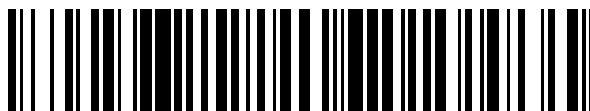


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 719 599**

51 Int. Cl.:

C12N 9/02 (2006.01)

C12Q 1/6895 (2008.01)

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/10 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.08.2010 PCT/US2010/045869**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.02.2011 WO11022469**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.08.2010 E 10810537 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2018 EP 2467010**

54 Título: **Evento DAS-40278-9 que incorpora add-1, líneas transgénicas de maíz relacionadas e identificación evento-específico de las mismas**

30 Prioridad:

19.08.2009 US 235248 P

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

11.07.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**CUI, YUNXING CORY;
BRYAN, JILL;
MAUM, DONALD;
GILLES, GREG;
WRIGHT, TERRY;
HAMILTON, JENNIFER;
ARNOLD, NICOLE;
VANOPDORP, NATHAN;
KAISER, TINA y
ZHOU, NING**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 719 599 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 DAS-40278-9 que incorpora *add-1*, líneas transgénicas de maíz relacionadas e identificación evento-específico de las mismas

5 **Antecedentes de la invención**

El gen *aad-1* (originariamente de *Sphingobium herbicidovorans*) codifica la proteína ariloxialcanoato dioxigenasa (AAD-1). El rasgo confiere tolerancia al ácido 2,4-diclorofenoxiacético y ariloxifenoxipropionato (comúnmente conocidos como herbicidas "fop" tal como el quizalofop) y se puede utilizar como un marcador seleccionable durante la transformación de plantas y en viveros de mejoramiento genético. El gen *aad-1*, en sí mismo, se describió por primera vez para la tolerancia a herbicidas en plantas en el documento WO 2005/107437 (véase también el documento de patente US 2009-0093366).

La expresión de genes foráneos o heterólogos en plantas está influenciada por donde se inserta el gen foráneo en el cromosoma. Esto podría deberse a la estructura de la cromatina (p. ej., heterocromatina) o la proximidad de elementos de regulación transcripcional (p. ej., potenciadores) cerca del sitio de integración (Weising *et al.*, *Ann. Rev. Genet.* 22:421-477, 1988), por ejemplo. El mismo gen en el mismo tipo de planta transgénica (u otro organismo) puede exhibir una amplia variación en el nivel de expresión entre diferentes 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 diversos tejidos de plantas pueden no corresponder a los patrones esperados de los elementos reguladores de la transcripción presentes en la construcción de gen introducido.

Por lo tanto, a menudo se crean y seleccionan grandes cantidades de eventos para identificar un evento que exprese un gen introducido de interés a un nivel satisfactorio para un propósito determinado. Para fines comerciales, es común producir de cientos a miles de eventos diferentes y seleccionar esos eventos para un evento único que tenga niveles y patrones de expresión transgénica deseados. Un evento que tiene niveles y/o patrones deseados de expresión transgénica es útil para la introgresión del transgén en otros orígenes genéticos por medio del exocruzamiento sexual utilizando métodos de mejoramiento genético convencionales. La progenie de tales cruces mantiene los rasgos de la expresión transgénica del transformante original. Esta estrategia se utiliza para garantizar una expresión génica fiable en un número de variedades que están bien adaptadas a las condiciones de crecimiento locales.

Las solicitudes de patentes de EE.UU. 20020120964 A1 y 20040009504 A1 se refieren al evento de algodón PV-GHGT07(1445) y a las composiciones y métodos para la detección del mismo. El documento WO 02/100163 se refiere al evento de algodón MONI5985 y a las composiciones y métodos para la detección del mismo. El documento WO 2004/011601 se refiere a plantas y composiciones para el evento de maíz MON863 y métodos para la detección del mismo. El documento WO 2004/072235 se refiere al evento de algodón MON 88913 y a las composiciones y métodos para la detección del mismo.

El documento WO 2006/098952 se refiere al evento de maíz 3272. El documento WO 2007/142840 se refiere al evento de maíz MIR162.

