cultivo con una línea MON87460 puede conseguirse mediante la extracción de ADN genómico de tejidos de plantas de maíz y el análisis con respecto a polinucleótidos específicos de MON87460. Es de interés particular para la identificación de polinucleótidos de MON87460 el uso de PCR para amplificar el ADN genómico que comprende secuencias de unión transgénica/genómica.

Un amplicón diagnóstico de MON87460 comprende al menos una secuencia de unión, SEQ ID NO: 1 o SEC ID N° 2 (Figura 2). La SEQ ID NO: 1 corresponde a la unión de la secuencia flanqueante en 5' designada de forma arbitraria (posiciones 1.051 a 1.060 de la SEQ ID NO: 5) y la región 5' del promotor de la actina de arroz truncado (posiciones 1-10 de la SEQ ID NO: 7) en la construcción de expresión de *cspB*. La SEQ ID NO: 2 corresponde a la unión del extremo izquierdo integrado de pMON73608 (posiciones 3.300 a 3.309 de la SEQ ID NO: 7) y la secuencia flanqueante en 3' designada de forma arbitraria (posiciones 1 a 10 de la SEQ ID NO: 6).

Los pares de cebadores del acontecimiento que producirán un amplicón de diagnóstico para MON87460 incluyen pares de cebadores basados en las secuencias flanqueantes y el ADN insertado de pMON73608. Para generar un amplicón de diagnóstico que comprende al menos 11 nucleótidos de la SEQ ID NO: 1, se preparan un cebador directo basado en la SEQ ID NO: 5 y un cebador inverso basado en la secuencia transgénica insertada, SEQ ID NO: 7. De forma similar, para generar un amplicón de diagnóstico que comprende al menos 11 nucleótidos de la SEQ ID NO: 2, se preparan un cebador directo basado en la secuencia transgénica insertada, SEQ ID NO: 7 y un cebador inverso basado en la secuencia flanqueante en 3', SEQ ID NO: 6. Resulta fácilmente evidente para un experto en la materia que los pares de cebadores también pueden diseñarse para producir un amplicón que comprenda polinucleótidos complementarios de al menos 11 nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2, en cuyo caso las secuencias directa e inversa se basan en secuencias complementarias de las de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7.

Se diseñan cebadores que producen amplicones que tienen entre 50 y 1000 bases. Las condiciones de amplificación son como se ilustra en la Tabla 4 y la Tabla 5 más adelante e incluyen un control de tejido positivo del acontecimiento MON87460, un control negativo de una planta de maíz que no es el acontecimiento MON87460 y un control negativo que no contiene ADN genómico de maíz. Puede usarse un par de cebadores que amplificarán una molécula de ADN de maíz endógena, tal como del gen de ADH, como un control interno para las condiciones de amplificación de ADN.

El ADN de la planta de maíz para su uso en reacciones de amplificación de ADN puede aislarse de cualquier tejido de planta de maíz adecuado, y, preferentemente, se aísla de tejido de la hoja recién formado de plantas de < 1 mes de edad para reacciones como se describe en el presente documento. El tejido de la hoja se recoge usando un punzón de agujero de 7 mm convencional, para recoger tejido equivalente a un trozo de hoja de aproximadamente 1 centímetro de anchura y 2,5 centímetros (1 pulgada) de longitud. Las muestras tisulares se liofilizan y el tejido seco se muele añadiendo perlas de circonio-sílice de 4-6 mm³ a cada muestra tisular en un tubo de polipropileno y agitando en un agitador de pintura. Las muestras de tejido homogeneizadas se mezclan en una placa de 96 pocillos con 395µl de tampón de extracción de SDS precalentado (Tris 0,1 M pH 8, EDTA 10 mM, NaCl 1,0 M, SDS al 1 %), se agitan en vórtex brevemente y se incuban a 65 °C durante 45 minutos. Se añaden 135 µl de acetato potásico frío (5M). Las muestras se mezclan por agitación en vórtex y la placa se centrifuga a 3.300 rpm durante 20 minutos. Se transfieren 100 µl de sobrenadante a una placa de 96 pocillos nueva que contiene 100 µl de isopropanol y las muestras se agitan en vórtex para mezclar. La placa se centrifuga a 3.300 rpm durante 20 minutos y el sobrenadante se descarta. Las placas se escurren boca abajo durante 1 minuto. Se añaden 300 µl de etanol al 70 % frío y la placa se agita en vórtex brevemente y se sitúa a 4 °C durante 30 minutos. La placa se centrifuga a 3.300 rpm durante 20 minutos y el sobrenadante se descarta. La placa se escurre boca abajo y se repite la precipitación con etanol. Después de una centrifugación final (3.300 rpm 20 minutos), la placa se escurre durante un minuto y se sitúa en su lateral en un horno a 65 °C durante aproximadamente 15-30 minutos para secar el sedimento. El ADN se resuspende en 100 µl de tampón TE A pH 8,0 (Sigma) que contiene RNasa (10 µg/ml. El ADN se almacena a 4 °C durante una noche. El rendimiento de ADN es de aproximadamente 1 µg (10ng/µl).

El ensayo para el amplicón de MON87460 puede realizarse usando un Sistema de PCR Applied Biosystems GeneAmp 9700, Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700 o termociclador de Gradiente Eppendorf Mastercycler o cualquier otro sistema de amplificación que puede usarse para producir un amplicón diagnóstico de MON87460.

Tabla 4. PCR Específica del acontecimiento MON87460 de Maíz

Etapa	Reactivo	Volumen	Comentarios
1	Agua de 18 megaohmios	ajuste para volumen final de 10 µl	
2	2X Mezcla maestra universal 2X (contiene dNTP, enzima y tampón)	5,0 µl	1X concentración final de dNTP, enzima y tampón
3	Mezcla de cebador 1 y cebador 2 (resuspendidos en agua de 18 megaohmios a una concentración de 20 µM para cada cebador) Ejemplo: En un tubo de microcentrífuga, debería añadirse lo siguiente para alcanzar 500 µl a una concentración final de 20 µM: 100 µl del cebador 1 a una concentración de 100 µM 100 µl del cebador 2 a una concentración de 100 µM 300 µl de agua de 18 megaohmios	0,5 µl	concentración final de 1,0 µM
4	Molde de ADN extraído (5-10 ng cada uno): Muestras de hoja para analizar Control negativo (ADN no transgénico) Control de agua negativo (control sin molde) Control positivo (ADN de MON87460)	3,0 µl	

Tabla 5. Condiciones del termociclador TaqMan de punto final

Nº de ciclo	Parámetros	
1	50 °C	2 minutos
1	95 °C	10 minutos
10	95 °C	15 segundos
	64 °C	1 minuto (-1 °C/ciclo)
30	95 °C	15 segundos
	54 °C	1 minuto
1	10 °C	Siempre

5

Se muestra que los amplicones producidos usando los pares de cebadores diseñados contienen polinucleótidos de MON87460 mediante hibridación con sondas específicas para las secuencias de unión de MON87460 SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, o mediante aislamiento y análisis de la secuencia de ADN.

Ejemplo 7 Ensayo específico de acontecimiento TaqMan de punto final

10 En el presente documento se describe una reacción de PCR de TaqMan de punto final específica del acontecimiento MON87460. Con TaqMan de punto final, la señal correspondiente a una amplificación particular se cuantifica usando un sistema de detección fluorescente después de que se complete el ciclo de reacción. El uso de las tres hibridaciones específicas de sitio (dos cebadores de PCR y una sonda marcada con fluorescencia) para la generación de señal proporciona un ensayo altamente específico. La sonda hibrida con nucleótidos específicos entre los cebadores directo e inverso. Cuando la extensión de nucleótidos alcanza la sonda hibridada, la taq polimerasa

15

degrada la sonda que libera el flúor del inactivador, de modo que se emite una señal. La señal se lee después de que se completen las reacciones.

Los cebadores polinucleotídicos usados en el ensayo de punto final son los cebadores SQ10443 (SEQ ID NO: 8), SQ10445 (SEQ ID NO: 9) y la sonda usada para detectar el amplicón de MON87460 es la sonda MGBNFQ (unión al surco menor, inactivador no fluorescente) PB3814 marcada con 6FAM™ (SEQ ID NO: 10). También puede usarse un cebador de ADN de maíz interno para confirmar la integridad del ADN molde. Por ejemplo, puede conseguirse la amplificación del alcohol deshidrogenasa (ADH), un gen endógeno de una única copia dentro del genoma de maíz, usando los cebadores SQ5263 (SEQ ID NO: 11) y SQ5264 (SEQ ID NO: 12) y detectarse con la sonda PB2033 VIC™ (fluorocromo indicador) y TAMRA™ (fluorocromo interruptor) (SEQ ID NO: 13). 6FAM™, VIC™ y TAMRA™ son productos colorantes fluorescentes de Applied Biosystems (Foster City, CA) unidos a las sondas de ADN. En estos análisis, la Taq ADN polimerasa escinde sondas que hibridan específicamente con el ADN amplificado y libera el fluoróforo. La separación de fluoróforo y el inactivador permite que se produzca fluorescencia, que es diagnóstica en estas condiciones de la presencia de polinucleótidos MON87460.

