

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 211**

51 Int. Cl.:

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: **02.02.2004 E 10185227 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.12.2016 EP 2298921**

54 Título: **Evento de algodón MON 88913 y composiciones y procedimientos de detección del mismo**

30 Prioridad:

12.02.2003 US 447184 P

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

21.06.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**CERNY, R. ERIC;
DUONG, CAN;
HART, JESSE L.;
HUBER, SCOTT A.;
KRIEB, RACHEL L.;
LISTELLO, JENNIFER J.;
MARTENS, AMY B. y
SAMMONS, BERNARD**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 618 211 T3

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

DESCRIPCIÓN

Evento de algodón MON 88913 y composiciones y procedimientos de detección del mismo

Antecedentes de la invención

5 El algodón es un cultivo de fibra importante en numerosas áreas del mundo. Los procedimientos de la biotecnología se han aplicado al algodón para la mejora de los rasgos agronómicos y la calidad del producto. El procedimiento de introducción de transgenes en las plantas de algodón se ha demostrado en la patente de Estados Unidos n.º 5.004.863. Dicho rasgo agronómico importante en la producción de algodón es la tolerancia a herbicidas, en particular, la tolerancia al herbicida glifosato. Este rasgo se ha introducido en las plantas de algodón y es un producto exitoso utilizado hoy en día en la producción de algodón. El evento de algodón (1445) comercial actual de Roundup Ready® proporciona una excelente tolerancia al glifosato, el principio activo de Roundup®, a través de la etapa de cuatro hojas (Nida y col., *J. Agric. Food Chem.* 44:1960-1966, 1996; Nida y col., *J. Agric. Food Chem.* 44:1967-1974, 1996). No obstante, la aplicación foliar más allá de la etapa de cuatro hojas ha de ser limitada debido a la tolerancia insuficiente en tejidos reproductivos masculinos en determinadas condiciones ambientales. Esta falta de tolerancia reproductiva masculina parece ser el resultado de una expresión insuficiente de EPSPS de CP4 en tejidos críticos, mayor sensibilidad de estos tejidos al glifosato, y acumulación de grandes cantidades de glifosato en estos tejidos de fuerte sumidero (Pline y col., *Weed Sci.* 50:438-447, 2002). Se requiere una planta de algodón más altamente tolerante al glifosato que el algodón 1445 de Roundup Ready®.

20 Sería oportuno ser capaz de detectar la presencia de un evento particular con el fin de determinar si la progenie de un cruzamiento sexual contiene un transgén de interés. Además, un procedimiento para detectar un evento particular sería de gran ayuda para el cumplimiento de las regulaciones que requieren la aprobación previa a la comercialización o el etiquetado de los alimentos derivados de plantas de cultivo recombinantes, por ejemplo. Es posible detectar la presencia de un transgén por medio de cualquier procedimiento de detección de ácidos nucleicos bien conocido, tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o hibridación de ADN utilizando sondas de ácidos nucleicos. Estos procedimientos de detección se centran generalmente en elementos genéticos de uso frecuente, tales como promotores, terminadores de la transcripción 3', genes marcadores, etc. Como resultado, dichos procedimientos pueden no ser útiles para discriminar entre los diferentes eventos, particularmente, aquellos producidos utilizando la misma construcción de ADN a menos que se conozca la secuencia de ADN genómico cromosómico adyacente al ADN insertado ("ADN genómico flanqueante"). Se han descrito procedimientos de detección de ADN específicos del evento para un evento de algodón 1445 tolerante al glifosato (documento US 20020120964).

Sumario de la invención

La presente invención se relaciona con moléculas de ADN que comprenden:

(a) una construcción que comprende un primer casete de expresión que comprende el promotor del virus de mosaico Figwort construido como un elemento promotor quimérico con el promotor (At.Ef1α) de factor de elongación 1-alfa de *Arabidopsis* (FMV35S/Ef1α), operativamente unido a la secuencia líder de traducción y al intrón del factor de elongación 1-alfa de *Arabidopsis*, operativamente unido al péptido de tránsito al cloroplasto de EPSPS de *Arabidopsis*, operativamente unido a 5-enol-piruvil-shikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) tolerante al glifosato procedente de la cepa CP4 de *Agrobacterium sp.*, operativamente unido a la región de terminación 3' de ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa E9 de guisante, y un segundo casete de expresión que comprende el promotor CaMV35S-Act8 que incluye el primer intrón del gen Act8, operativamente conectado a un péptido de tránsito al cloroplasto de EPSPS de *Arabidopsis*, operativamente conectado a 5-enol-piruvil-shikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) tolerante al glifosato procedente de la cepa CP4 de *Agrobacterium sp.*, operativamente unido a la región de terminación 3' de ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa E9 de guisante y

b) la secuencia de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Mapa del plásmido de pMON51915.
 Figura 2. Organización genómica de la inserción en el evento de algodón MON 88913.
 Figura 3. Secuencia de unión al ADN 5' (SEQ ID NO: 1) y secuencia de unión al ADN 3' (SEQ ID NO: 2) de MON 88913.
 Figura 4. Región de ADN transgén/genómico 5' de MON 88913 (SEQ ID NO: 3).
 Figura 5. Región de ADN transgén/genómico 3' de MON 88913 (SEQ ID NO: 4).

Descripción detallada de las realizaciones preferentes

Las siguientes definiciones y procedimientos se proporcionan para definir mejor la presente invención y para guiar a los expertos en la materia en la práctica de la presente invención. A menos que se indique lo contrario, los términos y abreviaturas han de entenderse de acuerdo con el uso convencional por los expertos en la materia relevante. Las definiciones de términos comunes en la biología molecular también pueden hallarse en Rieger y col., *Glossary of*

Genetics: Classical and Molecular, 5ª edición, Springer-Verlag: Nueva York, 1991; y Lewin, *Genes V*, Oxford University Press: Nueva York, 1994. Se utiliza la nomenclatura para bases de ADN como se expone en 37 CFR § 1.822.

5 Como se utiliza en la presente memoria, el término "algodón" significa *Gossypium hirsutum* e incluye todas las variedades de plantas que pueden cultivarse con el evento de algodón MON 88913.

Como se utiliza en la presente memoria, la expresión "que comprende" significa "incluyendo, entre otros".

Como se utiliza en la presente memoria, el término "cultivo" se refiere a plantas cultivadas o partes de plantas, tales como las que se cultivan en un campo, parcela, fila, invernadero, llanura, o recipiente.

10 "Glifosato" hace referencia a N-fosfometilglicina y sus sales. N-fosfometilglicina es un herbicida bien conocido que tiene actividad en un amplio espectro de especies de plantas. El glifosato es el principio activo de Roundup® (Monsanto Co.), un herbicida seguro que tiene una semivida deseablemente corta en el medio ambiente. El glifosato es el principio activo del herbicida Roundup® (Monsanto Co.). Los tratamientos con "herbicida glifosato" se refieren a tratamientos con el herbicida Roundup®, Roundup Ultra®, Roundup Pro® o cualquier otra formulación de herbicidas que contiene glifosato. Los ejemplos de formulaciones comerciales de glifosato incluyen, sin restricción, los vendidos por la empresa Monsanto como herbicidas ROUNDUP®, ROUNDUP® ULTRA, ROUNDUP® ULTRAMAX, ROUNDUP® WEATHERMAX, ROUNDUP® CT, ROUNDUP® EXTRA, ROUNDUP® BIACTIVE, ROUNDUP® BIOFORCE, RODEO®, POLARIS®, SPARK® y ACCORD®, todos los cuales contienen glifosato como su sal de isopropilamonio; los vendidos por la empresa Monsanto como herbicidas ROUNDUP® DRY y RIVAL®, que contienen glifosato como su sal de amonio; el vendido por la empresa Monsanto como ROUNDUP® GEORFORCE, que contiene glifosato como su sal de sodio; y el vendido por Syngenta Crop Protection como herbicida TOUCHDOWN®, que contiene glifosato como su sal de trimetilsulfonio. Cuando se aplica a una superficie de la planta, el glifosato se mueve sistémicamente a través de la planta. El glifosato es fitotóxico debido a su inhibición de la vía del ácido shikímico, que proporciona un precursor para la síntesis de aminoácidos aromáticos. El glifosato inhibe la enzima 5-enol-piruvil-shikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) hallada en las plantas. La tolerancia al glifosato puede lograrse por la expresión de variantes de EPSPS bacterianas y variantes de EPSPS de plantas que tienen menor afinidad para el glifosato y por lo tanto, retienen su actividad catalítica en presencia de glifosato (patentes de Estados Unidos n.º 5.633.435, 5.094.945, 4.535.060, y 6.040.497).

Un "evento" transgénico se produce por la transformación de una célula vegetal con ADN heterólogo, por ejemplo, una construcción de ácido nucleico (pMON51915, Figura 1) que incluye un transgén de interés; regeneración de una población de plantas resultantes de la introducción del transgén en el genoma de la célula vegetal, y selección de una planta particular caracterizada por la introducción en el emplazamiento de un genoma particular. El término "evento" se refiere a la planta transformante original y a la progenie del transformante que incluyen el ADN heterólogo. El término "evento" también incluye la progenie producida por una exogamia sexual entre el evento y otra planta en la que la progenie incluye el ADN heterólogo. Incluso después de un retrocruzamiento con un padre recurrente, el ADN insertado y el ADN genómico flanqueante del evento parental transformado está presente en la progenie del cruzamiento en el mismo emplazamiento cromosómico. El término "evento" también se refiere al ADN del transformante original que comprende el ADN insertado, y la secuencia genómica flanqueante inmediatamente adyacente al ADN insertado, que se espera que sea transferido a una progenie que recibe el ADN insertado que incluye el transgén de interés como resultado de un cruzamiento sexual de una línea parental que incluye el ADN insertado (por ejemplo, el transformante original y la progenie resultante de la autofecundación) y una línea parental que no contiene el ADN insertado.

Se sabe que la expresión de genes extranjeros en plantas es influenciada por su posición cromosómica, quizás debido a la estructura de la cromatina (por ejemplo, heterocromatina) o la proximidad de elementos de regulación transcripcional (por ejemplo, potenciadores) cercanos al sitio de integración (Weising y col., *Ann. Rev. Genet* 22:421-477, 1988). Por este motivo, a menudo es necesario identificar de forma sistemática un gran número de eventos con el fin de identificar un evento caracterizado por la expresión óptima de un gen de interés introducido. Por ejemplo, se ha observado en plantas y en otros organismos que puede haber una amplia variación en los niveles de expresión de un transgén introducido entre eventos. También puede haber diferencias en los patrones de expresión espaciales o temporales, por ejemplo, las diferencias en la expresión relativa de un transgén en diferentes tejidos vegetales, que pueden no corresponder con los patrones esperados de elementos reguladores transcripcionales presentes en la construcción génica introducida. Por este motivo, es común producir cientos a miles de eventos diferentes e identificar de forma sistemática esos eventos de un único evento que tiene los niveles de expresión deseados de transgén y patrones para fines comerciales. Un evento que tiene niveles o patrones de expresión del transgén deseados es útil para la introgresión del transgén en otros contextos genéticos mediante cruzamiento sexual utilizando procedimientos convencionales de cultivo. La progenie de dichos cruzamientos mantiene las características de expresión del transgén del transformante original. Esta estrategia se utiliza para asegurar la expresión génica fiable en una serie de variedades que se adapta bien a las condiciones de cultivo locales y las demandas del mercado.