La patente de EE.UU. n° 7179965 se refiere al algodón que tiene un evento cry1F y un evento cry1Ac.

El maíz que incorpora AAD-1 que tiene el evento específico descrito en la presente memoria no se ha descrito previamente.

Breve resumen de la invención

La presente invención se refiere al evento de maíz designado DAS-40278-9 que incorpora AAD-1 que tiene semillas depositadas en la American Type Culture Collection (ATCC) con número de acceso PTA-10244, y la progenie derivada del mismo. Otros aspectos de la invención comprenden la progenie de plantas, semillas y granos o partes regenerables de las plantas y semillas y progenie del evento de maíz DAS-40278-9, así como productos alimenticios o piensos hechos de cualquiera de ellos. La invención también incluye partes de planta del evento de maíz DAS-40278-9 que incluyen, pero no se limitan a, polen, óvulo, flores, brotes, raíces y hojas, y núcleos de células vegetativas, células de polen y células de huevo. La invención se refiere además a plantas de maíz que tienen tolerancia a los herbicidas fenoxi auxínicos y/o ariloxialcanoato, nuevas composiciones genéticas del evento de maíz DAS-40278-9, y aspectos del rendimiento agronómico de plantas de maíz que comprenden el evento de maíz DAS-40278-9. Estas plantas, partes, semillas, grano y progenie tienen un genoma que comprende la SEQ ID NO:29.

Esta invención se refiere en parte a plantas tolerantes a herbicidas. Esta invención incluye un nuevo evento de transformación en plantas de maíz que incorpora *aad-1* que comprende una secuencia de polinucleótidos según la SEQ ID NO:29 dentro del genoma de una célula de maíz.

En algunas realizaciones, dicho evento/secuencia de polinucleótidos puede estar "apilado" con otros rasgos, que incluyen, por ejemplo, otro gen u otros genes con tolerancia a herbicidas y/o proteínas inhibitoras de insectos. Sin embargo, la presente invención incluye plantas que tienen un único evento, como se describe en la presente memoria.

Los rasgos adicionales pueden estar apilados en el genoma de la planta a través de mejora vegetal, retransformación de la planta transgénica que contiene el evento de maíz DAS-40278-9, o la adición de nuevos rasgos a través de la integración dirigida mediante la recombinación homóloga.

- 5 Otras realizaciones incluyen la escisión de secuencias polinucleotídicas que comprenden el evento de maíz DAS-40278-9, que incluye, por ejemplo, el casete de expresión del gen *pat*. Tras la escisión de una secuencia de polinucleótidos, el evento modificado se puede redirigir al sitio cromosómico específico en donde las secuencias de polinucleótidos adicionales están apiladas con el evento de maíz DAS-40278-9. La presente invención abarca un sitio diana en el cromosoma de maíz que comprende una localización definida en o por la SEQ ID NO:29 y los restos de la misma como se describe en la presente memoria, como reconocerá un experto en la técnica.

Además, la presente invención proporciona ensayos para detectar la presencia del evento objeto en una muestra (por ejemplo, de grano de maíz). Los ensayos pueden estar basados en la secuencia de ADN de la construcción recombinante, insertada en el genoma del maíz, y en las secuencias genómicas que flanquean el sitio de inserción. También se proporcionan kits y condiciones útiles para realizar los ensayos.

- 15 Por lo tanto, la presente invención se relaciona en parte con la clonación y el análisis de las secuencias de ADN de un inserto de *AAD-1* completo y de las regiones de borde de las mismas (en líneas de maíz transgénicas). Estas secuencias son únicas. En base a estas secuencias de inserción y borde, se generaron cebadores específicos de evento. El análisis de PCR demostró que estos eventos se pueden identificar mediante el análisis de los amplicones de PCR generados con estos conjuntos de cebadores específicos de eventos. Por lo tanto, estos y otros procedimientos relacionados se pueden utilizar para identificar de forma única líneas de maíz que comprenden el evento de la presente invención.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra un mapa de plásmido pDAS1740.

La Figura 2 muestra los componentes del inserto para DAS-40278-9 (pDAS1740).