SQ10443 (SEQ ID NO: 8), SQ10445 (SEQ ID NO: 9) cuando se usan como se describe en la Tabla 2 posterior producen un amplicón de ADN de 68 nucleótidos (SEQ ID NO: 20) que es diagnóstico del acontecimiento de ADN MON87460 y se detecta mediante hibridación con una sonda polinucleotídica, tal como PB3814. Este ensayo se ha optimizado para su uso en el formato de 96 pocillos o 384 pocillos usando un sistema de PCR Applied Biosystems GeneAmp 10 9700 o MJ Research DNA Engine PTC-225. Los expertos en la materia pueden conocer otros procedimientos y aparatos, y usarlos para producir amplicones que identifiquen el ADN del acontecimiento MON87460. Pueden necesitarse ajustes de los parámetros de ciclación para asegurar que las velocidades de rampa son equivalentes. Se usan muestras de tejido de hoja de maíz en los análisis posteriores y deberían molerse exhaustivamente para producir una muestra homogénea. El ADN de la hoja de maíz se aísla como se ha descrito en el ejemplo 6. La concentración del ADN de la hoja que se va a analizar está, preferentemente, dentro del intervalo de 5-10 ng mediante reacción de PCR. El ADN de control debería extraerse usando el mismo procedimiento que para la extracción de las muestras que se van a analizar. Los controles para este análisis deberían incluir un control positivo de maíz que se sabe que contiene el ADN del acontecimiento MON87460, un control negativo de maíz no transgénico y un control negativo que no contiene ADN molde.

Para las reacciones de PCR que usan un sistema de PCR Applied Biosystems GeneAmp 9700 o termociclador MJ Research DNA Engine PTC-225, se usan los parámetros de ciclación que se describen en la tabla 3, posterior. Cuando se realiza la PCR en el Perkin-Elmer 9700, el termociclador se utiliza con la velocidad de rampa ajustada al máximo.

Tabla 6. PCR TaqMan de punto final específica del acontecimiento de maíz MON87460

Etapa	Reactivo	Volumen	Comentarios
1	Agua de 18 megaohmios	ajuste para volumen final de 10 μ l	
2	2X Mezcla maestra universal 2X (contiene dNTP, enzima y tampón)	5,0 μ l	1X concentración final de dNTP, enzima y tampón
3	Mezcla de cebador 1 y cebador 2 (resuspendidos en agua de 18 megaohmios a una concentración de 20 μ M para cada cebador) Ejemplo: En un tubo de microcentrífuga, debería añadirse lo siguiente para alcanzar 500 μ l a una concentración final de 20 μ M: 100 μ l del cebador SQ10443 a una concentración de 100 μ M 100 μ l del cebador SQ10445 a una concentración de 100 μ M 300 μ l de agua de 18 megohmios	0,5 μ l	Concentración final 1,0 μ M
4	Sonda MGBNFQ PB3814 de acontecimiento 6-FAM™ (resuspendida en agua de 18 megaohmios a una concentración de 10 μ M)	0,2 μ l	Concentración final 0,2 μ M

(continuación)

5	Cebador control Interno 1 (SQ5263) y cebador control Interno 2 (SQ5264) Mezcla (resuspendidos en agua de 18 megaohmios a una concentración de 20 µM para cada cebador)	0,5 µl	Concentración final 1,0 µM
6	Sonda de control Interno VIC™ (PB2033; SEQ ID NO: 13) resuspendida en agua de 18 megaohmios hasta una concentración de 10 µM	0,2 µl	Concentración final 0,2 µM
7	Molde de ADN extraído (5-10 ng cada uno): Muestras de hoja para analizar control negativo (ADN no transgénico) control de agua negativo (control sin molde) control positivo (ADN de MON87460)	3,0 µl	

Tabla 7. Condiciones del termociclador TaqMan de punto final

Nº de ciclo	Parámetros	
1	50 °C	2 minutos
1	95 °C	10 minutos
10	95 °C	15 segundos
	64 °C	1 minuto (-1 °C/ciclo)
30	95 °C	15 segundos
	54 °C	1 minuto
1	10 °C	Siempre

5 Ejemplo 8 Ensayo de cigosidad de PCR de TaqMan de punto final

Se describe un ensayo específico para detectar la presencia y cigosidad (homocigoto o hemocigoto) del acontecimiento transgénico MON87460 en el ADN genómico extraído de tejido de hoja de maíz como se ha descrito en el ejemplo 6. La determinación de la cigosidad para el acontecimiento MON87460 en una muestra se realizó usando una PCR TaqMan de punto final de la cigosidad específica del acontecimiento para la que se describen ejemplos de las condiciones en la tabla 8 y la tabla 9. Las sondas y cebadores de ADN usados en el ensayo de cigosidad son los cebadores SQ21105 (SEQ ID NO: 14) y SQ21106 (SEQ ID NO: 15), y la sonda MGB (unión al surco menor) PB3771 marcada con 6FAM™ (SEQ ID NO: 16) para la detección de polinucleótidos de unión de MON87460 y los cebadores SQ21195 (SEQ ID NO: 17) y SQ21196 (SEQ ID NO: 18) y la sonda MGB PB10223 marcada con VIC™ (SEQ ID NO: 19) para la detección del ADN de maíz silvestre en el sitio de inserción.

SQ21105 (SEQ ID NO: 14) y SQ21106 (SEQ ID NO: 15) cuando se usan en estos procedimientos de reacción con PB3771 (SEQ ID NO: 16) producen un amplicón de ADN marcado de 134 nucleótidos (SEQ ID NO: 21) que es diagnóstico del ADN del acontecimiento MON87460. SQ21195 (SEQ ID NO: 17) y SQ21196 (SEQ ID NO: 18), cuando se usan en estos procedimientos de reacción con PB2512 (SEC ID N° 12) producen un amplicón de ADN de 145 nucleótidos (SEQ ID NO: 22) que es diagnóstico del alelo silvestre. La sonda para esta reacción es específica de la delección de 22 pb del ADN genómico (SEQ ID NO: 23) que se produjo en el sitio de inserción de MON87460. La heterocigosidad se determina mediante la presencia de ambos amplicones, como se demuestra por la liberación de señal fluorescente de ambas sondas PB3771 y PB10223. El material genético de la planta de maíz homocigota se identifica mediante la liberación únicamente la señal 6FAM™ de PB3771. Los controles para este análisis deberían incluir un control positivo de las muestras homocigotas y hemocigotas de la planta de maíz para el ADN del acontecimiento MON87460, un control negativo del maíz no transgénico y un control negativo que no contiene ADN molde.

Este ensayo se ha optimizado para su uso en el formato de 96 pocillos o 384 pocillos usando un sistema de PCR Applied Biosystems GeneAmp 9700 o MJ Research DNA Engine PTC-225. Cuando se realiza la PCR en el MJ Engine, el termociclador debería funcionar en el modo calculado. Cuando se realiza la PCR en el Perkin-Elmer 9700, el termociclador se utiliza con la velocidad de rampa ajustada al máximo.

Tabla 8. PCR TaqMan de punto final de cigosidad específica del acontecimiento de maíz MON87460

Etapa	Reactivo	Volumen	Comentarios
1	Agua de 18 megaohmios	ajuste para volumen final de 10 µl	
2	2X Mezcla maestra universal 2X (contiene dNTP, enzima y tampón)	5,0 µl	1X concentración final de dNTP, enzima y tampón
3	Mezcla de cebador 1 y cebador 2 (resuspendidos en agua de 18 megaohmios a una concentración de 20 µM para cada cebador) Ejemplo: En un tubo de microcentrífuga, debería añadirse lo siguiente para alcanzar 500 µl a una concentración final de 20 µM: 100 µl del cebador SQ21105 a una concentración de 100 µM 100 µl del cebador SQ21106 a una concentración de 100 µM 300 µl de agua de 18 megohmios	0,5 µl	Concentración final 1,0 µM
4	Sonda MGB PB3771 de acontecimiento 6-FAM™ (resuspendida en agua de 18 megaohmios a una concentración de 10 µM)	0,2 µl	Concentración final 0,2 µM
5	Mezcla de cebador 1 silvestre (SQ21195) y cebador 2 silvestre (SQ21196) (resuspendidos en agua de 18 megaohmios a una concentración de 20 µM para cada cebador)	0,5 µl	Concentración final 1,0 µM
6	Sonda MGB (PB10223) silvestre VIC™ resuspendida en agua de 18 megaohmios a una concentración de 10 µM	0,2 µl	Concentración final 0,2 µM
7	Molde de ADN extraído (5-10 ng cada uno): Muestras de hoja para analizar Control negativo (ADN no transgénico) Control de agua negativo (control sin molde) Control positivo (ADN homocigoto de MON87460) Control positivo (ADN de MON87460 hemicigoto)	3,0 µl	

Tabla 9. Condiciones del termociclador TaqMan de cigosidad de punto final

N.º de ciclo	Parámetros	
1	50 °C	2 minutos
1	95 °C	10 minutos
10	95 °C	15 segundos
	64 °C	1 minuto (-1 °C/ciclo)
30	95 °C	15 segundos
	54 °C	1 minuto
1	10 °C	Siempre

Ejemplo 9 Rendimiento de producción de MON87460

Se realizaron ensayos de campo adicionales con acontecimiento de expresión de CspB, MON87460, para investigar adicionalmente la capacidad de este acontecimiento para proporcionar tolerancia al déficit de agua durante los estadios del desarrollo vegetativo tardío y reproductivo. Estos son estadios muy importantes desde una perspectiva agrícola debido a la sensibilidad del cultivo en estos estadios de crecimiento y la frecuencia con la se produce una sequía durante estos estadios del desarrollo en las regiones de crecimiento diana.