60 Una planta de algodón tolerante al glifosato puede cultivarse en primer lugar cruzando sexualmente una primera planta de algodón parental, que consiste en una planta de algodón cultivada a partir de la célula vegetal de algodón

transgénico derivada de la transformación con los casetes de expresión de la planta contenidos en pMON51915 y que tolera la aplicación del herbicida glifosato con una segunda planta de algodón parental que carece de la tolerancia al herbicida glifosato, produciendo de ese modo una pluralidad de primeras plantas de progenie; y seleccionando después una primera planta de progenie que es tolerante al herbicida glifosato; y autofecundando la primera planta de progenie, produciendo de ese modo una pluralidad de segundas plantas de progenie; y seleccionando después de las segundas plantas de progenie una planta tolerante al herbicida glifosato. Estas etapas pueden incluir además el retrocruzamiento de la primera planta de progenie tolerante al glifosato o la segunda planta de progenie tolerante al glifosato con la segunda planta de algodón parental o una tercera planta de algodón parental, produciendo de ese modo una planta de algodón que tolera la aplicación del herbicida glifosato. En la presente solicitud, la planta transgénica de algodón también se define como el evento de algodón MON 88913 y puede referirse en la presente memoria como MON 88913.

También debe entenderse que dos plantas transgénicas diferentes también pueden cruzarse para producir descendencia que contenga dos genes exógenos independientemente añadidos por segregación. La autofecundación de la progenie apropiada puede producir plantas que son homocigotas para ambos genes exógenos añadidos. El retrocruzamiento con una planta parental y la exogamia con una planta no transgénica también se contemplan, al igual que la propagación vegetativa. Las descripciones de otros procedimientos de cultivo que se utilizan habitualmente para rasgos y cultivos diferentes pueden hallarse en una de las diversas referencias, por ejemplo, Fehr, en *Breeding Methods for Cultivar Development*, Wilcox J. ed., Sociedad Americana de Agronomía, Madison WI (1987).

Una "sonda" es un ácido nucleico aislado al que se vincula una etiqueta convencional detectable o molécula indicadora, por ejemplo, un isótopo radiactivo, ligando, agente quimioluminiscente, o enzima. Dicha sonda es complementaria a una cadena de un ácido nucleico diana, a una cadena de ADN genómico de MON 88913 de una planta MON 88913 o de una muestra que incluye ADN de MON 88913. Las sondas incluyen no solo ácidos desoxirribonucleicos o ribonucleicos sino también poliamidas y otros materiales de sonda que se unen concretamente a una secuencia de ADN diana y pueden utilizarse para detectar la presencia de esa secuencia de ADN diana.

Los cebadores de ADN son ácidos polinucleicos aislados que se hibridan a una cadena de ADN diana complementaria mediante hibridación de ácidos nucleicos para formar un híbrido entre el cebador y la cadena de ADN diana, extendido después 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 se refieren a al menos dos moléculas de cebadores de ADN útiles para la amplificación de una secuencia de ácidos nucleicos diana, por ejemplo, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otros procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos convencionales.

Generalmente, las sondas y cebadores son 11 polinucleótidos o más de longitud, a menudo 18 polinucleótidos o más, 24 polinucleótidos o más, o 30 polinucleótidos o más. Dichas sondas y cebadores se seleccionan para que tengan una longitud suficiente para hibridarse concretamente a una secuencia diana en condiciones de hibridación muy rigurosas. Preferentemente, las sondas y cebadores tienen una similitud de secuencia completa con la secuencia diana, aunque las sondas que difieren de la secuencia diana que retienen la capacidad para hibridarse a secuencias diana pueden diseñarse por procedimientos convencionales.

Los procedimientos para preparar y utilizar sondas y cebadores se describen, por ejemplo, en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., vol. 1-3, ed. Sambrook y col., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 (de aquí en adelante, "Sambrook y col., 1989"); *Current Protocols in Molecular Biology*, ed. Ausubel y col., Greene Publishing y Wiley-Interscience, Nueva York, 1992 (con actualizaciones periódicas) (de aquí adelante, "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 por PCR pueden derivarse de una secuencia conocida, por ejemplo, mediante el uso de programas informáticos destinados a tal fin, tal como Primer (versión 0.5, © 1991, Instituto Whitehead para la Investigación Biomédica, Cambridge, MA).

Los cebadores y las sondas basados en ADN genómico flanqueante y secuencias de inserción de transgén desvelados en la presente memoria pueden utilizarse para confirmar (y, si es necesario, para corregir) las secuencias de ADN desveladas por procedimientos convencionales, por ejemplo, por aislamiento de ADN genómico de MON 88913, reclonación de las regiones transgén/genómica y secuenciación de dichas moléculas de ADN.

Las sondas de ácido nucleico y cebadores hibridan en condiciones rigurosas a una molécula de ADN diana. Cualquier procedimiento convencional de hibridación o amplificación de ácidos nucleicos puede utilizarse para identificar la presencia de ADN de un evento transgénico en una muestra. Las moléculas de ácido polinucleico o fragmentos de las mismas son capaces de hibridarse concretamente a otras moléculas de ácido nucleico en determinadas circunstancias. Como se utiliza en la presente memoria, se dice que dos moléculas de ácido polinucleico son capaces de hibridarse concretamente entre sí, si las dos moléculas son capaces de formar una estructura de ácidos nucleicos bicatenaria antiparalela. Se dice que una molécula de ácido nucleico es el "complemento" de otra molécula de ácido nucleico si exhibe complementariedad completa. Como se utiliza en la presente memoria, se dice que las moléculas exhiben "complementariedad completa" cuando cada nucleótido de

una de las moléculas es complementario a un nucleótido de la otra. Se dice que dos moléculas son "mínimamente complementarias" si pueden hibridarse entre sí con una estabilidad suficiente como para permitirles continuar hibridándose entre sí en condiciones al menos convencionales de "baja rigurosidad". Del mismo modo, se dice que las moléculas son "complementarias" si pueden hibridarse entre sí con una estabilidad suficiente como para permitirles continuar hibridándose entre sí en condiciones convencionales de "alta rigurosidad". Las condiciones rigurosas convencionales se describen por Sambrook y col., 1989, y por Haymes y col., en *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, DC (1985). Las salidas de complementariedad completa, son por lo tanto admisibles, siempre que dichas salidas no excluyan completamente la capacidad de las moléculas de formar una estructura bicatenaria. A fin de que una molécula de ácido nucleico sirva como un cebador o sonda solo necesita ser lo suficientemente complementaria en secuencia para ser capaz de formar una estructura bicatenaria estable en las concentraciones de disolvente y sal particulares empleadas.

Como se utiliza en la presente memoria, una secuencia de ADN sustancialmente homóloga es la secuencia de una molécula de ADN que se hibridará concretamente al complemento de una molécula de ADN diana con la que se está comparando en condiciones de alta rigurosidad. Las condiciones de rigurosidad apropiadas que favorecen la hibridación de ADN, por ejemplo, 6,0 x cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45 °C, seguido de un lavado de 2,0 x SSC a 50 °C, son conocidas por los expertos en la materia o pueden hallarse en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Por ejemplo, la concentración de sal en la etapa de lavado puede seleccionarse desde una baja rigurosidad de aproximadamente 2,0 x SSC a 50 °C a una alta rigurosidad de aproximadamente 0,2 x SSC a 50 °C. Además, la temperatura en la etapa de lavado puede aumentarse a partir de condiciones de baja rigurosidad a temperatura ambiente, aproximadamente a 22 °C, hasta condiciones de alta rigurosidad a aproximadamente 65 °C. Tanto la temperatura como la sal pueden variarse, o la temperatura o la concentración de sal pueden mantenerse constantes mientras se cambia la otra variable. En una realización preferente, un ácido polinucleico se hibridará concretamente a una o más de las moléculas de ácido nucleico expuestas en la SEQ ID NO: 3 o 4, o complementos de las mismas o fragmentos de cualquiera de ellas en condiciones moderadamente rigurosas, por ejemplo, en aproximadamente 2,0 x SSC y aproximadamente 65 °C. En una realización particularmente preferente, un ácido nucleico se hibridará concretamente a una o más de las moléculas de ácido nucleico expuestas en la SEQ ID NO: 3 o 4, o complementos o fragmentos de cualquiera de ellas en condiciones de alta rigurosidad. En un aspecto, una molécula de ácido nucleico marcadora preferente tiene la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 1 o 2, o complementos de la misma o fragmentos de cualquiera de ellas. En otro aspecto, una molécula de ácido nucleico marcadora preferente comparte una porción sustancial de su identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, o complemento de las mismas o fragmentos de cualquiera de ellas, en la que la identidad de secuencia oscila entre 80 % y 100 % o 90 % y 100 %. Una molécula de ácido nucleico marcadora preferente comparte entre el 95 % y 100 % de la identidad de secuencia con la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, o complemento de la misma o fragmentos de ella. La SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 pueden utilizarse como marcador en los procedimientos de cultivo de plantas para identificar la progenie de cruzamientos genéticos similares a los procedimientos descritos para el análisis del marcador de ADN de repetición de secuencia simple, en *"DNA markers: Protocols, applications, and overviews: (1997) 173-185, Cregan, y col., eds., Wiley-Liss NY. La hibridación de la sonda a la molécula de ADN diana puede detectarse por cualquier serie de procedimientos conocidos por los expertos en la materia, estos pueden incluir, entre otros, etiquetas fluorescentes, etiquetas radioactivas, etiquetas basadas en anticuerpos, y etiquetas quimioluminiscentes.*

Respecto a la amplificación de una secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, por PCR) utilizando un par de cebadores de amplificación particular, las "condiciones rigurosas" son las condiciones que permiten que el par de cebadores se hibride solo a la secuencia de ácido nucleico diana a la que se uniría un cebador que tiene la secuencia de tipo natural correspondiente (o su complemento) y preferentemente producen un producto de amplificación único, el amplicón, en una reacción de amplificación térmica de ADN.

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

Como se utiliza en la presente memoria, "ADN amplificado" o "amplicón" hace referencia al producto del procedimiento de amplificación de ácido polinucleico dirigido a una molécula de ácido polinucleico diana que forma parte de un molde de ácido polinucleico. Por ejemplo, para determinar si una planta de algodón resultante de un cruzamiento sexual contiene ADN genómico de evento transgénico de la planta del evento de algodón MON 88913, el ADN que se extrae de una muestra de tejido de la planta de algodón puede someterse a un procedimiento de amplificación de ácido polinucleico utilizando un par de cebadores que incluye un cebador derivado de la secuencia de ADN en el genoma de la planta MON 88913 adyacente al sitio de introducción del ADN heterólogo insertado (ADN transgén), y un segundo cebador derivado del ADN heterólogo insertado para producir un amplicón que es diagnóstico de la presencia del ADN del evento MON 88913. El amplicón diagnóstico es de una longitud y tiene una secuencia de ADN que también es diagnóstico del evento. El amplicón puede variar en longitud de la longitud combinada de los pares de cebadores más un par de bases de nucleótidos, preferentemente más aproximadamente cincuenta pares de bases (pb) de nucleótidos, más preferentemente más aproximadamente doscientos cincuenta pares de bases de nucleótidos, e incluso más preferentemente más aproximadamente cuatrocientos cincuenta pares de bases de nucleótidos o más. Alternativamente, un par de cebadores puede derivarse de la secuencia genómica en ambos lados del ADN heterólogo insertado para producir un amplicón que incluye la secuencia de polinucleótidos

de inserción completa (por ejemplo, un cebador directo aislado de la porción genómica de la SEQ ID NO: 3 y un cebador inverso aislado de la porción genómica de la SEQ ID NO: 4 que amplifica una molécula de ADN que comprende los dos casetes de expresión del fragmento de ADN de pMON51915 que se insertó en el genoma MON 88913, en el que la inserción comprende aproximadamente 8.512 pb de la inserción, Figura 2). Un miembro de un par de cebadores derivado de la secuencia genómica de la planta puede estar emplazarse a una distancia de la secuencia de ADN insertada, esta distancia puede variar entre un par de bases de nucleótidos hasta aproximadamente veinte mil pares de bases de nucleótidos. El uso del término "amplicón" excluye concretamente dímeros de cebadores que pueden formarse en la reacción de amplificación térmica de ADN.