- 25 La Figura 3 muestra un mapa de restricción y componentes del inserto para DAS-40278-9 (pDAS1740).

La Figura 4 muestra los amplicones, cebadores y una estrategia de clonación para el inserto de ADN y los bordes para DAS-40278-9.

La Figura 5 ilustra las localizaciones de los cebadores con respecto al inserto y los bordes para DAS-40278-9.

La Figura 6 ilustra las regiones de unión y la inserción para DAS-40278-9.

- 30 La Figura 7 es un diagrama de mejoramiento genético referenciado en el Ejemplo 7.

Breve descripción de las secuencias

Las SEQ ID NO:1-28 son cebadores como se describe en la presente memoria.

La SEQ ID NO:29 proporciona secuencias de inserción y flanqueantes para el evento DAS-40278-9.

Las SEQ ID NO:30-33 son cebadores para marcadores flanqueantes como se describe en el Ejemplo 4.

- 35 **Descripción detallada de la invención**

Esta invención se refiere en parte a plantas tolerantes a herbicidas. Esta invención incluye nuevos eventos de transformación de plantas de maíz (maíz) que comprenden unas secuencias de polinucleótidos de *aad-1* objeto, como se describe en la presente memoria, insertadas en un sitio específico dentro del genoma de una célula de maíz. En algunas realizaciones, dicha secuencia de polinucleótidos puede estar "apilada" con otros rasgos (tal como otro gen o genes de tolerancia a herbicidas y/o gen o genes que codifican proteínas inhibidoras de insectos, por ejemplo). En algunas realizaciones, dichas secuencias de polinucleótidos se pueden escindir y posteriormente redirigir con secuencias de polinucleótidos adicionales. Sin embargo, la presente invención incluye plantas que tienen un único evento, como se describe en la presente memoria.

- 45 Además, la presente invención proporciona ensayos para detectar la presencia del evento objeto en una muestra. Los aspectos de la presente invención incluyen el uso de moléculas de ácido nucleico de diagnóstico ejemplificadas o sugeridas en la presente memoria, particularmente aquellas basadas total o parcialmente en las secuencias flanqueantes objeto.

Más específicamente, la presente invención se relaciona en parte con el evento de maíz DAS-40278-9 transgénico (también conocido como pDAS1740-278), las líneas de plantas que comprenden estos eventos, y la clonación y análisis de las secuencias de ADN de este inserto, y/o las regiones de borde de las mismas. Las líneas de plantas de la presente invención se pueden detectar utilizando las secuencias descritas y sugeridas en la presente memoria.

- 50

En algunas realizaciones, esta invención se refiere a líneas de maíz tolerantes a herbicidas, y a la identificación de las mismas. La presente invención se refiere en parte a la detección de la presencia del evento objeto para determinar si la progenie de un cruzamiento sexual contiene el evento de interés. Además, se incluye un método para detectar el evento y es útil, por ejemplo, para cumplir con las regulaciones que requieren la aprobación previa al mercado y el etiquetado de alimentos obtenidos a partir de plantas de cultivos recombinantes, por ejemplo. Es posible detectar la presencia del evento objeto mediante cualquier método de detección de ácido nucleico bien conocido, tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o la hibridación de ADN que utilizan sondas de ácidos nucleicos. Un ensayo de PCR específico de evento se discute, por ejemplo, por Windels *et al.* (Med. Fac. Landbouww, Univ. Gent 64/5b:459462, 1999). Esto se relacionó con la identificación del evento de soja 40-3-2 tolerante al glifosato mediante PCR utilizando un conjunto de cebadores que abarca la unión entre el inserto y el ADN flanqueante. Más específicamente, un primer cebador incluyó una secuencia del inserto y un segundo cebador incluyó una secuencia del ADN flanqueante.

El maíz se modificó mediante la inserción del gen *aad-1* de *Sphingobium herbicidovorans* que codifica la proteína ariloxialcanoato dioxigenasa (AAD-1). El rasgo confiere tolerancia al ácido 2,4-diclorofenoxiacético y ariloxifenoxipropionato (comúnmente conocidos como herbicidas "fop" tal como el quizalofop) y se puede utilizar como un marcador seleccionable durante la transformación de las plantas y en viveros de mejoramiento genético. La transformación del maíz con un fragmento de ADN del plásmido pDAS1740 se llevó a cabo, a través de mejoramiento genético, para producir el evento DAS-40278-9.