El rendimiento de producción de MON87460 se evaluó en tres fondos genéticos híbridos de élite en 5 localizaciones repetidas a lo largo de California central y el oeste de Kansas, donde se aplicaron dos tratamientos con limitación de agua distintos. El tratamiento vegetativo tardío se aplicó a los ensayos reduciendo la irrigación durante un periodo de 14 días durante el estadio de desarrollo vegetativo tardío, inmediatamente antes de la floración. El tratamiento redujo la tasa de crecimiento relativa durante el tratamiento en aproximadamente 50 % de las tasas de buena irrigación y redujo de forma similar la producción promedio de grano a final de temporada en un 50 %. Se consiguió un tratamiento de llenado de grano iniciando las condiciones limitantes de agua en un estadio posterior, en relación con el tratamiento vegetativo, agotando el perfil de humedad del suelo en la floración o cerca de la floración y consiguiendo un estrés máximo durante el periodo de llenado del grano. Este tratamiento dio como resultado una reducción de aproximadamente el 25 % de las alturas de las plantas y una reducción del 30-40 % en la producción de grano como resultado de la imposición del estrés. Se evaluaron tres híbridos que expresaban el acontecimiento CspB usando 20 repeticiones de datos a lo largo de 5 localizaciones para cada ventana de tratamiento con estrés.

Cada localización de ensayo se diseñó como un diseño en bloque desequilibrado de grupos de 3 factores y se plantaron 4 repeticiones por localización. Dentro de cada repetición, los genotipos se aleatorizaron como el primer factor y los acontecimientos y las parcelas positivas para el gen frente a negativas para el gen se aleatorizaron como el 2º y 3º factores, respectivamente. El diseño situó las entradas positivas y negativas para cada selección en parcelas de 2 filas adyacentes. La densidad de población final reflejó las prácticas de plantación locales y varió de 65 a 76 plantas por parcela de 2 filas. Las parcelas eran de 6,4 metros de longitud (21 pies) y la separación de las filas varió de 76 a 102 cm (30 a 40 pulgadas), lo que refleja las prácticas de plantación locales.

El análisis de los datos de producción se realizó usando la versión 9.1.3 del software SAS/STAT (SAS Institute Inc., 2003). El análisis de los cálculos de la varianza se realizó usando los procedimientos MIXED y GLIMMIX. Se identificaron los datos anómalos individualmente en cada localización calculando los residuales analizados por t de Student suprimidos con respecto al modelo lineal correspondiente para una única localización, comparando esos residuales con cero usando pruebas t a una tasa de error de tipo I por experimento del 5 % usando valores p ajustados por Bonferroni y eliminando los datos anómalos identificados. Después de dos pases a través de los datos, todas las observaciones restantes se incluyeron en los análisis. Se determinó la producción para cada parcela y se analizó usando un modelo mixto con efectos fijos para las construcciones y acontecimientos anidados dentro de las construcciones y los efectos aleatorios para las localizaciones, repeticiones dentro de las localizaciones y la interacción de las localizaciones con las construcciones. Estos análisis se realizaron por separado para cada híbrido. Se realizaron comparaciones de los promedios del acontecimiento y la construcción con entradas emparejadas negativas con pruebas t aplicadas a las medias de mínimos cuadrados. La estabilidad de la producción se examinó comparando las estimaciones de la regresión lineal simple derivadas de los acontecimientos positivos y negativos. En ambos casos, el modelo de regresión incluía la producción promedio del acontecimiento en una localización como la respuesta y la producción promedio de un linaje de comprobación comercial en la misma localización que el predictor. A continuación se compararon las entradas positivas y negativas usando sus producciones predichas a partir del modelo de regresión a diversas producciones de referencia de la comprobación comercial.

Las plantas de maíz MON87460 mostraron mejoras en la producción de grano al final de temporada a lo largo de las diferentes entradas híbridas y en ambos regímenes de estrés por agua en comparación con un control silvestre convencional del mismo fondo genético (Tabla 10). Los beneficios de la producción de estos experimentos variaron del 11 % hasta el 21 % a lo largo de los valores de producción promedio de 6,4 a 8,5 t/Ha. El acontecimiento CspB transgénico produjo de forma uniforme más que los controles no transgénicos en al menos 0,5 t/Ha en 12 de 15 tratamientos de estrés reproductivo y en 13 de 15 tratamientos de estrés vegetativo.

Tabla 10 Resultados de producción de MON87460 en condiciones con déficit de agua con irrigación controlada

Clase de estrés	Entradas	Producción media Pos (t/Ha)	Comprobación de la producción media Pos (t/Ha)	diferencia de t/Ha	% de diferencia
Vegetativo	Híbrido 1 (positivo)	10,1	8,5	1,6	19
Reproductivo	Híbrido 1 (positivo)	9,0	7,7	1,3	16

(continuación)

Todos	Híbrido (positivo)	1	9,1	7,9	1,1	14
Vegetativo	Híbrido (positivo)	2	7,7	6,5	1,2	18
Reproductivo	Híbrido (positivo)	2	8,1	6,8	1,3	19
Todos	Híbrido (positivo)	2	7,7	6,4	1,3	21
Vegetativo	Híbrido (positivo)	3	8,3	7,2	1,1	16
Reproductivo	Híbrido (positivo)	3	8,9	8,0	0,9	11
Todos	Híbrido (positivo)	3	8,8	7,9	0,9	12

5 También se realizó un análisis de varios años con MON87460 para evaluar la estabilidad de las ventajas de producción en varias localizaciones en condiciones con limitación de agua. Se recopilaron y analizaron las localizaciones que habían experimentado algún nivel de estrés por agua, en las que las reducciones de producción variaban del 20 al 80 %. A lo largo de varios años de ensayos y en una amplia serie de ambientes con grados variables de estrés por déficit de agua se pusieron de manifiesto ventajas de producción.

10 A lo largo de cuatro años de ensayos, MON87460 ha demostrado un beneficio promedio de la producción del 10,5 % en tres cruces de ensayo híbrido en ensayos ambientales de estrés controlado. La ventaja promedio de la producción anual fue de 0,89, 0,48, 0,49 y 0,79 t/ha, lo que representa aumentos porcentuales de 13,4, 6,7, 10,5 y 11,3 %, respectivamente.

15 Se realizaron evaluaciones de mercado de tierra firme de entradas híbridas de MON87460 en los estados de Dakota del Sur, Nebraska y Kansas. Las localizaciones se seleccionaron basándose en patrones climáticos históricos y producciones promedio de los condados de 4,5 a 7,7 t/ha. Cada localización de ensayo se diseñó como un diseño en bloque desequilibrado de terreno dividido y se plantó con una repetición única por localización. Las parcelas fueron de 30,5 m (100 pies) de longitud y cuatro filas de anchura y las densidades de población finales reflejaban las prácticas de plantación locales en condiciones sin irrigación de aproximadamente 200 plantas por fila de 30,5 m (100 pies). La separación entre filas varió de 76 ta 102 cm (de 30 a 40 pulgadas) de anchura, lo que refleja las prácticas de plantación locales. Se instalaron estaciones climáticas en cada localización y los ensayos se supervisaron con respecto a señales de estrés por déficit de agua a lo largo de la temporada. No se proporcionó agua complementaria. Se recogieron datos ambientales y se utilizaron los patrones climáticos de temporada, incluyendo acumulación de agua de lluvia, para clasificar el estrés por déficit de agua durante la temporada para cada localización de tierra firme. Se clasificaron 12 de las localizaciones plantadas a lo largo de estos tres estados como que habían experimentado estrés por agua durante los estadios del desarrollo de vegetativo tardío a reproductivo, y se utilizaron para el análisis.

25 Se observaron beneficios de producción en los mismos tres fondos híbridos que se evaluaron en condiciones de déficit de agua controladas descritas en la Tabla 10. En comparación con el control no transgénico, el acontecimiento MON87460 proporciona beneficios de producción de hasta 0,75 t/ha o 15 %. Estas condiciones de crecimiento en tierra firme crearon un ambiente de producción menor (la producción media de los controles fue de 4,9 t/ha) que las localizaciones de déficit de agua controladas en las que los rendimientos globales de los controles variaron de 6,4 a 8,5 t/ha.

30 Por lo tanto, se obtuvieron mejoras de rendimiento significativas con MON87460 en ambientes de sequía controlados así como en condiciones de tierra firme occidental con estrés por agua. MON87460 proporciona tolerancia al estrés por agua usando el agua de un modo más eficaz que los controles negativos suministrando tasas de crecimiento y producciones de grano mejoradas en condiciones de estrés por agua usando a la vez agua equivalente o menos agua.

Ejemplo 10 Cultivo de plantas para producir plantas MON87460 tolerantes a herbicidas

Las plantas con acontecimiento MON87460 se cruzan con una planta de maíz tolerante a herbicida que expresa un gen de la 5-enol-piruvilsiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) resistente a glifosato para generar plantas mejoradas

que tienen tanto tolerancia al déficit de agua como tolerancia al herbicida. Es de particular interés un cruce de una planta de maíz con acontecimiento MON87460 con una planta de maíz con acontecimiento tolerante a herbicida designada como acontecimiento PV-ZMGT32 (nk603) y descrita en el documento US6825400.