La amplificación de ácidos polinucleicos puede lograrse mediante cualquiera de los diversos procedimientos de amplificación de ácidos polinucleicos conocidos en la materia, incluyendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los procedimientos de amplificación son conocidos en la materia y se describen, entre otros, en las patentes de Estados Unidos 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) de ADN genómico y hasta 42 kb de ADN bacteriófago (Cheng y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 91:5695-5699, 1994). Estos procedimientos, así como otros procedimientos conocidos en la materia de amplificación de ADN pueden utilizarse. La secuencia de la inserción de ADN heterólogo o secuencia de ADN genómico flanqueante de MON 88913 puede verificarse (y corregirse si es necesario) amplificando dichas moléculas de ADN de semillas o plantas de MON 88913 cultivadas a partir de la semilla depositada ante la CCTA con el número de acceso PTA-4854, utilizando cebadores derivados de las secuencias proporcionadas en la presente memoria, seguido de la secuenciación de ADN convencional del amplicón por PCR o fragmentos de ADN clonados del mismo. Los kits de detección de ADN que se basan en procedimientos de amplificación de ADN contienen cebadores de ADN que amplifican concretamente un amplicón diagnóstico. El kit puede proporcionar un procedimiento de detección basado en gel de agarosa, criterio de valoración Taqman®, o cualquier serie de procedimientos para detectar el amplicón diagnóstico que se conocen en la materia. Un kit puede contener cebadores de ADN que son homólogos o complementarios a cualquier porción de la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.

El amplicón producido por estos procedimientos puede detectarse por una pluralidad de técnicas. Uno de dichos procedimientos es el análisis genético bit (Nikiforov, y col. *Nucleic Acid Res.* 22:4167-4175, 1994) en el que se diseña un oligonucleótido de ADN que se superpone tanto a la secuencia de ADN genómico flanqueante como a la secuencia de ADN insertada. El oligonucleótido se inmoviliza en los pocillos de una placa de microtitulación. Después de la PCR de la región de interés (utilizando un cebador en la secuencia insertada y uno en la secuencia genómica flanqueante adyacente), un producto por PCR monocatenario puede hibridarse al oligonucleótido inmovilizado y servir como un molde para una reacción de extensión de una única base utilizando una ADN polimerasa y trifosfatos de dideoxinucleótidos marcados (ddNTPs) específicos para la esperada base siguiente. La lectura puede ser fluorescente o basarse en ELISA. Una señal indica la presencia de la secuencia transgén/genómica debido a la amplificación, hibridación y extensión de una única base exitosas.

Otro procedimiento es la técnica de pirosecuenciación descrita por Winge (Innov. Pharma. Tech. 00:18-24, 2000). En este procedimiento se diseña un oligonucleótido que se superpone a la unión de ADN genómico adyacente y ADN de inserción. El oligonucleótido se hibrida al producto por 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, sulfúrida, luciferasa, apirasa, adenosina-5'-fosfosulfato y luciferina. Se añaden individualmente desoxinucleótidos trifosfato (dNTP) y la incorporación da como resultado una señal luminosa que se mide. Una señal luminosa indica la presencia de la secuencia transgén/genómica debido a la amplificación, hibridación y extensión de una única base o múltiples bases exitosas.

La polarización de fluorescencia descrita por Chen, y col., (*Genome Res.* 9:492-498, 1999) es un procedimiento que puede utilizarse para detectar el amplicón. Utilizando este procedimiento, se diseña un oligonucleótido que se superpone a la unión de ADN insertado y genómico flanqueante. El oligonucleótido se hibrida al producto por 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 fluorescentemente. La extensión de una única base da como resultado la incorporación de ddNTP. La incorporación puede medirse como un cambio en la polarización utilizando un fluorómetro. Un cambio en la polarización indica la presencia de la secuencia transgén/genómica debido a la amplificación, hibridación y extensión de una única base exitosas.

Taqman® (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) se describe como un procedimiento para detectar y cuantificar la presencia de una secuencia de ADN y se entiende completamente en las instrucciones proporcionadas por el fabricante. En pocas palabras, se diseña una sonda de oligonucleótidos FRET que se superpone a la unión de ADN genómico flanqueante y de inserción. La sonda FRET y los cebadores de PCR (un cebador en la secuencia de ADN de inserción y uno en la secuencia genómica flanqueante) se ciclan en presencia de una polimerasa termoestable y dNTPs. La hibridación de la sonda FRET da lugar a la escisión y liberación de la fracción fluorescente lejos de la fracción de desactivación en la sonda FRET. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia transgén/genómica debido a la amplificación e hibridación exitosas.

Se han descrito balizas moleculares para su uso en la detección de secuencias, como se describe en Tyangi, y col. (*Nature Biotech.* 14:303-308, 1996). En pocas palabras, se diseña una sonda de oligonucleótidos FRET que se

superpone a la unión de ADN genómico flanqueante y de inserción. La estructura única de la sonda FRET da como resultado que la misma contiene la estructura secundaria que mantiene las fracciones fluorescentes y de desactivación en proximidad inmediata. La sonda FRET y los cebadores de PCR (un cebador en la secuencia de ADN de inserción y uno en la secuencia genómica flanqueante) se ciclan en presencia de una polimerasa termoestable y dNTPs. Tras el éxito de amplificación por PCR, la hibridación de la sonda FRET a la secuencia diana da como resultado la eliminación de la estructura secundaria de la sonda y la separación espacial de las fracciones fluorescentes y de desactivación. Se produce una señal fluorescente. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia de inserción de transgén/flanqueante debido a la amplificación e hibridación exitosas.

Los kits de detección de ADN pueden desarrollarse utilizando las composiciones desveladas en la presente memoria y los procedimientos bien conocidos en la materia de detección de ADN. Los kits resultan útiles para la identificación del ADN del evento de algodón MON 88913 en una muestra y pueden aplicarse a procedimientos para el cultivo de plantas de algodón que contienen ADN de MON 88913. Los kits contienen secuencias de ADN que son útiles como cebadores o sondas y que son homólogas o complementarias a cualquier porción de la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 o a las secuencias de ADN homólogas o complementarias al ADN contenido en cualquiera de los elementos genéticos de transgén de pMON51915 que se han insertado en el ADN de MON 88913 (Figura 2). Estas secuencias de ADN pueden utilizarse en procedimientos de amplificación de ADN (PCR) o como sondas en procedimientos de hibridación de ácidos polinucleicos, es decir, análisis de Southern, análisis de Northern. Los elementos genéticos de transgén contenidos en el ADN de MON 88913 (Figura 2) incluyen un primer casete de expresión que comprende el promotor del virus de mosaico Figwort construido como un elemento promotor quimérico con el promotor (At.Eflα) de factor de elongación alfa-1 de *Arabidopsis* (FMV35S/Eflα, patente de Estados Unidos n.º 6.462.258, SEQ ID NO: 28), operativamente unido a la secuencia líder de traducción y al intrón del factor de elongación 1-alfa de *Arabidopsis* (número de acceso a Genbank X16430, como se describe en Axelos y col., *Mol. Gen. Genet.* 219:106-112, 1989), operativamente unido al péptido de tránsito al cloroplasto de EPSPS de *Arabidopsis* (TS-At.EPSPS:CTP2, Klee y col., *Mol. Gen. Genet.* 210:47-442, 1987), operativamente unido a 5-enol-piruvil-shikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) tolerante al glifosato procedente de la cepa CP4 de la especie *Agrobacterium sp.* (aroA:CP4, patente de Estados Unidos n.º 5.633.435), operativamente unido a la región de terminación 3' de ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa E9 de guisante (T-Ps.RbcS2:E9, Coruzzi, y col., *EMBO J.* 3:1671-1679, 1984), y un segundo casete de expresión que comprende el promotor CaMV35S-Act8 que incluye el primer intrón del gen Act8 (SEQ ID NO: 29, patente de Estados Unidos n.º 6.462.258), operativamente conectado a un péptido de tránsito al cloroplasto de EPSPS de *Arabidopsis* (TS-At.EPSPS:CTP2), operativamente conectado a 5-enol-piruvil-shikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) tolerante al glifosato procedente de la cepa CP4 de la especie *Agrobacterium sp.* (aroA:CP4, patente de Estados Unidos n.º 5.633.435), operativamente unido a la región de terminación 3' de ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa E9 de guisante.

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar los ejemplos de determinadas realizaciones preferentes de la invención. Los expertos en la materia han de apreciar que las técnicas desveladas en los ejemplos siguientes representan enfoques que los inventores han descubierto que funcionan bien en la práctica de la invención, y por consiguiente, pueden considerarse para constituir ejemplos de modos preferentes para su práctica.

Ejemplos

Ejemplo 1

El evento del algodón transgénico MON 88913 se generó por una transformación mediada por *Agrobacterium* de células de algodón con un fragmento de ADN derivado de pMON51915 (Figura 1). La construcción de la transformación de la planta, pMON51915, se cruzó con *Agrobacterium* utilizando un procedimiento de cruzamiento triparental (Ditta y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77:7347-7351, 1980). La transformación de células de algodón con transgenes puede realizarse utilizando los procedimientos descritos, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 5.004.863, en la patente de Estados Unidos n.º 5.159.135, y en la patente de Estados Unidos n.º 5.518.908. La transformación de algodón se realiza esencialmente como se describe en el documento WO/0036911 o como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 5.846.797. Una modificación de estos procedimientos puede incluir, entre otros, el siguiente ejemplo. 130 semillas Coker se esterilizan en la superficie y se germinan en la oscuridad. Los explantes de hipocótilo se cortan de las plantas de semillero germinadas en longitudes de aproximadamente 1-1,5 centímetros. La cepa ABI de *Agrobacterium tumefaciens* transformada para contener pMON51915 se cultiva en caldo de Luria sin antibióticos durante 16 horas a 28 °C, después se diluye a aproximadamente 2×10^8 bacterias/mililitro (ml). El explante de hipocótilo se sumerge en el inóculo de *Agrobacterium* durante 2-5 minutos, después se cocultiva durante aproximadamente 45 horas en MS + 1,9 mg/l de KNO₃ + glucosa al 3 % (TRM), 30 explantes por placa, 24 °C, en la oscuridad. Los explantes se transfieren a TRM que contiene 150 mg/l de cefotaxima y 300 μM de glifosato durante cuatro periodos de cultivo, cada periodo de aproximadamente seis semanas. Los callos embriogénicos se segregan a partir del explante primario al final del 3^{er} o 4^o periodo de cultivo y se colocan en el mismo medio. Los callos embriogénicos se subcultivan una vez suspendiéndose brevemente en líquido TRM + glucosa al 3 %, seguido por el vertido de la suspensión en placas de "TRM" + 150 mg/l de cefotaxima + 300 μM de glifosato. Los embriones somáticos se cosechan de 3-8 semanas después del subcultivo del líquido, después se cultivan en medios Stewart y Hsu con glucosa al 0,5 %. Las plántulas derivadas de los embriones somáticos se maduran a aproximadamente 4-7 cm (hojas de 3-6) en cajas Magenta con Stewart y Hsu modificados con 40 mM de NO₃/10 mM de NH₄ + sacarosa al 2 %. Estas plantas se transplantan a continuación a tierra

orgánica, macetas de 4", 100 % de humedad, 16 horas de luz por día, durante 4-6 días, seguido de un 50 % de humedad 5-10 días.

El fragmento de ADN de pMON51915 contiene dos casetes de expresión de transgén insertados en el genoma de MON 88913 (Figura 2) que confieren de manera colectiva tolerancia al glifosato a MON 88913 y progeñie del mismo.

- 5 Las plantas y semillas de MON 88913 tienen partes regenerables. Las partes regenerables de la semilla incluyen, entre otros, embrión, cotiledón, y meristema de brote o raíz. Las partes de la planta regenerables incluyen, entre otros, hojas, peciolo, hipocótilo, secciones de tallo, y meristemas de raíz y apicales. Las partes de plantas del evento de algodón MON 88913 pueden incluir, entre otros, polen, óvulos, flores, cápsulas, vainas, brotes, raíces, y hojas. Los componentes extraíbles de semilla MON 88913 pueden incluir, entre otros, proteínas, comida, harina, vainas, aceite, y línter.