Las muestras de ADN genómico extraídas de veinte plantas de maíz individuales obtenidas a partir de cinco generaciones y cuatro plantas por generación del evento DAS-40278-9 se seleccionaron para la caracterización molecular del evento de maíz DAS-40278-9 que incorpora ADD-1. La expresión de la proteína AAD-1 se sometió a ensayo utilizando un kit de tiras reactivas rápidas específicas para AAD-1. Sólo las plantas que dieron positivo para la expresión de la proteína AAD-1 se seleccionaron para la posterior caracterización molecular. La hibridación Southern confirmó que el gen *aad-1* está presente en las plantas de maíz que dieron positivo para la expresión de proteína AAD-1, y el gen *aad-1* se insertó como una única copia intacta en estas plantas cuando se hibridó con una sonda del gen *aad-1*.

La caracterización molecular del ADN insertado en el evento de maíz DAS-40278-9 que incorpora ADD-1 también se describe en la presente memoria. El evento se produjo a través de la transformación de Whiskers con el fragmento *Fsp I* del plásmido pDAS1740. Se utilizó el análisis de transferencia Southern para establecer el patrón de integración del fragmento de ADN insertado y determinar el número de copia/inserto del gen *aad-1* en el evento DAS-40278-9. Se generaron datos para demostrar la integración e integridad del transgén *aad-1* insertado en el genoma del maíz. Se evaluó la caracterización de la integración de regiones no codificantes (diseñadas para regular las regiones codificantes), tales como promotores y terminadores, las regiones de unión a la matriz RB7 Mar v3 y RB7 Mar v4, así como la estabilidad del inserto transgénico a través de generaciones. La estabilidad del ADN insertado se demostró en cinco generaciones distintas de plantas. Además, se demostró la ausencia de secuencia de la cadena principal del plásmido de transformación que incluye la región del gen de resistencia a la ampicilina (*Ap^r*) mediante sondas que cubren casi toda la región de la cadena principal que flanquea los sitios de restricción (*Fsp I*) del plásmido pDAS1740. Se dibujó un mapa físico detallado de la inserción en base a estos análisis de transferencia Southern del evento DAS-40278-9.

Los niveles de proteína AAD-1 se determinaron en tejidos de maíz. Además, se realizó un análisis de composición en forraje y grano de maíz para investigar la equivalencia entre la línea de maíz isogénica no transformada y la línea de maíz transgénica DAS-40278-9 (no rociada, rociada con 2,4-D, rociada con quizalofop, y rociada con 2,4-D y quizalofop). Las características agronómicas de la línea de maíz isogénica no transformada también se compararon con el maíz DAS-40278-9.

La expresión de campo, la composición de nutrientes y los ensayos agronómicos de un control no transgénico y una línea de maíz híbrida que contiene ariloxialcanoato dioxigenasa-1 (AAD-1) se realizaron en el mismo año en seis sitios ubicados en Iowa, Illinois (2 sitios), Indiana, Nebraska y Ontario, Canadá. Los niveles de expresión se resumen en la presente memoria para la proteína AAD-1 en hojas, polen, raíz, forraje, planta entera y grano, los resultados de determinaciones agronómicas y el análisis de composición de muestras de forraje y grano del maíz control y del maíz DAS-40278-9 que incorpora AAD-1.

La proteína AAD-1 soluble y extraíble se midió utilizando un método de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) cuantitativo en hojas de maíz, polen, raíz, forraje, planta completa y grano. Se observaron buenos valores de expresión promedio en el tejido de la raíz y el polen, como se explica con más detalle en la presente memoria. Los valores de expresión fueron similares para todos los tratamientos rociados, así como para las parcelas rociadas y no rociadas con herbicidas 2,4-D y quizalofop.