5 Se cruzan dos líneas endogámicas homocigotas, una de MON87460 y una de PV-ZMGT32 (nk603) para producir la semilla híbrida para plantación comercial de un cultivo de maíz que tenga déficit de agua y tolerancia a herbicida.

10 Como alternativa, se genera una única línea endogámica que comprende tanto MON87460 como PVZMGT32 (nk603) usando un procedimiento de cultivo de retrocruzamiento parental recurrente para producir una línea fija homocigota para ambos rasgos. La línea endogámica desarrollada de este modo muestra rasgos de tolerancia al déficit de agua y tolerancia a herbicida. La línea endogámica se cruza con una segunda línea endogámica, que puede ser una línea silvestre de élite o una línea de acontecimiento transgénico que demuestra uno o más rasgos mejorados, para producir semilla híbrida para siembra para producir un cultivo de maíz mejorado.

Todos los materiales y procedimientos divulgados y reivindicados en el presente documento pueden realizarse y usarse sin experimentación indebida como se ha enseñado en la divulgación anterior.

LISTA DE SECUENCIAS

15 <110> Monsanto Technology LLC

<120> ACONTECIMIENTO DE PLANTA DE MAÍZ MON87460 Y COMPOSICIONES Y PROCEDIMIENTOS PARA LA DETECCIÓN DEL MISMO

20 <130> 38-15(54813)A PCT

<150> EP 09716827,2

<151> 2009-02-26

25 <150> US 61/032.568

<151> 2008-02-29

<160> 25

30 <210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Secuencia del punto de unión en 5'

<400> 1

ggctgtcttt gaggaggatc 20

40

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Secuencia del punto de unión en 3'

<400> 2

tgtagatttc acgtgaaga 20

10

<210> 3

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Secuencia del punto de unión en 5'

<400> 3

20 tagacggctg tcttgagga ggatcgcgag 30

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia del punto de unión en 3'

30 <400> 4

atccatgtag atttcacgtt gaagaaaaat 30

<210> 5

<211> 1060

35 <212> ADN

<213> Zea mays

ES 2 590 177 T3

<400> 5

```

gaggtcctgt atggaatcgt gttcgtttat ttcccggggg ccggggcaaa aaagacggca 60
atggattggt ggacttgaca tgtgcgggtgc gtgggtccaa cccggcctgg cttttgggcc 120
agcgcggggcc gacatagtga ggcccaaaat ttaaaaagca cagctgcagg cccacggaac 180
cagtggttat gaaaaacgga aacaagata gtaaatttta cctccttaa ttgccaccgt 240
atccaatata caaattcagg taatctattc ctataaagca ccaatttccg ctcttttcat 300
ctatcgtctg tcatgcgctc tgttcctctc catcgtgtat cgcagataaa aggttacatg 360
catttccatg catgtgatgg gataaaaaca agaaaaaagg ttgacatgca tttccatgca 420
gataaaaggt tacatggatt tccttgagga aagtataata agactaaatg ctgaggcgga 480
ggagagagag agaggagatg tgggtagtaa acttttagtc atctttgaca caagatcaaa 540
gaagatttgt gaaattatgc attaaaatat cgaagagcta actactacac gaataagcta 600
aatggtaggc tgcaaagggtg attacagcta gcagttgact ctattattaa acttctctt 660
agggcaacag tagttgaaa ggtttttttg gtgctgcca gatgcaaact aaaatccatg 720
catcctctct caacctggaa ggtggccta aaaaagatga tctaccatcc acggatccac 780
ctgtcagctc aagttattgg gtttaggaaa cagggaccta cgtggagatg tgtgctggac 840
gggcgggcct cccacctgtc acgccgcagg cggaacggtg cgaaacgacg cacgcttttg 900
ctgtgcgcct gtgcgtctgg cggtcagcgc gacggtgact gcgttttctg ttgcgttaga 960
cgacgatcat cgctggaat ttggtattct ctcacgttga aggaaaatgg attggaggga 1020
gtatgtagat aaattttcaa agcgttagac ggctgtcttt 1060

```

- 5 <210> 6
- <211> 1260
- <212> ADN
- <213> Zea mays

10 <400> 6

```

acgttgaaga aaaatggatg gagggaggaa gtagataaag ttttttgttg tatattgtga 60
ttttaatttg aaatcaagct tggtaaacc gtggccgaaa tttggcctgg ccaactaatg 120
ccatgaacca agcgtagttt gccgattacc ccgtcccacg ggtacgactt tctctaactg 180
ctcggttact gtcctgcaa cctgcatctc atgactccag gccggcccaa caccagcagc 240

```

ES 2 590 177 T3

gaccgcgacc aggctcctcc tctcctcca gccacgggca agaggccgcg cgcattgctct 300
cgctcctggt cccggtaatc cggcccagta ccttgggtacc gcaccgtacc tgtaattctct 360
atctctagtt ctctagtaca tattaagtca atagtgtaga ctgtaacact accatgactt 420
catcctccct tacctcgtc tctgcccagc cacaaaccac ccttccgccc catataggag 480
ccgatatcgt gccccccgtc ctggccgac gcttccctaa ccctcgtgg actaggcttc 540
ccctccacga cgaggccacg acaatgggtg cccccgacg acgaggccgc ggtgtgggag 600
aaggaggcga cgtgacctac agtccaaggc ctcacatcca catacatgag tcatctaatt 660
gattaatcta tagcctggtc gcgctgtgct gctactgctt gatcgcagag tgctgttgag 720
accgctctgt catcttcgtc agctagacga agcatccgag tacaactcta aacatacga 780
cattttaata acgagagcat ataacgataa atagtgtctc tacattaatg tatgttatca 840
atacttattg actcagtac aaagcacgga catacatcta gtagttaata ataaaaataa 900
ataattacct tattaaacga tcatttatta tataaatgta tttatTTTT atgtacatat 960
aataagttat tacaatctga caatatatat aagtgataga acataaagta gaggaacaaa 1020
cggaacgtaa aggaaaacga agctagtcag gtagatgctc ccgaggacaa aaaaaaagg 1080
gcatagttgt caagtttaat cttcccaagt tttatcttac gtagtagtag agcgagagcg 1140
gtccaattaa gggcacgcac agttgcagca ggtgcagggc tccagtagcc gcggcgggta 1200
cgctcgcagt cgcaggcgc cgcgcctagt tctgctgccc ggccccgggc atgaaccaac 1260

<210> 7

<211> 3309

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Casete transgénico insertado

10

<400> 7

ES 2 590 177 T3

gaggaggatc gcgagccagc gacgaggccg gccctccctc cgcttcctaaa gaaacgcccc 60
ccatcgccac tatatacata cccccccctc tctcccctac cccccaacc taccaccacc 120
accaccacca cctccacctc ctccccctc gctgccggac gacgagctcc tccccctcc 180
ccctcgccg cgcgcgcgc gcgaaccacc ccgcccctct cctctttctt tctcgtttt 240
ttttttccgt ctcggtctcg atctttggcc ttggtagttt gggtagggca gaggcggctt 300
cgtgcgcgcc cagatcggtg cgcgggaggg ggggatctc gcgctgggg ctctcgccgg 360
cgtggatccg gcccgatct cgcggggaat gggctctcg gatgtagatc tgcgatccgc 420
cgttgttggg ggagatgatg ggggttttaa aatttccgcc atgctaaaca agatcaggaa 480
gaggggaaaa gggcactatg gtttatattt ttatatattt ctgctgcttc gtcaggctta 540