Ejemplo 2

- 15 El evento del algodón MON 88913 tolerante al glifosato se seleccionó entre muchos eventos transgénicos de algodón para la tolerancia a la lesión reproductiva y vegetativa del glifosato. La producción exitosa de un evento transgénico de calidad comercial requiere actualmente la producción de un gran número de eventos transgénicos. MON 88913 fue un evento entre aproximadamente 1.000 eventos R0 que habían sido transformados con diferentes construcciones de ADN que incluían pMON51915. El evento MON 88913 se seleccionó entre muchos eventos por una serie de análisis moleculares e identificaciones sistemáticas de tolerancia al glifosato.

- 20 Los eventos se identificaron de forma sistemática en un ensayo de tolerancia al glifosato en invernadero, las plantas se clasificaron para tolerancia vegetativa y reproductiva. Quince a veinticinco semillas R₁ de cada evento se plantaron en bandejas de 15 células con medio de cultivo Metro-Mix 350, que contiene una combinación de turba, vermiculita, nutrientes, agentes humectantes, corteza y cenizas procesadas. Los fertilizantes adicionales incluidos en el medio fueron micronutrientes Osmocote 14-14-14, Osmocote Plus 15-9-12, y MicroMax. Todas las plantas se cultivaron en un invernadero. La temperatura media de día durante la temporada de crecimiento era de 32 grados Celsius (°C), mientras que la temperatura media de noche era de 24 °C. El fotoperiodo se estableció en 16 horas de luz y ocho horas de oscuridad, con intensidad de luz máxima. La humedad relativa promedio durante el ciclo de crecimiento era del 45 por ciento. Las plantas se pulverizaron en las etapas de 4 y 8 hojas secuencialmente con 48 oz/A (oz = onzas, A = acre) de Roundup Ultra® (herbicida que contiene glifosato). Siete días después de la aplicación de glifosato a la etapa de 4 hojas, se puntuaron las plantas para observar el daño vegetativo y la segregación del fenotipo tolerante al glifosato se recogió. Estos datos se utilizaron para confirmar que la inserción del transgén del evento se realizó como un único gen dominante, adhiriéndose a los modelos genéticos mendelianos. Los eventos de buena tolerancia vegetativa se trasplantaron posteriormente en macetas de 10 pulgadas con el mismo medio de cultivo Metro-Mix 350 descrito previamente y se cultivaron hasta la madurez. Las plantas se trataron con Pix Plus (BASF, Research Triangle Park, NC), cuando fuese necesario para regular la altura de la planta. A los tres meses post-plantación, las plantas se mapearon para la retención de las cápsulas en las primeras posiciones de frutos de los cinco primeros ramos de frutos. El valor máximo de retención para este mapeo de planta es 5 (cinco cápsulas retenidas). Esto proporcionó una medición rápida, indirecta de la fertilidad de la planta. Con esta identificación sistemática en invernadero, la media de retención para el evento comercial actual (algodón RR 1445) es inferior a 1,0. Los eventos con un valor medio de retención de cápsula superior o igual a dos tienen un valor como nuevas selecciones de plantas tolerantes al glifosato.

- 40 Los eventos que cumplieron con los criterios de tolerancia reproductiva y vegetativa de Roundup® Ultra se analizaron para determinar el número de copias a través del análisis de membrana de Southern. Los eventos de copia única que mostraron una buena tolerancia en los experimentos iniciales en invernadero se caracterizaron adicionalmente en 1) ensayos adicionales de tolerancia en invernadero en relaciones mayores de glifosato, 2) ensayos en campo replicados, y con 3) identificaciones sistemáticas moleculares adicionales. Los ensayos de tolerancia en invernadero se llevaron a cabo utilizando plantas homocigóticas. Todos los experimentos contenían el evento de algodón 1445 comercial actual de Roundup Ready® (norma comercial) para su comparación. Las semillas se plantaron en 15 bandejas de células y se trataron con 64 oz/A de Roundup Ultra® en la etapa de 4 hojas y 96 oz/A en la etapa de 8 hojas. Las plantas se trasplantaron a macetas de 10 pulgadas y se mapearon cuatro plantas a mitad de temporada en las primeras posiciones de frutos de los cinco primeros ramos de frutos. Asimismo se recogieron los datos del final de la temporada en todos los eventos e incluyeron el peso de las semillas de algodón, número de cápsulas, tamaño de cápsulas, y retención de cápsulas.

- 55 Se utilizó el ensayo en campo para seleccionar el evento que mostró mejores relaciones de crecimiento, retención de fruto, y rendimiento. Los ensayos en campo se dispusieron en un diseño de parcelas divididas al azar con tres replicaciones y tres tratamientos. Los eventos se plantaron en dos filas, parcelas de 30 pies. Los tratamientos consistieron en 64 oz/A (1,5 lb de ae/A) de Roundup Ultra® en las etapas de 4, 6, 10, 14 nodos y 96 oz/A (2,25 lb de ae/A) de Roundup Ultra® en las etapas de 4, 6, 10, 14 nodos sin pulverizar. Un mapeo de la planta a mitad de temporada se completó en diez plantas por maceta. Se recogieron los datos de retención de cápsulas para las primeras y segundas posiciones de frutos de los primeros cinco nodos de frutos que proporcionan una escala de valor de retención de cápsulas de 0-10. Una planta con un valor de retención de cápsulas igual o superior a 3 en la escala de 0-10 tiene un valor como nueva selección de planta tolerante al glifosato.

El ensayo en campo (10 emplazamientos) que compara el rendimiento de la fibra de algodón (libras/acre, lb/A) de MON 88913 y algodón 1445 RR mostró que MON 88913 proporcionó una protección sustancial contra los efectos del glifosato (libras de ácido equivalente/acre, lb de ae/A) en el rendimiento (Tabla 1). El rendimiento es una medición de la retención de cápsulas, las plantas de algodón modificadas por ingeniería genética para la tolerancia al glifosato que retienen un número sustancial de cápsulas en las primeras y segundas posiciones de frutos mantendrán una ventaja de rendimiento sobre las plantas de algodón que no son tan tolerantes al glifosato. Una dosis eficaz de un herbicida que contiene glifosato para controlar las malezas en un campo de MON 88913 comprende aproximadamente 4 oz/A y puede exceder 128 oz/A en función de las especies de malezas a controlar y la etapa de desarrollo de las malezas. El glifosato puede mezclarse con otros herbicidas para potenciar la actividad herbicida contra ciertas especies de maleza.

Tabla 1. Comparación del rendimiento de la fibra de MON 88913 y 1445 después del tratamiento con glifosato.

Tratamiento con glifosato	Rendimiento (lb/A) de 10 lugares		
	0 lb de ae/A	1,5 lb de ae/A	2,25 lb de ae/A
1445	2.421,84	1.044,19	831,47
MON 88913	2.551,58	2.587,61	2.412,3

Ejemplo 3

El ADN genómico de algodón para todas las reacciones por PCR y análisis de membrana de Southern se aisló utilizando un procedimiento en CTAB (Rogers y col., *Plant Mol. Biol.* 5:69-76, 1985) o kit para plantas Dneasy™ 96 (Cat. n.º 69181, Qiagen Inc., Valencia, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se recogió tejido de las hojas de las plantas en la etapa de 2-4 hojas. Se recogieron las hojas más pequeñas de cada planta y se congelaron inmediatamente en hielo seco. El ADN se extrajo utilizando, por ejemplo, el siguiente procedimiento. El tejido se molió utilizando microesferas de plástico con nitrógeno líquido. Se añadieron cinco ml de tampón de extracción a 0,75 gramos (g) de tejido y se incubaron a 55 °C durante 45 minutos. El tampón de extracción de CTAB consistía en 100 mM de Tris, pH 8,0, NaCl 1,4 M, 20 mM de EDTA, CTAB al 2 % con la adición de 5 µl (microlitros) de beta-mercaptoetanol, 5 µl de RNasa y PVPP al 1 %. Las muestras se extrajeron con un volumen idéntico de cloroformo (5 ml) y después se centrifugaron a 3.700 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo y el ADN se precipitó con un volumen idéntico de isopropanol. Tras la centrifugación a 3.700 rpm durante 15 minutos, los sedimentos se lavaron con etanol al 70 %, se secaron al aire, y se volvieron a suspender en 250 µl de agua.

Se obtuvo ADN genómico de algodón adyacente a la introducción del transgén del evento MON 88913 utilizando TAIL-PCR (Liu y col., *Plant Journal* 8:457-463, 1995). La extensión del ADN genómico se llevó a cabo utilizando el kit GenomeWalker (Clone Tech Laboratories, Palo Alto, CA) siguiendo el protocolo del fabricante. En pocas palabras, el ADN (~5 µg) se aisló utilizando el protocolo en CTAB descrito previamente, se digirió con varias endonucleasas de restricción (EcoRV, Sca1) a 37 °C durante la noche en un volumen total de 100 µl. Las endonucleasas de restricción se eliminaron con columnas de purificación por PCR QIAquick (cat. n.º 28104, Qiagen, Inc.). El ligamento de las moléculas adaptadoras era el descrito en el protocolo del fabricante. El ADN se amplificó utilizando el cebador FMV-1 (SEQ ID NO: 5) con el cebador AP1 (Clone Tech Laboratories) para la reacción primaria y el cebador FMV-2 anidado (SEQ ID NO: 6) con el cebador AP2 (Clone Tech Laboratories) para la reacción secundaria.

El ADN transgén/genómico 3' de MON 88913 se aisló utilizando PCR inversa. El ADN genómico total (~10 µg) se digirió con tres enzimas de restricción; *BclI*, *NcoI*, y *HindIII*. Las columnas de purificación por PCR QIAquick se utilizaron para purificar el ADN después de la digestión durante la noche a 37 °C. El ADN se eluyó de las columnas con 50 µl de agua y después se diluyó a 1 ml. El eluato diluido (85 µl) se combinó con 10 µl de tampón (10X) y 5 µl de T4 ligasa para hacer circular los fragmentos. Después de la incubación durante la noche a 16 °C, la ligasa se inactivó por calor a 70 °C. Las muestras se amplificaron por PCR con una serie de cebadores anidados. Las combinaciones de cebadores para PCR incluyeron: par de cebadores 8099-E9-1/E9-2 (SEQ ID NO: 7/SEQ ID NO: 8) para las muestras de *BclI* y *NcoI* y par de cebadores 8099-E9-1/Act8 rev (SEQ ID NO: 7/SEQ ID NO: 9) para la muestra *HindIII*; par de cebadores 8099-E9-2/E9-1 (SEQ ID NO: 10/SEQ ID NO: 11) para las muestras de *BclI* y *NcoI*; par de cebadores 8099-E9-2/Act8 (SEQ ID NO: 10/SEQ ID NO: 12) para la muestra de *HindIII*; par de cebadores 8099-E9-3/E9-1 (SEQ ID NO: 13/SEQ ID NO: 11) para las muestras de *BclI* y *NcoI* y 8099-E9-3/Act8 (SEQ ID NO: 13/SEQ ID NO: 12) para la muestra de *HindIII*. Las condiciones para PCR incluyeron: PCR primaria = 7 ciclos de 94 °C durante 2 segundos, 72 °C durante 10 minutos; 37 ciclos de 94 °C durante 2 segundos, 67 °C durante 10 minutos; 1 ciclo de 67 °C durante 10 minutos; PCR secundaria y terciaria = 5 ciclos de 94 °C durante 2 segundos, 72 °C durante 10 minutos; 24 ciclos de 94 °C durante 2 segundos, 67 °C durante 10 minutos; 1 ciclo de 67 °C durante 10 minutos.

Alternativamente, la amplificación de ADN por PCR del extremo 3' del evento MON 88913 puede realizarse con las condiciones que incluyen: 7 ciclos de 94 °C durante 25 segundos, 72 °C durante 3 minutos; 37 ciclos de 94 °C

durante 25 segundos, 67 °C durante 3 minutos; 1 ciclo de 67 °C durante 7 minutos. Todas las amplificaciones posteriores se llevaron a cabo con las siguientes condiciones: 7 ciclos de 94 °C durante 2 segundos, 72 °C durante 4 minutos; 37 ciclos de 94 °C durante 2 segundos, 67 °C durante 4 minutos; 1 ciclo de 67 °C durante 7 minutos. Todos los amplicones se visualizaron en geles de agarosa al 0,8 % teñidos con bromuro de etidio. El ADN se preparó para la secuenciación ya sea mediante la purificación de las muestras de PCR directamente con el kit de purificación por PCR QIAquick (cat. n.º 28104, Qiagen Inc.) o mediante la extracción del fragmento apropiado del gel y utilizando el kit de extracción de gel QIAquick (cat. n.º 28704, Qiagen Inc.).

Se diseñó una serie de cebadores de ADN para secuenciar la inserción transgénica y las regiones genómicas flanqueantes adyacentes de MON 88913. Se diseñaron cebadores de ADN que permitieron la amplificación de las regiones del transgén y genómicas flanqueantes completas mediante cinco fragmentos superpuestos. Se diseñaron cebadores únicos para permitir la amplificación de cada región de EPSPS-CTP2/*aroA*-CP4/RbcS2:E9 por separado. Para todos los fragmentos utilizados en la secuenciación, las amplificaciones se realizaron por triplicado. Las combinaciones del par de cebadores de ADN se utilizaron como cebadores de secuenciación para la región transgén/genómica 5' (SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 15), región transgén/genómica 3' (SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17) y elementos genéticos de inserción (SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 11). Se utilizó ADN genómico total de todas las reacciones por PCR. Todos los amplicones se visualizaron en geles de agarosa al 0,8 % teñidos con bromuro de etidio. El ADN se preparó para la secuenciación ya sea mediante la purificación de las muestras de PCR directamente con el kit de purificación por PCR QIAquick o mediante la extracción del fragmento apropiado del gel y utilizando el kit de extracción de gel QIAquick. La secuencia de ADN se produjo utilizando el equipo de análisis de secuencia de ADN (ABI Prism™ 377, PE Biosystems, Foster City, CA) y el software de análisis de secuencia DNASTAR (DNASTAR Inc., Madison, WI).

Los fragmentos de ADN de las regiones flanqueantes de la inserción transgén/genómica de MON 88913 se subclonaron utilizaron un kit TOPO TA Cloning® (Invitrogen). La secuencia de ADN de la región transgén/genómica 5' se muestra en la Figura 4 y la secuencia de ADN de la región transgén/genómica 3' se muestra en la Figura 5. En la secuencia de ADN mostrada en las Figuras 4 y 5, la secuencia de inserción del transgén está en cursiva.

Ejemplo 4

Los pares de cebadores del evento de ADN se utilizan para producir un amplicón diagnóstico del genoma del evento de algodón MON 88913. Los amplicones diagnósticos del genoma MON 88913 comprenden al menos una secuencia de unión, SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. Los pares de cebadores del evento que producirán un amplicón diagnóstico para MON 88913, en los cuales los pares de cebadores incluyen, entre otros, SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 15 para la secuencia de amplicón 5', y SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17 para el amplicón 3' cuando se utiliza en el protocolo indicado en la Tabla 2. Además de estos pares de cebadores, puede utilizarse cualquier par de cebadores, homólogo o complementario a la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, que en una reacción de amplificación de ADN produce un amplicón diagnóstico del genoma MON 88913. Se puede utilizar cualquier molécula de cebador de polinucleótido de ADN aislado único que comprende al menos 11 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO: 3, o su complemento que es útil en un procedimiento de amplificación de ADN para producir un amplicón diagnóstico de MON 88913. Se puede utilizar cualquier molécula de cebador de polinucleótido de ADN aislado único que comprende al menos 11 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO: 4, o su complemento que es útil en un procedimiento de amplificación de ADN para producir un amplicón diagnóstico de MON 88913. Un ejemplo de las condiciones de amplificación para este análisis se ilustra en la Tabla 2 y en la Tabla 3, no obstante, cualquier modificación de estos procedimientos que utilizan cebadores de ADN homólogos o complementarios a la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 o secuencias de ADN de los elementos genéticos contenidos en la inserción del transgén de MON 88913 que producen un amplicón diagnóstico de MON 88913, está dentro de la capacidad ordinaria de la materia. Un amplicón diagnóstico comprende una molécula de ADN homóloga o complementaria a al menos un ADN de unión transgén/genómico (SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2) o porción sustancial del mismo.

Un análisis para la muestra de tejido vegetal del evento MON 88913 ha de incluir un control de tejido positivo del evento MON 88913, un control negativo de una planta de algodón que no sea un evento MON 88913, y un control negativo que no contenga ADN genómico de algodón. Las secuencias de cebadores adicionales pueden seleccionarse entre la SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 por los expertos en la materia de los procedimientos de amplificación de ADN, y las condiciones seleccionadas para la producción de un amplicón por los procedimientos mostrados en la Tabla 2 y en la Tabla 3 pueden diferir, pero dan como resultado un amplicón diagnóstico del evento MON 88913. Las secuencias de cebadores de ADN con modificaciones en los procedimientos de la Tabla 2 y 3 pueden utilizarse. El amplicón producido por al menos una secuencia de cebadores de ADN derivada de la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 que es diagnóstico de MON 88913 puede utilizarse.

Los kits de detección de ADN que contienen al menos un cebador de ADN derivado de la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 que cuando se utiliza en un procedimiento de amplificación de ADN produce un amplicón diagnóstico para MON 88913 pueden utilizarse. Se puede utilizar el amplicón producido por al menos una secuencia de cebadores derivada de cualquiera de los elementos genéticos de pMON51915 que es diagnóstico de MON 88913. Puede obtenerse una planta o semilla de algodón, en la que su genoma producirá un amplicón que comprende SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 cuando se ensaya en un procedimiento de amplificación de ADN. El ensayo para el amplicón de MON 88913 puede realizarse utilizando un Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700, o termociclador

Eppendorf Mastercycler Gradient como se muestra en la Tabla 3, o mediante los procedimientos y aparatos conocidos por los expertos en la materia.

Tabla 2. Procedimiento de PCR y condiciones de mezcla de reacción para la identificación de la región de unión de inserción/genómica del transgén 5' de MON 88913.

5

Tabla 3. Parámetros de PCR sugeridos para diferentes termocicladores.

Etapa	Reactivo	Cantidad	Comentarios
1	agua exenta de nucleasa	añadir hasta un volumen final de 20 µl	-
2	10X tampón de reacción (con MgCl ₂)	2,0 µl	1X concentración final de tampón, 1,5 mM de concentración final de MgCl ₂
3	10 mM de solución de dATP, dCTP, dGTP, y dTTP	0,4 µl	200 µM de concentración final de cada dNTP
4	Cebador del evento (SEQ ID NO: 14 (resuspendido 1X en tampón TE o agua exenta de nucleasa a una concentración de 10 µM	0,4 µl	0,2 µM de concentración final
5	Cebador del evento (SEQ ID NO: 15 (resuspendido 1X en tampón TE o agua exenta de nucleasa a una concentración de 10 µM	0,4 µl	0,2 µM de concentración final
6	RNasa, libre de NDasa (500 ng/µl)	0,1 µl	50 ng/reacción
7	ADN polimerasa <i>REDTaq</i> (1 unidad/µl)	1,0 µl (recomendado para cambiar pipetas antes de la siguiente etapa)	1 unidad/reacción
8	ADN extraído (molde) <ul style="list-style-type: none"> • Muestras a analizar *hojas individuales *hojas agrupadas (máximo de 50 hojas/grupo) • Control negativo • Control negativo • Control positivo 	<ul style="list-style-type: none"> • 10-200 ng de ADN genómico • 200 ng de ADN genómico • 50 ng de ADN genómico de algodón (sin MON 88913) • Sin ADN molde • 50 ng de ADN genómico MON 88913 	
9	Mezclar suavemente y añadir 1-2 gotas de aceite mineral en la parte superior de cada reacción		

Continuar con la amplificación de ADN en un Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700, o termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient utilizando los siguientes parámetros de ciclación. El MJ Engine o termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient debe funcionar en el modo calculado. Hacer funcionar el termociclador Perkin-Elmer 9700 con la velocidad de rampa fijada al máximo.

10

ES 2 618 211 T3

Ciclo n.º	Ajustes: Stratagene Robocycler
1	94 °C 3 minutos
38	94 °C 1 minuto 60 °C 1 minuto 72 °C 1 minuto y 30 segundos
1	72 °C 10 minutos
Ciclo n.º	Ajustes: MJ Engine o Perkin-Elmer 9700
1	94 °C 3 minutos
38	94 °C 10 segundos 60 °C 30 segundos 72 °C 1 minuto
1	72 °C 10 minutos
Ciclo n.º	Ajustes: Eppendorf Mastercycler Gradient
1	94 °C 3 minutos
38	94 °C 15 segundos 60 °C 15 segundos 72 °C 1 minuto y 30 segundos
1	72 °C 10 minutos

Ejemplo 5

5 El ADN genómico de MON 88913 y el ADN de algodón genómico de control (~15 µg de cada uno) se digiere con diversas enzimas de restricción (140 U) en un volumen total de 150 µl incluyendo 15 µl del tampón del fabricante correspondiente (NEB, Beverly, MA). Se utilizan endonucleasas de restricción, por ejemplo, BgII, BamHI, NcoI, HindIII, y BclI, en el análisis Southern de MON 88913. Las digestiones de endonucleasa se realizan a la temperatura apropiada durante al menos 6 horas. Después de la incubación, el ADN se precipita con acetato de sodio 3M y 2,5 volúmenes de etanol. Posteriormente, el ADN se lava con etanol al 70 %, se seca y se vuelve a suspender en 40 µl de TBE. Se añade el tampón de carga (0,2x) a las muestras y después se lleva a cabo la electroforesis en geles de agarosa (0,8 %) durante 16-18 horas a 30 voltios. Los geles se tiñen con bromuro de etidio, después se tratan con una solución de depurinación (HCL 0,125 N) durante 10 minutos, con una solución desnaturalizante (hidróxido de sodio 0,5 M, cloruro de sodio 1,5 M) durante 30 minutos, y finalmente con una solución neutralizante (Trizma base 0,5 M, cloruro de sodio 1,5 M) durante 30 minutos. El ADN se transfiere a membrana Hybond-N (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Inglaterra) utilizando un Turboblotter (Schleicher y Schuell, Dassel, Alemania) durante 4-6 horas y después se fija a la membrana utilizando una luz UV.

20 Las membranas se prehibridan con 20 ml de solución DIG Easy Hyb (Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis, IN; cat. n.º 1603558) durante 2-4 horas a 45 °C. Las sondas de ADN radioactivas (³²P dCTP) homólogas o complementarias a la SEQ ID NO: 1, o SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3, o SEQ ID NO: 4, o una porción de las mismas se preparan utilizando un kit de marcado de ADN Radprime (Invitrogen, Carlsbad, CA; cat. n.º 18428-011). Los nucleótidos no incorporados se eliminan utilizando columnas sephadex G-50 (Invitrogen). La solución de prehibridación se reemplaza con 10 ml de solución DIG Easy Hyb precalentada que contiene la sonda desnaturalizada a una concentración final de 1 millón de recuentos por ml. Las membranas se hibridan a 45 °C durante 16-18 horas.

25 Las membranas se lavan con una solución de baja rigurosidad (5X SSC, 0,1X SDS) a 45 °C y después se lavan repetidas veces con una solución de alta rigurosidad (0,1X SSC, SDS al 0,1%) a 65 °C. Las membranas se exponen a una identificación sistemática con fósforo (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) durante >2 horas y la exposición se lee utilizando una máquina Data Storm 860 (Amersham Bio sciences).