ES 2 590 177 T3

gatgtgctag atctttcttt cttctttttg tgggtagaat ttgaatccct cagcattggt 600
catcggtagt ttttcttttc atgatttggt acaaatgcag cctcgtgcgg agcttttttg 660
taggtagacc atggtagaag gtaaagtaaa atggttcaac tctgaaaaag gtttcggatt 720
catcgaagta gaaggtcaag acgatgtatt cgttcatttc tctgctatcc aaggcgaag 780
cttcaaaact ttagaagaag gccaaagctgt ttcttttgaa atcgttgaag gaaaccgcgg 840
accacaagct gctaacgtta ctaaagaagc gtgaatttaa atgggcccg gggatccact 900
agttctagct atatcatcaa tttatgtatt acacataata tcgcaactcag tctttcatct 960
acggcaatgt accagctgat ataatcagtt attgaaatat ttctgaattt aaacttgcat 1020
caataaattt atgtttttgc ttggactata atacctgact tgttatttta tcaataaata 1080
tttaactat atttctttca agatatacatt ctttacaagt atacgtgttt aaattgaata 1140
ccataaattt ttatttttca aatacatgta aaattatgaa atgggagtgg tggcgaccga 1200
gctcaagcac acttcaattc ctataacgga ccaaatcgca aaaattataa taacatatta 1260
tttcatcctg gattaaaga aagtcacogg ggattatfff gtgacgccga ttacatacgg 1320
cgacaataaa gacattggaa atcgtagtac atattggaat acaactgatta tattaatgat 1380
gaatacatac tttaatatcc ttacgtagga tcgatccgaa ttcgcgacac gcggccgctc 1440
tagaactagt ggatccccc cttaattaag ggggctgcag gaattcataa ctctgtataa 1500
tgtatgctat acgaagttat agcttggtcg agtggagct agctttccga tcctacctgt 1560
cacttcatca aaaggacagt agaaaaggaa ggtggcacct acaaatgcca tcattgcgat 1620
aaaggaaag ctatcattca agatgcctct gccgacagt gtcccaaaga tggaccccca 1680
cccacgagga gcatcgtgga aaaagaagac gttccaacca cgtcttcaa gcaagtggat 1740
tgtatgata cttccactga cgtaagggat gacgcacaat cccactatcc ttcgcaagac 1800
ccttctctta tataaggaag ttcatttcat ttggagagga cacgctgaaa tcaccagtct 1860
ctctctacaa gatcggggat ctctagctag acgatcgttt cgcgatgattg aacaagatgg 1920
attgcacgca ggttctccgg ccgcttgggt ggagaggcta ttcggctatg actgggcaca 1980
acagacaatc ggctgctctg atgccgcctg gttccggctg tcagcgcagg ggcgcccggt 2040
tctttttgtc aagaccgacc tgtccggtgc cctgaatgaa ctgcaggacg aggcagcgcg 2100
gctatcgtgg ctggccacga cgggcgttcc ttgcgcagct gtgctcgacg ttgtcactga 2160
agcgggaag gactggctgc tattgggcga agtgccgggg caggatctcc tgtcatctca 2220
ccttgctcct gccgagaaag tatccatcat ggctgatgca atgcccgggc tcatacgtct 2280
tgatccggct acctgcccat tcgaccacca agcgaaacat cgcacgcagc gagcacgtac 2340
tcggatggaa gccggtcttg tcgatcagga tgatctggac gaagagcacc aggggctcgc 2400
gccagccgaa ctgttcgcca ggctcaaggc gcgcatgcc gacggcgagg atctcgtcgt 2460

ES 2 590 177 T3

gacgcatggc gatgcctgct tgccgaatat catggtggaa aatggccgct tttctggatt 2520
catcgactgt ggccggctgg gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt tggctaccgc 2580
tgatattgct gaagagcttg gcggcgaatg ggctgaccgc ttcctcgtgc tttacggtat 2640
cgccgctccc gattcgcagc gcatcgcctt ctatcgcctt cttgacgagt tcttctgagc 2700
gggactctgg ggttcgatcc ccaattcccg atcgttcaaa catttgcaa taaagtttct 2760
taagattgaa tcctgttgcc ggtcctgcga tgattatcat ataatttctg ttgaattacg 2820
ttaagcatgt aataattaac atgtaatgca tgacgttatt tatgagatgg gtttttatga 2880
ttagagtccc gcaattatac atttaatacg cgatagaaaa caaaatatag cgcgcaaaact 2940
aggataaatt atcgcgcgcg gtgtcatcta tgttactaga tcggggatcg ggccactcga 3000
ccaagctata acttcgtata atgtatgcta tacgaagtta tcgcgcaaaa tcgtgaagtt 3060
tctcatctaa gccccattt ggacgtgaat gtagacacgt cgaaataaag atttccgaat 3120
tagaataatt tgtttattgc tttcgcctat aaatacgacg gatcgttaatt tgcggtttta 3180
tcaaaatgta ctttcatttt ataataacgc tgcgggacatc tacatTTTTg aattgaaaaa 3240
aaattggtaa ttactctttc tttttctcca tattgacatc catactcatt gctgatccat 3300
gtagatttc 3309

<210> 8

<211> 22

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

10

<400> 8

ttgaccatca tactcattgc tg 22

<210> 9

15 <211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Cebador

<400> 9

cttctccct ccatccattt t 21

<210> 10

<211> 21

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sonda

10

<400> 10

tctcaacgt gaaatctaca t 21

<210> 11

15 <211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Cebador

<400> 11

ccagcctcat ggccaag 18

25 <210> 12

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Cebador

<400> 12

ccttctggc ggcttatctg 20

35

<210> 13

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Sonda

<400> 13

cttaggggca gactcccggtg ttccct 26

10 <210> 14

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Cebador

<400> 14

ggttgacca agcttgattt caa 23

20

<210> 15

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Cebador

<400> 15

30 ctccatattg accatcatatc tcattgc 27

<210> 16

<211> 24

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sonda

<400> 16

tgatccatgt agatttcacg ttga 24

5

<210> 17

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Cebador

<400> 17

15 tcaaagcgtt agacggctgt ctt 23

<210> 18

<211> 18

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

25 <400> 18

ttcgccacg gttgacc 18

<210> 19

<211> 20

30 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sonda

35

<400> 19

tgctggaat ttgtattct 20

ES 2 590 177 T3

<210> 20

<211> 68

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Amplicón

10 <400> 20

ttgaccatca tactcattgc tgatccatgt agatttcacg ttgaagaaaa atggatggag 60

ggaggaag 68

<210> 21

15 <211> 134

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Amplicón

<400> 21

ctccatattg accatcatac tcattgctga tccatgtaga tttcacgttg aagaaaaatg 60

gatggagggga ggaagtagat aaagtttttt gttgtatatt gtgattttaa tttgaaatca 120

agcttggtca aacc 134

25

<210> 22

<211> 145

<212> ADN

<213> Zea mays

30

<220>

<223> Amplicón

ES 2 590 177 T3

<400> 22

```
tcaaagcgtt agacggctgt ctttgctgga aatttggtat tctctcacgt tgaagaaaa 60
tggatggagg gaggaagtag ataaagtttt ttgttgata ttgtgatttt aattgaaat 120
caagcttggt caaacctgg ccgaa 145
```

5 <210> 23

<211> 22

<212> ADN

<213> Zea mays

10 <400> 23

gctggaatt tggattctc tc 22

<210> 24

<211> 5629

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia del transgén y el genoma del maíz en el punto de unión

20

<400> 24

ES 2 590 177 T3

gaggtcctgt atggaatcgt gttcgtttat ttcccggggg ccggggcaaa aaagacggca 60
atggattggt ggacttgaca tgtgcgggtgc gtgggtccaa cccggcctgg cttttggggc 120
agcgcggggc gacatagtga ggcccaaat ttaaaaagca cagctgcagg cccacggaac 180
cagtggttat gaaaaacgga aacaagata gtaaatTTTA ctccttaaa ttgccaccgt 240
atccaatatc caaattcagg taatctattc ctataaagca ccaatttccg ctcttttcat 300
ctatcgtctg tcatgcgctc tgttcctctc catcgtgtat cgcagataaa aggttacatg 360
catttccatg catgtgatgg gataaaaaca agaaaaaagg ttgacatgca tttccatgca 420
gataaaaggt tacatggatt tccttgagga aagtataata agactaaatg ctgaggcggga 480
ggagagagag agaggagatg tgggtagtaa acttttagtc atctttgaca caagatcaaa 540
gaagatttgt gaaattatgc attaaaatat cgaagagcta actactacac gaataagcta 600
aatggtaggc tgcaaaggtg attacagcta gcagttgact ctattattaa acttctctt 660
agggcaacag tagttgaaa ggttttttg gtgctgcca gatgcaaac aaaatccatg 720
catcctctct caacctgaa ggtgggccta aaaaagatga tctaccatcc acggatccac 780
ctgtcagctc aagttattgg gtttaggaaa cagggaccta cgtggagatg tgtgctggac 840
ggggggcct cccacctgtc acgcccagc cggaacggtg cgaaacgacg cacgcttttg 900
ctgtgcgctc gtgcgtctgg cgtcagcgc gagcgtgact gcgttttctg ttgocgtaga 960
cgacgatcat cgctggaat ttggtattct ctcacgttga aggaaaatgg attggaggga 1020
gtatgtagat aaattttcaa agcgttagac ggctgtcttt gaggaggatc gcgagccagc 1080
gacgaggccg gccctccctc cgcttccaaa gaaacgccc ccatcgccac tatatacata 1140
ccccccctc tcctcccatc cccccaacc taccaccacc accaccacca cctccacctc 1200
ctccccctc gctgccggac gacgagctcc tccccctcc ccctccgccc ccgcccggcc 1260
ggtaaccacc ccgcccctct cctctttctt tctccgtttt tttttcctg ctccgtctcg 1320
atctttggcc ttggtagttt ggtggggcga gaggcggctt cgtgcgccc cagatcggtg 1380
cgcgggaggg gcgggatctc gcggctgggg ctctcgccc cgtggatccg gcccgatct 1440
cgcggggaat ggggctctcg gatgtagatc tgcgatccgc cgttgttggg ggagatgatg 1500
gggggttaa aatttccgcc atgctaaaca agatcaggaa gaggggaaaa gggcactatg 1560
gtttatattt ttatatattt ctgctgcttc gtcaggctta gatgtgctag atctttcttt 1620
cttctttttg tgggtagaat ttgaatccct cagcattgtt catcggtagt ttttctttc 1680
atgatttgtg acaaatgcag cctcgtgcgg agcttttttg taggtagacc atggtagaag 1740