Ejemplo 6

Los procedimientos utilizados para identificar la progenie de algodón heterocigoto a homocigoto que contiene el evento MON 88913 se describen en un ensayo de zigosidad para el que los ejemplos de las condiciones se describen en la Tabla 4 y en la Tabla 5. Los cebadores de ADN utilizados en el ensayo de zigosidad son el cebador SQ1099 (SEQ ID NO: 21), SQ1100 (SEQ ID NO: 22), SQ1353 (SEQ ID NO: 23), cebador marcado 6FAM™ (SEQ ID NO: 24), y cebador marcado VIC™ (SEQ ID NO: 25), 6FAM y VIC son productos de colorante fluorescente de Applied Biosystems (Foster City, CA) fijados al cebador de ADN.

Las SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 23 cuando se utilizan en estos procedimientos de reacción producen un amplicón de ADN para el algodón no transgénico, dos amplicones de ADN para el algodón heterocigoto que contiene el evento MON 88913, y un amplicón de ADN para el algodón homocigoto de MON 88913 que es distinto de cualquier otro algodón no MON 88913. Los controles para este análisis han de incluir un control positivo del algodón homocigoto y heterocigoto que contiene el ADN del evento MON 88913, un control negativo de algodón no transgénico, y un control negativo que no contiene ningún ADN molde. Este ensayo se optimiza para su uso con un Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700, o termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient. Otros procedimientos y aparatos conocidos por los expertos en la materia que producen amplicones que identifican la zigosidad de la progenie de los cruzamientos realizados con plantas de algodón MON 88913 están dentro de la capacidad de la materia.

Tabla 4. Soluciones de reacción del ensayo de zigosidad

Etapa	Reactivo	Cantidad	Comentarios
1	agua exenta de nucleasa	añadir hasta un volumen final de 10 µl	-
2	2X mezcla maestra universal (Applied Biosystems cat. n.º 4304437)	5 µl	1X concentración final
3	Cebadores SQ1099, SQ1100, SQ1353 (resuspendidos en agua exenta de nucleasa a una concentración de 20 µM)	0,5 µl	0,25 µM de concentración final
4	Cebador 6FAM™ (resuspendido en agua exenta de nucleasa a una concentración de 10 µM)	0,2 µl	0,4 µM de concentración final
5	Cebador VIC™ (resuspendido en agua exenta de nucleasa a una concentración de 10 µM)	0,2 µl	0,15 µM de concentración final
6	ADN polimerasa <i>REDTaq</i> (1 unidad/µl)	1,0 µl (recomendado para cambiar pipetas antes de la siguiente etapa)	1 unidad/reacción
7	ADN extraído (molde) • Muestras a analizar (hojas individuales) • Control negativo • Control negativo • Control positivo • Control positivo	3,0 µl • 4-80 ng de ADN genómico • 4 ng de ADN genómico de algodón no transgénico • Sin ADN molde (solución en la que se volvió a suspender el ADN) • 4 ng de ADN genómico de algodón heterocigoto del evento MON 88913 conocido • 4 ng de ADN genómico de algodón homocigoto del evento MON 88913 conocido	diluido en agua
8	Mezclar suavemente, añadir 1-2 gotas de aceite mineral en la parte superior de cada reacción		

Continuar con la amplificación de ADN en un Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700, o termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient utilizando los siguientes parámetros de ciclación. Cuando se hace funcionar la PCR en Eppendorf Mastercycler Gradient o MJ Engine, el termociclador ha de funcionar en el modo calculado. Cuando se hace funcionar la PCR en Perkin-Elmer 9700, hacer funcionar el termociclador con la velocidad de rampa

fijada al máximo.

Tabla 5. Condiciones del termociclador del ensayo de zigosidad

Ciclo n.º	Ajustes: Stratagene Robocycler
1	94 °C 3 minutos
38	94 °C 1 minuto 60 °C 1 minuto 72 °C 1 minuto y 30 segundos
1	72 °C 10 minutos
Ciclo n.º	Ajustes: MJ Engine o Perkin-Elmer 9700
1	94 °C 3 minutos
38	94 °C 30 segundos 60 °C 30 segundos 72 °C 1 minuto y 30 segundos
1	72 °C 10 minutos
Ciclo n.º	Ajustes: Eppendorf Mastercycler Gradient
1	94 °C 3 minutos
38	94 °C 15 segundos 60 °C 15 segundos 72 °C 1 minuto y 30 segundos
1	72 °C 10 minutos

Ejemplo 7

- 5 El análisis de las muestras de ADN de algodón genómico se llevó a cabo utilizando un procedimiento de valoración Taqman®. La producción de amplicones diagnóstico de ADN genómico de MON 88913 se produjo utilizando un conjunto de cebadores A que incluía los cebadores del evento: SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, y sonda 6-FAM SEQ ID NO: 24; y un conjunto de cebadores B que incluía los cebadores del evento: SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, y sonda 6-FAM SEQ ID NO: 28. El procedimiento utiliza un formato de 96 pocillos o 384 pocillos y un sistema por PCR Applied Biosystems GeneAmp 9700 o MJ Research DNA Engine PT-225. El ADN extraído de las muestras de tejido de algodón, como se ha descrito previamente, debe estar dentro del intervalo de 5-10 ng por reacción de PCR. Cada reacción contiene un volumen final de 10 µl que consiste en 0,5 µl de concentración idéntica de los cebadores del evento (20 µM), 5,0 µl de 2X mezcla maestra universal, 0,2 µl de la sonda 6-FAM (10 µM), 3 µl de la muestra de ADN (5-10 ng) y agua a 10 µl. Los parámetros del ciclador térmico son 1 ciclo a 50 °C durante 2 minutos, 1 ciclo a 95 °C durante 10 minutos, 10 ciclos a 95 °C durante 15 segundos, 64 °C durante 1 minuto después -1 °C/ciclo, 30 ciclos a 95 °C durante 15 segundos, 54 °C durante 1 minuto, después se mantiene a 10 °C. La producción de amplicón se determinó mediante un lector de microplacas, por ejemplo, un TECAN Safire (Durham, NC) utilizando las condiciones descritas por el fabricante. Se utilizó un programa de análisis de datos (TaqPro™) para puntuar la producción del amplicón etiquetado. Otro equipo y procedimientos de análisis conocidos en la materia de detección de ADN pueden utilizarse para detectar los amplicones que se han descrito previamente.

Se ha hecho un depósito de semillas de algodón MON 88913 de Monsanto Technology LLC, desvelado previamente y mencionado en las reivindicaciones, conforme al Tratado de Budapest con la Colección Americana de Cultivos Tipo (CACT), 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110. El número de acceso ante CACT es PTA-4854. El depósito se mantendrá en el depositario durante un periodo de 30 años, o 5 años después de la última petición, o durante la vida efectiva de la patente, optando siempre por el periodo más extenso, y se reemplazará según sea necesario durante ese periodo.

ES 2 618 211 T3

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Monsanto Technology LLC

5 <120> Evento de Algodón MON 88913 y Composiciones y Procedimientos de Detección del Mismo

<130> 102058ep

10 <150> PCT/US04/02907
<151> 02-02-2004

<150> 60/447.184
<151> 12-02-2003

15 <160> 28

<170> PatentIn versión 3.2

20 <210> 1
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> ADN quimérico de ADN genómico de algodón y ADN inserto de transgén

<400> 1
attcaatgta gtcaaacact 20

30 <210> 2
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<223> ADN quimérico de ADN genómico de algodón y ADN inserto de transgén

40 <400> 2
ttgaatatattacaaagc 20

45 <210> 3
<211> 2880
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

50 <220>
<223> ADN quimérico de ADN genómico de algodón y ADN inserto de transgén

<400> 3

gcttgggtacc gagctcggat ccactagtaa cggcgcgcag tgtgctggaa ttgcgccttt 60

tttactacga tgtaagtcc tattttacac agtttcttta agacagattt gaccgctcct 120

acgatacttg gagaaacggt ggtcgaatgt ctcttagaat acaacaacac gatgatcaaa 180

gcagtagcac ctctgtagtg attaacgaac aagcgttgtc tttttctatc accaaaacat 240

ES 2 618 211 T3

tggaaaacat	ggagaggaaa	agagtagaat	tttggaaaga	aaataatott	ggtatgagag	300
agtgagattg	agcaaaaaat	tttgaagagg	tcttagcctt	ttatatgcgt	tcaaagtgga	360
ggaatthttg	aaatatccat	gtataatgag	acaaaaatctg	catttaaaat	ggcatttctgc	420
glogccltgcg	tcgttgcgagl	gcgccccaac	ccgacagggg	ttggacttacc	accctccatcc	480
acgcgaggca	ggattccaag	tttagtcatt	caatcactct	taaagtgagc	tccaagctta	540
gacattacaa	attaaattaa	ataatataag	ataattgcgc	taaataaaca	aacattthttt	600
ttgtgatcct	gaacgtaatc	aacgagggta	tgatgggtat	gattcacgga	aagagcgaga	660
gaagagaacc	gtcgcctcgaa	gaggatgatg	attcactcta	tccatgcacg	actgtccaac	720
tccccacca	atcaaattec	aaattatgac	atgagaagaa	catcatccca	cgtggctctgt	780
gcttcaagcc	accatgtccc	acgtgggctc	cattttgggtg	gggcccctcc	ccaccgccca	840
agctgatccc	gggttggcca	tcctactttt	taattatcag	agccacctcc	ccaatctgca	900
aaacgacgga	aatggaaaac	tataatthtc	ttttttttca	acgtacttat	aaaatathttt	960
tcaaaaaagt	atgaataaaa	ttgtgatatt	gcttggccta	agaggccaat	cttttgcaaa	1020
tctcgaagtc	gggaggcaca	ataaaaactt	ggaaagthttt	tccaagtgtc	tgctttataa	1080
aattattgaa	atgcatgtat	tcgtacttgc	cttatttctc	gacaatttaa	acattattat	1140
ttcatgaaaa	tgtccttcca	ccgatttcaa	tgacaaaacc	aataattact	actthtttatt	1200
ttcaattatg	tcacggttca	catgthttatt	agggtttagg	ttgaggttaa	aactttcgac	1260
tctctattcg	taacgcttaa	agatgtaggg	tttaggttga	ggttaaaaaca	atcatgtaat	1320
gtaaggatac	ctgaaaagct	gtcatttagtg	taagtgttta	ttactagggt	tgthtaaaatt	1380
catgthgatg	tcaagcttgg	ataaccattt	ttactaaaaa	aataaatgaa	gtcccacagg	1440
gcattgggca	tcctatcaaa	gatgggaaat	tttttcaaaa	ttttaacctc	aaaaagaggt	1500
ggaaagtctt	agtccaaata	atcagccaca	tcagaatttg	attcgtttct	tccaagcaaa	1560
ttatacctat	tggctgcaat	atctthtaagt	ggaaaggctc	gccaaaacttt	tccatatcag	1620
cttgattcat	ctctaaactt	gattattctt	ttttatcaat	attaaattcc	acaacttgaa	1680
ctthaattht	thtaattaat	taaaaaaatt	gtcacccttt	caagctgaaa	aagaaaaaga	1740
aaccttaatt	attatcactc	gtattaaatt	tcaaaaacttg	atttctccta	aatttgaaaa	1800
gggtctctct	tcaattcata	tatgtagtca	tgaagattat	aacttagctg	aaaatggcct	1860
ccattatttg	gcttattcaa	tcaaaagtht	acaaaactag	tgcaaattta	atagataaat	1920
gtctacaaga	accaaatacg	aattgagtaa	atthtttttg	ctaaaaataa	ttacgaattg	1980
atgaattatc	atthtaaaaa	gttctthttta	accatttctt	ttactgaatt	aaaaaaaggt	2040