ES 2 590 177 T3

gtaaagtaaa atggttcaac tctgaaaaag gtttcggatt catcgaagta gaaggccaag 1800
 acgatgtatt cgttcatttc tctgctattc aaggcgaagg cttcaaaact ttagaagaag 1860
 gccaaactgt ttcttttgaa atcgttgaag gaaaccgcgg accacaagct gctaacgtta 1920
 ctaaagaagc gtgaatttaa atgggcccgg gggatccact agttctagct atatcatcaa 1980
 tttatgtatt acacataata tcgactcag tctttcatct acggcaatgt accagctgat 2040
 ataatcagtt attgaaatat ttctgaattt aaacttgcac caataaattt atgtttttgc 2100
 ttggactata atacctgact tgttatttta tcaataaata tttaaactat atttctttca 2160
 agatatcatt ctttacaagt atacgtgttt aaattgaata ccataaattt ttatttttca 2220
 aatacatgta aaattatgaa atgggagtggt tggcgaccga gctcaagcac acttcaattc 2280
 ctataacgga ccaaatcgca aaaattataa taacatatta tttcatcctg gattaaaaga 2340
 aagtcaccgg ggattatfff gtgacgcga ttacatacgg cgacaataaa gacattggaa 2400
 atcgtagtac atattggaat aactgatta tattaatgat gaatacatac ttaatatcc 2460
 ttacgtagga tcgatccgaa ttcgcgacac gcggccgctc tagaactagt ggatccccc 2520
 cttaatgaag ggggctgcag gaattcataa ctctgtataa tgtatgctat acgaagttat 2580
 agcttggtcg agtggaaact agctttccga tctacctgt cacttcatca aaaggacagt 2640
 agaaaaggaa ggtggcacct acaaatgcca tcattgcgat aaaggaaagg ctatcattca 2700
 agatgcctct gccgacagt gtcccaaaga tggaccccca cccacgagga gcatcgtgga 2760
 aaaagaagac gttccaacca cgtcttcaaa gcaagtggat tgatgtgata cttccactga 2820
 cgtaaaggat gacgcacaat cccactatcc ttcgcaagac ccttctctata tataaggaag 2880
 ttcatttcat ttggagagga cacgctgaaa tcaccagtct ctctctacaa gatcggggat 2940
 ctctagctag acgatcgttt cgcacgattg aacaagatgg attgcacgca ggttctccgg 3000
 ccgctgggt ggagaggcta ttcggctatg actgggcaca acagacaatc ggtgctctg 3060
 atgccgccgt gttccggctg tcagcgcagg ggcgccgggt tctttttgtc aagaccgacc 3120
 tgtccggtgc cctgaatgaa ctgcaggacg aggcagcgcg gctatcgtgg ctggccacga 3180
 cgggcgttcc ttgcgcagct gtgctcagc ttgtcactga agcgggaagg gactggctgc 3240
 tattgggcga agtgcggggg caggatctcc tgtcatctca ccttgctcct gccgagaaag 3300
 tatccatcat ggctgatgca atgcggcggc tgcatacgtc tgatccggtc acctgcccat 3360
 tcgaccacca agcgaacat cgcacgagc gagcacgtac tcggatggaa gccggctctg 3420
 tcgatcagga tgatctggac gaagagcacc aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgcca 3480
 ggctcaaggc gcgcatgcc gagcgcgagg atctcgtcgt gacgcacggc gatgcctgct 3540
 tgccgaatat catggtggaa aatggccgct tttctggatt catcgaactg gccggctgg 3600
 gtgtggcggga ccgctatcag gacatagcgt tggctaccgg tgatattgct gaagagcttg 3660

ES 2 590 177 T3

gcggcgaatg ggctgaccgc ttectcgtgc tttacggtat cgccgctccc gattcgcagc 3720
 gcacgcctt ctatgcctt cttgacgagt tcttctgagc gggactctgg ggttcgatcc 3780
 ccaattcccg atcgttcaaa catttggcaa taaagtttct taagattgaa tcctgttgcc 3840
 ggtcctgcca tgattatcat ataatttctg ttgaattacg ttaagcatgt aataattaac 3900
 atgtaatgca tgacgttatt tatgagatgg gtttttatga ttagagtccc gcaattatac 3960
 atttaatacg cgatagaaaa caaaatatag cgcgcaaaact aggataaatt atcgcgcgcg 4020
 gtgtcatcta tgttactaga tcggggatcg ggccactcga ccaagctata acttcgtata 4080
 atgtatgcta tacgaagtta tcgcgcaaaa tcgtgaagtt tctcatctaa gccccattt 4140
 ggacgtgaat gtagacacgt cgaaataaag atttccgaat tagaataatt tgtttattgc 4200
 tttcgcctat aaatacgacg gatcgttaatt tgcgttttta tcaaaatgta ctttcatttt 4260
 ataataacgc tgccgacatc tacatTTTTG aattgaaaa aaattggtaa ttactctttc 4320
 tttttctcca tattgacatc catactcatt gctgatccat gtagatttca cgttgaagaa 4380
 aaatggatgg agggaggaag tagataaagt tttttgtgt atattgtgat ttttaattga 4440
 aatcaagctt ggtcaaaccg tggccgaat ttggcctggc cactaatggc catgaaccaa 4500
 gcgtagtttgc cggattaccg cgtcccgacg gtacgacttt ctctaatecg tcggttactg 4560
 tccctgcaac ctgcatctca tgactccagg ccggcccaac accagcagcg accgcgacca 4620
 ggctcctcct cctcctccag ccacgggcaa gaggccgcg gcgatgctctc gctcctgttc 4680
 ccgtaaatcc ggcccagtac cttggtaccg caccgtacct gtaatctcta tctctagttc 4740
 tctagtacat attaagtcaa tagttagac tgtaacacta ccatgacttc atcctccctt 4800
 acctcgtct ctgcgcacgc acaaaccacc cttccgcccc atataggagc cgatatcgtg 4860
 cccccgtcc tggccgacg cttccctaac ccctcgtgga ctaggcttcc cctccacgac 4920
 gagccacga caatggttgc ccccgacga cgaggccgcg gtgtgggcca aggaggcgac 4980
 gtgacctaca gtccaaggcc tcacatccac atacatgctg catctaattg attaacttat 5040
 agcctggctg cgctgtgctg ctactgcttg atcgacgagt gctgttgcca cccgtctgtc 5100
 atcttctgca gctagacgaa gcacccgagt acaactctaa acatacgaac attttaataa 5160
 cgagagcata taacgataaa tagtgcttct acattaatgt atgttatcaa tacttattga 5220
 ctcaagtaca aagcacggac atacatctag tagttaataa taaaaataaa taattacctt 5280
 attaaacgat catttattat ataaatgtat ttatTTTTTA tgtacatata ataagttatt 5340
 acaatctgac aatatatata agtgatagaa cataaagtag aggaacaaac ggaacgtaa 5400
 ggaaaaacga gctagtccag tagatgctcc cgaggacaaa aaaaaagggg catagttgtc 5460
 aagtttaatc ttccaagtt ttatcttacg tagtagtaga gcgagagcgg tccaattaag 5520
 ggcacgcaca gttgcagcag gtgcagggtc ccagtagccg cggcgggtac gctcgcagtc 5580
 gcagggcgcc gcgcctagtt ctgctgcccc gcccggtca tgaaccaac 5629

<210> 25

5 <211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Punto de unión en 5'

5

<400> 25

cggctgtctt tgaggaggat cg 22

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una planta de maíz transgénica que contiene un cromosoma que comprende un inserto de polinucleótido heterólogo que expresa un gen cspB regulado por un promotor de la actina de arroz truncado, en el que dicho cromosoma comprende una subsecuencia de la SEQ ID NO: 24 en la que se escinde el gen del marcador seleccionable de la neomicina fosfotransferasa de tipo II localizado entre los sitios lox y en el que dicho inserto de polinucleótido heterólogo confiere a dicha planta de maíz una mejor tolerancia al déficit de agua.
- 10 2. Semilla de una planta de maíz transgénica de la reivindicación 1, en la que dicha semilla contiene un cromosoma que comprende el inserto de polinucleótido heterólogo que expresa un gen cspB regulado por un promotor de la actina de arroz truncado, en el que dicho cromosoma comprende una subsecuencia de la SEQ ID NO: 24 en la que se escinde el gen del marcador seleccionable de la neomicina fosfotransferasa de tipo II localizado entre los sitios lox y en el que dicho inserto de polinucleótido heterólogo confiere a una planta de maíz cultivada a partir de dicha semilla una mejor tolerancia al déficit de agua.
- 15 3. La semilla de la reivindicación 2, en la que la semilla es una semilla de maíz híbrida que es heterocigota para el inserto de polinucleótido heterólogo que expresa el gen cspB.
- 20 4. Un procedimiento de determinación de la cigosidad de un inserto de polinucleótido heterólogo que confiere tolerancia al déficit de agua mejorada a una planta de maíz transgénica, en el que dicho procedimiento comprende poner en contacto una muestra de ADN de una planta de maíz transgénica o semillas que contienen un cromosoma que tiene el inserto de polinucleótido heterólogo de la SEQ ID NO: 24 o de una subsecuencia de la SEQ ID NO: 24 en la que el gen marcador seleccionable de neomicina fosfotransferasa de tipo II localizado entre los sitios lox se escinde con un conjunto de cebadores que comprende un primer conjunto de cebadores para la producción de un amplicón de ADN de maíz transgénico que tiene la SEQ ID NO: 1 o 2 que es diagnóstico para el cromosoma que tiene el inserto de polinucleótido heterólogo, un segundo conjunto de cebadores para la producción de un amplicón de ADN de maíz no transgénico en el sitio de inserción, someter la muestra en contacto a amplificación de polinucleótidos y usar sondas para la detección del amplicón de ADN de maíz transgénico y el amplicón de ADN de maíz no transgénico, en el que la presencia de solo el amplicón de ADN de maíz transgénico del primer conjunto de cebadores indica que el ADN es homocigoto para el inserto de polinucleótido heterólogo y la presencia de amplicones producidos a partir tanto del primer conjunto de cebadores como del segundo indica que el ADN es heterocigoto para el inserto de polinucleótido heterólogo, determinando de esta manera la cigosidad del inserto de polinucleótido heterólogo.
- 25 5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que dicho primer conjunto de cebadores comprende la SEQ ID NO: 14 y la SEC ID N° 15 y dicho segundo conjunto de cebadores comprende la SEQ ID NO: 17 y la SEQ ID NO: 18.
- 30 6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la sonda para la detección del amplicón de ADN de maíz transgénico comprende la SEQ ID NO: 16, y la sonda para la detección del amplicón del ADN de maíz no transgénico comprende la SEQ ID NO: 19.
- 35 7. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que dicho primer conjunto de cebadores contiene un cebador de al menos 16 nucleótidos de longitud que se encuentra en la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6 y un cebador de al menos 16 nucleótidos de longitud que se encuentra en la SEQ ID NO: 7.
- 40 8. Un producto alimenticio procesado para alimentación humana o animal obtenible a partir de una semilla de maíz que tiene un cromosoma que comprende un polinucleótido de la unión transgénica/genómica de SEQ ID NO: 1 y un inserto transgénico heterólogo que comprende un promotor de actina de arroz truncado que está unido operativamente a un gen cspB, en el que el extremo 5' de dicho inserto solapa con un extremo 3' de la SEQ ID NO: 1, en el que dicho producto alimenticio procesado para alimentación humana o animal comprende una cantidad detectable de un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2 o una complementaria de las mismas.
- 45 9. El producto alimenticio procesado para alimentación humana o animal de la reivindicación 8, en el que dicho producto alimenticio procesado para alimentación humana o animal comprende sémola de maíz, harina de maíz o gluten de maíz.
- 50 10. El producto alimenticio procesado para alimentación humana o animal de la reivindicación 8 o 9, en el que dicho polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 4 o una complementaria de las mismas.
- 55 11. El producto alimenticio procesado para alimentación humana o animal de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que dicho polinucleótido comprende adicionalmente una secuencia de nucleótidos contenida en las SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, o SEQ ID NO: 24.
12. Una composición que comprende una secuencia polinucleotídica que es diagnóstica de la presencia de ADN de MON87460, en la que el polinucleótido tiene la secuencia expuesta en las SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 25.