ES 2 618 211 T3

tttattaatc atatatatta caaattaccc attaagtagc caaattacaa attttaattc 2100
 aatgtagtca aacactgata gtttaaacat gactctctta aggtagccaa agcccgggct 2160
 taattaaggc ggcgcggcca agtcggccgc ggccgggtta tcaagcttct gcaggtcctg 2220
 ctcgagtgga agctaattct cagtcacaag cctcaacaag gtcaggggtac agagtctcca 2280
 aaccattagc caaaagctac aggagatcaa tgaagaatct tcaatcaaag taaactactg 2340
 ttccagcaca tgcacatgg tcagtaagtt tcagaaaaag acatccaccg aagacttaaa 2400
 gttagtgggc atctttgaaa gtaatcttgt caacatcgag cagctggctt gtggggacca 2460
 gacaaaaaag gaatggtgca gaattgtag gcgcacctac caaaagcatc tttgccttta 2520
 ttgcaaagat aaagcagatt cctctagtag aagtggggaa caaataacg tggaaaagag 2580
 ctgtcctgac agcccactca ctaatgctga tgacgaacgc agtgacgacc acaaaagaat 2640
 tagcttgagc tcaggattta gcagcattcc agattggggt caatcaacaa ggtacgagcc 2700
 atatcacttt attcaaattg gtatcgccaa aaccaagaag gaactcccat cctcaaaggt 2760
 ttgtaaggaa gaattcgata tcaagcttga tateggaagt ttctctcttg agggaggttg 2820
 ctctggaat gggacacata tggttgttat aataaacat ttccattgtc atgagatttt 2880

<210> 4
 <211> 1675
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> ADN quimérico de ADN genómico de algodón y ADN inserto de transgén

10

<400> 4

ES 2 618 211 T3

tgaccgaagt taatatgagg agtaaaacac ttgtagttgt accattatgc ttattcacta 60
 ggcaacaaat atattttcag acctagaaaa gctgcaaag ttactgaata caagtatgtc 120
 ctcttggtgt ttagacattt atgaactttc ctttatgtaa tttccagaa tccttgtagc 180
 attctaatac ttgctttata attatagtta tactcatgga tttgtagttg agtatgaaaa 240
 tattttttta tgcattttat gacttgccaa ttgattgaca acatgcatca atcgacctgc 300
 agccactoga gtggaggcct catctaagcc cccatttggg cgtgaatgta gacacgtoga 360
 aataaagatt tccgaattag aataatttgt ttattgcttt cgcctataaa tacgacggat 420
 cgtaatttgt cgttttatca aaatgtactt tcattttata ataacgtgtc ggacatctac 480
 atttttgaat tgaaaaaaaa ttggtaatta ctctttcttt ttctccatat tgaccatcat 540
 actcattgct gatccatgta gatttccggg acatgaagcc atttacaatt gaatatatat 600
 taaaaagcta tttgcttata acatatgoga aaaattttgt actataatac ggggtaaatt 660
 taggaggggg cttgtaggtc tcgcttctct taaaatgaaa aattttctat ttagttattt 720
 aaaattttta aagtaaaata taaaaatttc atttaactct ttaaaaatta taaagatata 780
 gactattnaa atgatgaaat tacaatttta ttatcataaa aattataatt taatttcgac 840
 ccctaacaaa attttctgat tttgccccta actgtaatat ttgtataaaa acattttctt 900
 tttgcattta atgatttctt taattcagtc caagaaagaa atttattaat tgcataatgcg 960
 aaagttagtc cttgcctagt gatattaaag gaaagaaaca taaaatcaat aaattaattt 1020
 ttaaagcaaa tagtaaaaat aaggaaaaac tttctacgat agtctataat tcaaaaaaag 1080
 aaataataat cttaaccat tgaattttta aataacatca gaataatcta tttatttaatt 1140
 ttaataaata ataataacat atatattaat attaaaattt ttattgagct tagtgtcaca 1200
 aatcaataaa aaatttctta caaaataaat tatattattt tgagggtgtt ttattatttt 1260
 atatatttta tacagacata tagaaatata aatacacata ataaaatttg aatccaaatt 1320
 ttttaatttt aacatttata atttactatt caacaaaaat tttatttatt atttatatca 1380
 aatttttata aatatattta tcagataatg cgattttttt tacctatata tagatgacat 1440
 aatctacttt aaattaagtc ctaaaaaataa tatatcatac caaaaaaatt cttaaaatga 1500
 atctgataat acttaacccc ttttataaaa caatcttaac cccttatata ttttaatttt 1560
 aatatcatta taaatataaa tctattgagc atatgtttta aaccaagtaa tgttgagtagc 1620
 ggtagtaaaa ctcttacac attttaagta gaacgtagtt cgaaccttgg agaag 1675

<210> 5
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Virus de mosaico Figwort

ES 2 618 211 T3

<400> 5
 ccactaactt taagtcttcg gtggatgtc 29

5 <210> 6
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Virus de mosaico Figwort

10 <400> 6
 ctgaaactta ctgaccatga tgcattgtg 28

15 <210> 7
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> *Pisum sativum*

20 <400> 7
 catttggacg tgaatgtaca cacgtc 26

25 <210> 8
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Pisum sativum*

30 <400> 8
 gttgtcgaaa ccgatgatac g 21

35 <210> 9
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> *Arabidopsis thaliana*

40 <400> 9
 tctgcaatca aaaacataaa gatctga 27

45 <210> 10
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> *Pisum sativum*

50 <400> 10
 cctataaata cgacggatcg taatttgcg 30

55 <210> 11
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Pisum sativum*

60 <400> 11
 accgatgata cgaacgaaag c 21

65 <210> 12
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> *Arabidopsis thaliana*

70 <400> 12
 aatcgtaatc gagatccaac acaag 25

75 <210> 13
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> *Pisum sativum*

80 <400> 13
 ccatattgac catcatactc attgctgatc c 31

<210> 14
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> *Agrobacterium tumefaciens*
 5
 <400> 14
 ttttactacg atgtaagtc ctatatt 27
 <210> 15
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Agrobacterium tumefaciens*
 10
 <400> 15
 gaccagagga cttacgagca g 21
 <210> 16
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> *Agrobacterium tumefaciens*
 20
 <400> 16
 gattccgaat tcaagcttca tggg 24
 <210> 17
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> *Agrobacterium tumefaciens*
 25
 <400> 17
 ctaagatcga actctccgac actaagg 27
 <210> 18
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> *Arabidopsis thaliana*
 35
 <400> 18
 gtctactgtt ttattgatt caatattga ttg 33
 <210> 19
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> *Agrobacterium tumefaciens*
 40
 <400> 19
 gcagctgtcg ctaccacct cg 22
 <210> 20
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> *Arabidopsis thaliana*
 45
 <400> 20
 ggttttctcg atcaagattc agatc 25
 <210> 21
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> *Gossypium hirsutum*
 60
 <400> 21
 aattacccat taagtagcca aattacaaa 29
 <210> 22
 <211> 24

ES 2 618 211 T3

<212> ADN
 <213> Virus de mosaico Figwort

5 <400> 22
 gggccttggc taccttaaga gagt 24

10 <210> 23
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> *Gossypium hirsutum*

15 <400> 23
 cgcatatggt ataagcaaat agcttg 27

20 <210> 24
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Sonda de ADN marcada para PCR

30 <400> 24
 caatgtagtc aaacact 17

35 <210> 25
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Sonda de ADN marcada para PCR

45 <400> 25
 agtgtacata tagggaatat 20

50 <210> 26
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Cebador de ADN para PCR

60 <400> 26
 ggacatgaag ccattacaa ttga 24

65 <210> 27
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

70 <220>
 <223> Cebador de ADN para PCR

75 <400> 27
 cctacaagcc ccctcctaaa ttt 23

80 <210> 28
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

85 <220>
 <223> Sonda de ADN para PCR

ES 2 618 211 T3

<400> 28
agctatttgc ttataacata tgc 23

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ADN que comprende:

- 5 (a) una construcción que comprende un primer casete de expresión que comprende el promotor del virus de mosaico Figwort construido como un elemento promotor quimérico con el promotor (At.Ef1 α) de factor de elongación 1-alfa de *Arabidopsis* (FMV35S/Ef1 α), operativamente unido a la secuencia líder de traducción y al intrón del factor de elongación 1-alfa de *Arabidopsis*, operativamente unido al péptido de tránsito al cloroplasto de EPSPS de *Arabidopsis*, operativamente unido a 5-enol-piruvil-shikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) tolerante al glifosato procedente de la cepa CP4 de *Agrobacterium sp.*, operativamente unido a la región de terminación 3' de ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa E9 de guisante, y un segundo casete de expresión que comprende el promotor CaMV35S-Act8 que incluye el primer intrón del gen Act8, operativamente conectado a un péptido de tránsito al cloroplasto de EPSPS de *Arabidopsis*, operativamente conectado a 5-enol-piruvil-shikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) tolerante al glifosato procedente de la cepa CP4 de *Agrobacterium sp.*, operativamente unido a la región de terminación 3' de ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa E9 de guisante y
- 10 (b) la secuencia de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.