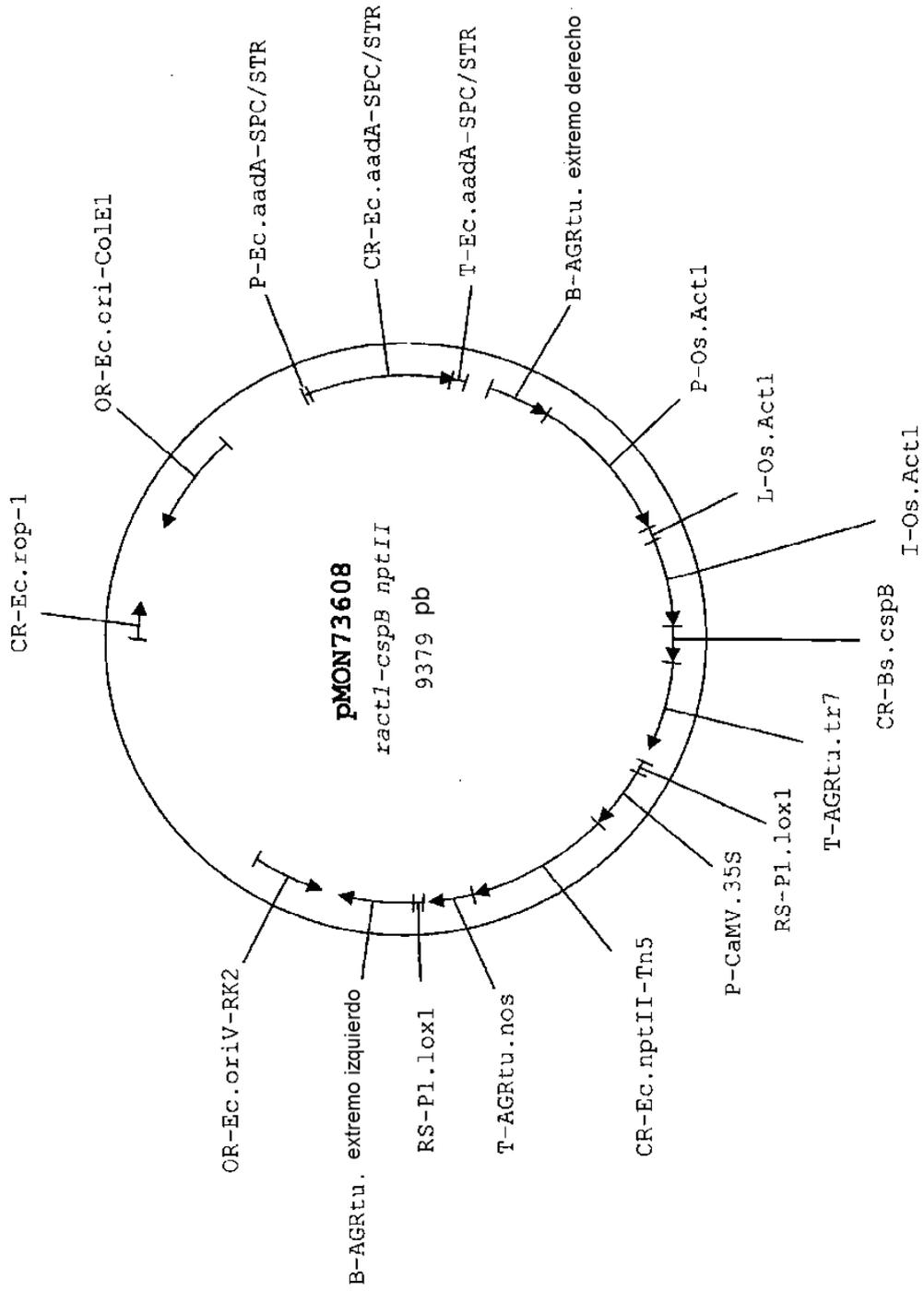


Figura 1

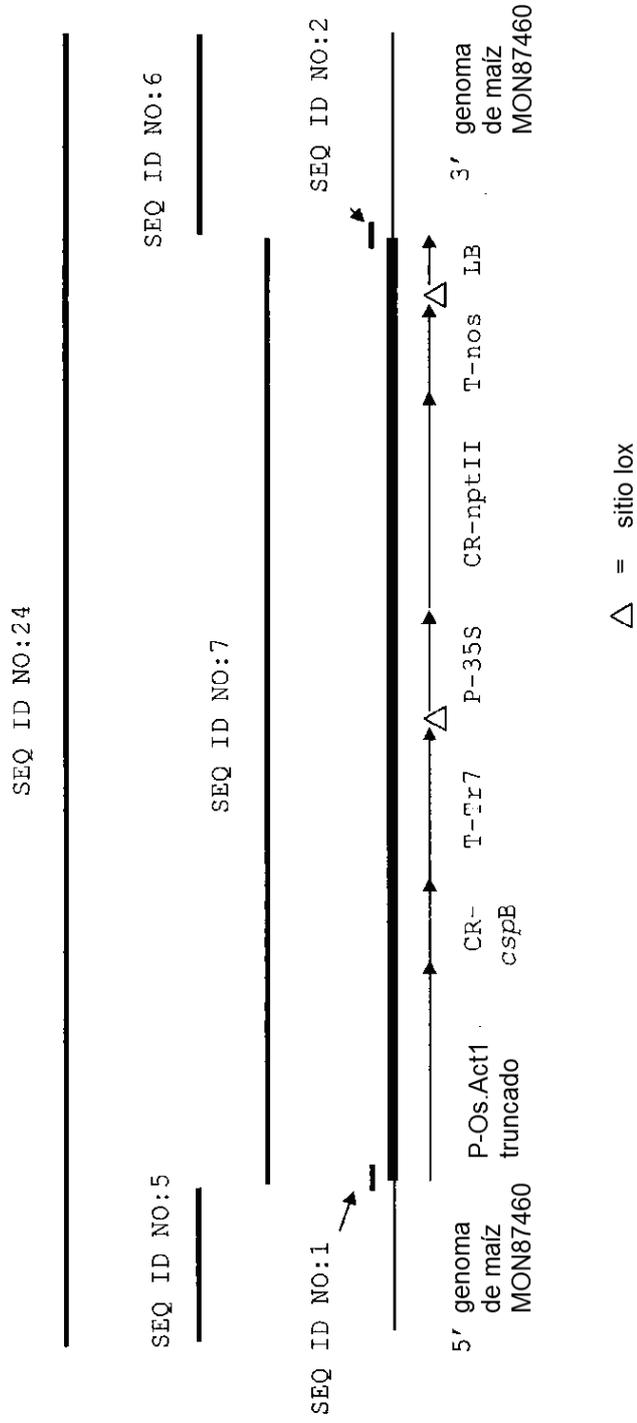


Figura 2

FIGURA 3
 REGIÓN DE UNIÓN DEL ADN TRANSGÉNICO Y GENÓMICO DE MON87460

gaggtcctgtatggaatcgtgttcgtttattttcccgggggcccggggcaaaaaagacggcaatgg
 attgttggacttgacatgtgcggtgcgtgggtccaacccggcctggcttttgggcccagcgcggg
 ccgacatagtgaggcccaaaatttataaaagcacagctgcaggccccacggaaccagtggttatga
 aaaacggaaacaaagatagtaaattttacctccttaaattgccaccgatccaatatccaaatt
 caggtaatctattcctataaagcaccaatttccgctcttttcatctatcgtctgtcatgcgctc
 tgttcctctccatcgtgtatcgcagataaaaggttacatgcatttccatgcatgtgatgggata
 aaaacaagaaaaaggttgacatgcatttccatgcagataaaaggttacatggatttcccttggg
 gaaagtataataagactaaatgctgaggcggaggagagagagaggagatgtgggtagtaaac
 ttttagtcatctttgacacaagatcaagaagattttgtgaaattatgcattaaaaatcgaaga
 gctaactactacagaataagctaaatggttaggctgcaaaggtgattacagctagcagttgact
 ctattattaaacttccctcttagggcaacagtagttggaaaggttttttgggtgctgccagatg
 caaactaaaatccatgcatcctctctcaacctggaaggtgggcctaaaaaagatgatctacat
 ccacggatccacctgtcagctcaagttattgggttaggaaacagggacctacgtggagatgtg
 tgcggagcgggcccctcccacctgtcagcggcaggcggaaacgggtgcgaaacgacgcacgct
 tttgctgtgcgctgtgcgtctggcggtcagcgcgagcgtgactgcgttttctgcttgcgttaga
 cgacgatcatcgtggaatttggatctctcagcttgaaggaaaatggattggaggagatg
 gtagataaaattttcaaagcgttagacggctgtcttt**GAGGAGGATCGCGAGCCAGCGACGAGGC**
CGGCCCTCCCTCCGCTTCCAAAAGAAACGCCCCCATCGCCACTATATACATAACCCCCCTCTC
CTCCCATCCCCCAACCTACCACCACCACCACCACCACCTCCACCTCCTCCCCCTCGCTGCC
GGACGACGAGCTCCTCCCCCTCCCCCTCCGCCGCCGCCGCCGGTAACCACCCGCCCTCT
CCTCTTTCTTTCTCCGTTTTTTTTTTCCGCTCCTCGGTCCTGATCTTTGGCCTTGGTAGTTGGGT
GGCGGAGAGGCGGCTTCGTGCGCGCCAGATCGGTGCGCGGGAGGGGCGGGATCTCGCGGCTGG
GGCTCTCGCCGGCGTGGATCCGGCCCGGATCTCGCGGGGAATGGGGCTCTCGGATGTAGATCTG
CGATCCGCCGTTGTTGGGGGAGATGATGGGGGTTTAAAATTTCCGCCATGCTAAAACAAGATCA
GGAAGAGGGGAAAAGGGCACTATGGTTTATATTTTTATATATTTCTGCTGCTTCGTCAGGCTTA
GATGTGCTAGATCTTTCTTTCTTTCTTTTGTGGGTAGAATTTGAATCCCTCAGCATTTGTCATC
GGTAGTTTTTCTTTTCATGATTTGTGACAAATGCAGCCTCGTGCGGAGCTTTTTGTAGGTAGA
CCATGGTAGAAGGTAAAAGTAAAATGGTTCAACTCTGAAAAGGTTTCGGATTCATCGAAGTAGA
AGGTCAAGACGATGTATTCGTTCAATTTCTCTGCTATTCAAGGCGAAGGCTTCAAAAATTTAGAA
GAAGGCCAAGCTGTTTCTTTTGAATCGTTGAAGGAAACCGCGGACCACAAGCTGCTAACGTTA
CTAAGAAGCGTGAATTTAAATGGGCCCGGGGATCCACTAGTTCTAGCTATATCATCAATTTA
TGTATTACACATAATATCGCACTCAGTCTTTCATCTACGGCAATGTACCAGCTGATATAATCAG
TTATTGAAATATTTCTGAATTTAAACTTGCATCAATAAATTTATGTTTTTGGCTTGGACTATAAT
ACCTGACTTGTATTTTATCAATAAATATTTAAACTATATTTCTTTCAAGATATCATCTTTAC
AAGTATACGTGTTTTAAATTGAATACCATAAATTTTTATTTTTCAAATACATGAAAAATTATGAA
ATGGGAGTGGTGGCGACCGAGCTCAAGCACACTTCAATTCCTATAACGGACCAATCGCAAAAA
TTATAATAACATATTTTTCATCCTGGATTAAAAGAAAGTCACCGGGGATTATTTGTGACGCC
GATTACATACGGCGACAATAAAGACATTGGAATCGTAGTACATATTGGAATACACTGATTATA
TTAATGATGAATACATACTTTAATATCCTTACGTAGGATCGATCCGAATTCGCGACACGCGGCC
GCTCTAGAAGTAGTGGATCCCCCTTAATTAAGGGGGCTGCAGGAATTCATAACTTCGTATAA

TGTATGCTATACGAAGTTATAGCTTGGTCGAGTGGAAAGCTAGCTTTCCGATCCTACCTGTCACT
TCATCAAAAAGGACAGTAGAAAAGGAAGGTGGCACCTACAAATGCCATCATTGCCATAAAGGAAA
GGCTATCATTCAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCACCCACGAGGAGC
ATCGTGGAAAAAGAGACGTTCCAACCACGTCTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATACCTCCA
CTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCTCTATATAAGGAAG
TTCATTTTATTGGAGAGGACACGCTGAAATCACCAGTCTCTCTCTACAAGATCGGGGATCTCT
AGCTAGACGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGG
GTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGT
TCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGTCTTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCTGAA
TGAATCGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCCTTGGCGAGCT
GTGCTGCAGCTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGGCAAGTCCCGGGGCGG
ATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCCGCG
GCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCATTTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGA
GCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGC
TCGGCCAGCCGAACGTTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCGACGGCGAGGATCTCGTCGT
GACGCATGGCGATGCCTGCTTGC CGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTATC
GACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTG
CTGAAGAGCTTGGCGCGAATGGGCTGACCGCTTCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGA
TTCGACGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCTGGGGTTCG
ATCCCAATTCGGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCC
GGTCTTGGCATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGT
AATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATA
CGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACCTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATG
TTACTAGATCGGGGATCGGGCCACTCGACCAAGCTATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAA
GTTATCGCGCCAAATCGTGAAGTTTCTCATCTAAGCCCCATTTGGACGTGAATGTAGACACGT
CGAAATAAAGATTTCCGAATTAGAATAATTTGTTTTATTGCTTTCCGCTATAAATACGACGGATC
GTAATTTGTCGTTTTATCAAAAATGTACTTTTATTTTATAATAACGCTGCGGACATCTACATTTT
TGAATTGAAAAAAATTTGGTAATTACTTTTTTTTTCTCCATATTGACCATCATACTCATTGC
TGATCCATGTAGATTTT acggtgaagaaaaatggatggaggagggaagtagataaagtttttg
ttgtatattgtgatttttaatttgaaatcaagcttgggtcaaaccgtggccgaaatttggcctggc
caactaatggccatgaaccaagcgtagtttgccgattaccccgctcccgacggtacgactttctct
aatcgctcggttactgtccctgcaacctgcatctcatgactccaggccggcccaacaccagcag
cgaccgcgaccaggctcctcctcctcctccagccacgggcaagaggccgcgcgcatgctctcgc
tctgttcccggtaaatccggcccagtagcttggtagccgacccgtacctgtaactctctatctcta
gttctctagtacatattaagtcfaatagtgtagactgtaacactaccatgacttcatcctcctct
acctcgctctctcgcgcaagcaaaaccaccttccgccccatataaggagccgatatcggtgcccc
ccgtcctggccgcaagcttccctaaccctcgtggactaggcttccccctccacgacgaggccac
gacaatggttgcccccgcaagcagggccgctgtgggcaaggaggcgacgtgacctacagt
ccaaggcctcacatccacatacatgctgctcatctaatgattaatctatagcctggtcgcgctgt
gctgctactgcttgatcgacgagtgctgttgcgaccgctctgtcatcttctgtagctagacgaa
gcatccgagtacaactctaaacatacgaacattttaataacgagagcatataacgataaatagt
gcttctacattaatgtatggtatcaatacttattgactcagtgacaaagcacggacatacatct
agtagttaataataaaaaataaataattaccttattaacgatcatttattatataaataatgattt
attttttatgtacatataaataagttattacaatctgacaatatataaagtgatagaacataaa
gtagaggaaacaaacgggaacgtaaaaggaaaaacgaagctagtcaggtagatgctcccaggacaaa

aaaaaaggggcatagttgtcaagtttaatcttcccaagttttatcttacgtagtagtagagcga
gagcggccaattaagggcacgcacagttgcagcaggtgcagggctccagtagccgcggcgggt
acgctcgcagtcgcagggcgcgcgctagttctgctgcccgcccggtcatgaaccaac