15

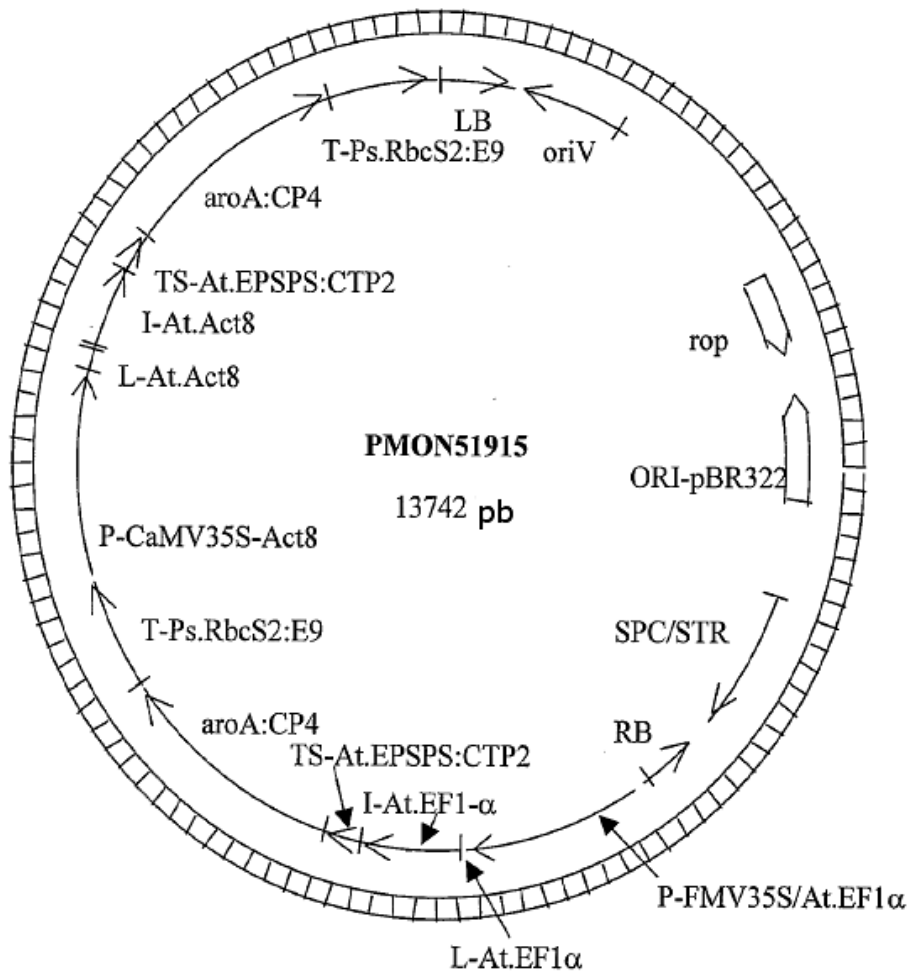


FIGURA 1

MON88913

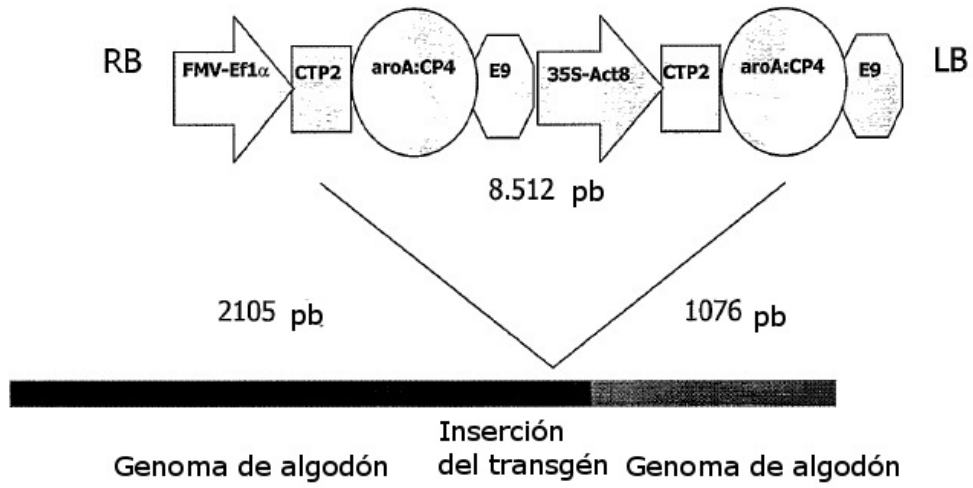


FIGURA 2

SEQ ID NO:1 secuencia de unión al ADN 5'
ATTCAATGTA/GTCAAACACT

SEQ ID NO:2 secuencia de unión al ADN 3'
TTGAATATAT/ATTACAAAGC

FIGURA 3

```

1 GCTTGGTACC GAGCTCGGAT CCACTAGTAA CGGCCGCCAG TGTGCTGGAA TTCGCCCTTT
61 TTTACTACGA TGTTAAGTCC TATTTTACAC AGTTTCTTTA AGACAGATT GACCGCTCCT
121 ACGATACTTG GAGAAACGTT GGTGCGAATGT CTCTTAGAAT ACAACAACAC GATGATCAAA
181 GCAGTAGCAC CTCTGTAGTG ATTAACGAAC AAGCGTTGTC TTTTCTATC ACCAAAAACAT
241 TGGAAAACAT GGAGAGGAAA AGAGTAGAAT TTTGGAAAGA AAATAATCTT GGTATGAGAG
301 AGTGAGATTG AGCAAAAAAT TTTGAAGAGG TCTTAGCCTT TTATATGCGT TCAAAGTGGGA
361 GGAATTTTGG AAATATCCAT GTATAATGAG ACAAATCTG CATTAAAAAT GGCATTTTCG
421 GTCGCCTGCG TCGTGCAGAGT GCGCCCCAAC CCTGACGGGT TTGGACTTAC ACCCTCATAC
481 ACGCGAGGCA GGATTCCAAG TTTAGTCATT CAATCACTCT TAAAGTGAGC TTCAAGCTTA
541 GACATTACAA ATTAATTAATA ATAATAAAG ATAATTGCGC TAAATAAACA AACATTTTTT
601 TTGTGATCCT GAACGTAATC AACGAGGGTA TGATGGTTAT GATTCACGGA AAGAGCGAGA
661 GAAGAGAACC GTCGCTCGAA GAGGATGATG ATTCATCCTA TTCATGCACG ACTGTCCAAC
721 TCCCACCCA ATCAAATTC AAATTATGAC ATGAGAAGAA CATCATCCA CGTGGTCTGT
781 GCTTCACGCC ACCATGTCCC ACGTGGGCTC CATTTTGGTG GGGCCCTTCC CCACCGCCA
841 AGCTGATCCC GGGTTGGCCA TCCCTACTTT TAATTATCAG AGCCACCTCC CCAATCTGCA
901 AAACGACGGA AATGGAAAAC TATAATTTTC TTTTTTTTCA ACGTACTTAT AAAATATTTT
961 TCAAAAAAGT ATGAATAAAA TTGTGATATT GCTTGGCCTA AGAGGCCAAT CTTTTGCAAA
1021 TCTCGAAGTC GGGAGGCACA ATAAAACTT GGAAAGTTT TCAAGTGTG TGCTTTATAA
1081 AATATTGAA ATGCAATGTAT TCGTACTTGC CTTATTTATC GACAATTTAA ACATTATTAT
1141 TTCATGAAAA TGTCCTTCCA CCGATTTCAA TGACAAAACC AATAATTACT ACTTTTTTAT
1201 TTCAATTATG TCACGGTTCA CATGTTTATT AGGGTTTAGG TTGAGGTTAA AACTTTTCGAC
1261 TCTCTATTG TAACGCTTAA AGATGTAGGG TTTAGGTTGA GGTAAAAACA ATCATGTAAT
1321 GTAAGGATAC CTGAAAAGCT GTCATTAGTG TAAGTGTTA TTAGTAGGGT TGTTTAAATT
1381 CATGTTGATG TCAAGCTTGG ATAACCATT TTACTAAAAA AATAAATGAA GTCCCAAAGG
1441 GCATTGGGCA TCCTATCAAA GATGGGAAAT TTTTCAAAA TTTTAACCTA AAAAAGAGGT
1501 GGAAAGCTTT AGTCCAAATA ATCAGCCACA TCAGAAATFG ATTCGTTTCT TTCAAGCAA
1561 TTATACCTAT TGGCTGCAAT ATCTTTAAGT GGAATGGTCG GCCAAACTTT TCCATATCAG
1621 CTTGATTCAT CTCTAAACTT GATTATTCTT TTTTATTAAT ATTAATTC ACAACTTGAA
1681 CTTTAATTTT TTTAATTAAT TAAAAAATT GTCACCTTT CAAGCTGAAA AAGAAAAAGA
1741 AACCTTAATT ATTATCACTA GTATTAATTT TCAAAACTTG ATTTGTCCTA AATTTGAAAA
1801 GGGTCTCCT TCAATTCATA TATGTAGTCA TGAAGATTAT AACTTAGCTG AAAATGGCCT
1861 CCATTTTTG GCTTATTCAA TCAAAAGTTT ACAAACCTAG TGCAAATTTA ATATGATAAT
1921 GTCTACAAGA ACCAAATACG AATTGAGTAA ATTTTTTTGG CTAAAATAAA TTACGAATTG
1981 ATGAATTATC ATTTTAAAAA GTTCTTTTIA ACCATTTCTT TTAGTGAAT AAAAAAAGGT
2041 TTTTATTAATC ATATATATTA CAAATTACCC ATTAAGTAGC CAAATTACAA ATTTTAATTC
2101 AATGTAGTCA AACACTGATA GTTTAAACAT GACTCTCTTA AGGTAGCCAA AGCCCGGGCT
2161 TAATTAAGGC GCGCCGGCCA AGTCGGCCGC GGCCCGTTA TCAAGCTTCT GCAGGTCTTG
2221 CTCGAGTGGG AGCTAATTCT CAGTCCAAAG CCTCAACAAG GTCAGGGTAC AGAGTCTCCA
2281 AACCATTAGC CAAAAGCTAC AGGAGATCAA TGAAGAATCT TCAATCAAAG TAACTACTG
2341 TTCCAGCACA TGCATCATGG TCAGTAAGTT TCAGAAAAAG ACATCCACCG AAGACTTAAA
2401 GTTAGTGGGC ATCTTTGAAA GTAATCTTGT CAACATCGAG CAGCTGGCTT GTGGGGACCA
2461 GACAAAAAAG GAATGGTGCA GAATTGTTAG GCGCACCTAC CAAAAGCAT TTTGCCTTTA
2521 TTGCAAAGAT AAAGCAGATT CCTCTAGTAC AAGTGGGGAA CAAAATAACG TGGAAAAGAG
2581 CTGTCCTGAC AGCCCACTCA CTAATGCGTA TGACGAACGC AGTGACGACC ACAAAGAAAT
2641 TAGCTTGAGC TCAGGATTTA GCAGATTCC AGATTGGGTT CAATCAACAA GGTACGAGCC
2701 ATATCACTTT ATTCABATTG GTATCGCCAA AACCAAGAAG GAACTCCCAT CCTCAAAGGT
2761 TTGTAAGGAA GAATTCGATA TCAAGCTTGA TATCGGAAGT TTCTCTCTTG AGGGAGGTTG
2821 CTCGTGGAAT GGGACACATA TGTTGTTAT AATAAACCAT TTCCATTGTC ATGAGATTTT

```

FIGURA 4

1 TGACCGAAGT TAATATGAGG AGTAAAAACAC TTGTAGTTGT ACCATTATGC TTATTCACATA
 61 GGCAACAAAT ATATTTTCAG ACCTAGAAAA GCTGCAAATG TTAAGTAATA CAAGTATGTC
 121 CTCTTGTGTT TTAGACATTT ATGAACTTTC CTTTATGTAA TTTTCCAGAA TCCTTGTGAG
 181 ATTCTAATCA TTGCTTTATA ATTATAGTTA TACTCATGGA TTTGTAGTTG AGPATGAAAA
 241 TATTTTTTAA TGCATTTTAT GACTTGCCAA TTGATTGACA ACATGCATCA ATCGACCTGC
 301 AGCCACTCGA GTGGAGGCCCT CATCTAAGCC CCCATTTGGA CGTGAATGTA GACACGTCGA
 361 AATAAAGATT TCCGAATTAG AATAATTTGT TTATTGCTTT CGCCTATAAA TACGACGGAT
 421 CGTAATTTGT CGTTTTATCA AAATGTAATT TCATTTTATA ATAACGCTGC GGACATCTAC
 481 ATTTTTGAAT TGAAAAAAA TTGGTAATTA CTCTTTCTTT TTCTCCATAT TGACCATCAT
 541 ACTCATTGCT GATCCATGTA GATTCCCGG ACATGAAGCC ATTTACAATT GAATATATAT
 601 TACAAAGCTA TTTGCTTATA ACATATGCCA AAAATTTTGT ACTATAATCA GGGGTAAATT
 661 TAGGAGGGGG CTTGTAGGTC TCGCTTCTCT TAAAATGAAA AATTTTCTAT TTAGTTATTT
 721 AAAATTTTAA AAGTAAAATA TAAAATTTT ATTAAATCCT TTAAAAATTA TAAAGATATA
 781 GACTATTTAA ATGATGAAAT TACAATTTTA TTATCATAAA AATTATAAAT TAATTTTCGAC
 841 CCCTAACAAA ATTTTCTGAT TTTGCCCTA ACTGTAATAT TTGTATAAAA ACATTTTCTT
 901 TTTGCATTTA ATGATTTCTT TAATTCAGTC CAAGAAAGAA ATTTATTAAT TGCATATGCG
 961 AAAGTTAGTC CTTGCCTAGT GATATTAAG GAAAGAAACA TAAAATCAAT AAATTAATTT
 1021 TTAAAGCAA TAGTAAAAAT AAGCAAAAAC TTTCTACGAT AGTCTATAAT TCAAAAAAAG
 1081 AAATAATAAT CTTTAACCAT TGAATTTTAA AATAACATCA GAATAATCTA TTTATTTAAT
 1141 TTAATAAATA ATAATAACAT ATATATTAAT ATTAAAATTT TTATTGAGCT TAGTGTGACA
 1201 AATCAATAAA AAATTTCTTA CAAAATAAAT TATATTATTT TGAGGGTGTG TTATTATTTT
 1261 ATATATTTTA TACAGACATA TAGAAATATA AATACACATA ATAAAAATTG AATCCAAATT
 1321 TTTAATTTTT AACATTTATA ATTTACTATT CAACCAAAAT TTTATTTTAT ATTTATATCA
 1381 AATTTTTTATA AATATATTTA TCAGATAATG CGATTTTTTT TACCTATATA TAGATGACAT
 1441 AATCTACTTT AAATTAAGTC CTAAAAATA TATATCATA CAAAAAATT CTTAAAAATGA
 1501 ATCTGATAAT ACTTAACCCC TTTTATAAAA CAATCTTAAC CCCTTATATA TTTTAAATAT
 1561 AATATCATT TAAATATAAA TCTATTGAGC ATATGTTTTA AACCAAGTAA TGTTGAGTGC
 1621 GGTAGTAAA CTCATTACAC ATTTTAAGTA GAACGTAGTT CGAACCTTGG AGAAG

FIGURA 5