Para investigar la equivalencia de maíz DAS-40278-9 que incorpora AAD-1 (con o sin tratamientos con herbicidas) con el control, se llevaron a cabo análisis de composición, incluyendo composiciones proximales, minerales, aminoácidos, ácidos grasos, vitaminas, antinutrientes y metabolitos secundarios. Los resultados para las muestras de composición de DAS-40278-9 que incorpora AAD-1 fueron todos tan buenos o mejores que (biológicamente y agronómicamente), los basados en líneas de control y/o de maíz convencional, los análisis de datos agronómicos

recopilados de gráficas de control y de maíz DAS-40278-9 que incorpora ADD-1.

Como se mencionó anteriormente en la sección de antecedentes, la introducción e integración de un transgén en el genoma de una planta involucra algunos eventos aleatorios (de ahí el nombre de "evento" para una inserción dada que se expresa). Es decir, con muchas técnicas de transformación tal como la transformación de *Agrobacterium*, la "pistola génica" y WHISKERS, es impredecible en qué parte del genoma se insertará un transgén. Por lo tanto, identificar el ADN genómico de la planta flanqueante en ambos lados del inserto puede ser importante para identificar una planta que tenga un evento de inserción dado. Por ejemplo, se pueden diseñar cebadores de PCR que generen un amplicón de PCR a través de la región de unión del inserto y del genoma del hospedador. Este amplicón de PCR se puede utilizar para identificar un tipo único o distinto de evento de inserción.

Como los "eventos" son originalmente eventos aleatorios, como parte de esta descripción, al menos 2500 semillas de una línea de maíz que comprende el evento han sido depositadas y puestas a disposición del público sin restricciones (pero sujetas a derechos de patente), con la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA, 20110. El depósito ha sido designado como depósito ATCC n° PTA-10244 (semilla híbrida de maíz Yellow Dent (Zea Mays L)):DAS-40278-9; Depositado en nombre de Dow AgroSciences LLC; Fecha de recepción de las semillas/cepa o cepas por el ATCC: 10 de julio de 2009; viabilidad confirmada el 17 de agosto de 2009). Este depósito se realizó y se mantendrá de acuerdo con y bajo los términos del Tratado de Budapest con respecto a los depósitos de semillas para los fines del procedimiento de patente. El depósito se mantendrá sin restricciones en el depósito de ATCC, que es un depósito público, durante un período de 30 años, o cinco años después de la solicitud más reciente, o durante la vigencia de la patente, lo que sea más largo, y será reemplazado si se vuelve no viable durante ese período.

Las semillas depositadas de evento DAS-40278-9 son parte de la presente invención. Claramente, las plantas de maíz se pueden cultivar a partir de estas semillas, y tales plantas son parte de la presente invención. La presente invención también se refiere a un polinucleótido que comprende una secuencia de ADN según la SEQ ID NO:29. Los métodos de detección y los kits de la presente invención se dirigen a identificar el evento.

Las definiciones y los ejemplos se proporcionan en la presente memoria para ayudar a describir la presente invención y para guiar a los expertos en la técnica para practicar la invención. A menos que se indique lo contrario, los términos se deben entender según el uso convencional por los expertos en la técnica relevante. Para las bases de ADN se utiliza la nomenclatura según lo establecido en 37 CFR §1.822.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "progenie" denota la descendencia de cualquier generación de una planta parental que comprende el evento de maíz DAS-40278-9 que incorpora ADD-1.

Un "evento" transgénico se produce por transformación de células vegetales con ADN heterólogo, es decir, una construcción de ácido nucleico que incluye un transgén de interés, la regeneración de una población de plantas resultante de la inserción del transgén en el genoma de la planta, y la selección de una planta particular caracterizada por la inserción en una localización particular del genoma. El término "evento" se refiere al transformante original y la progenie del transformante que incluye el ADN heterólogo. El término "evento" también se refiere a la progenie producida por un exocruzamiento sexual entre el transformante y otra variedad que incluye el ADN transgénico/genómico. Incluso después de repetidos retrocruzamientos a un progenitor recurrente, el ADN transgénico insertado y el ADN genómico flanqueante (ADN transgénico/genómico) del progenitor transformado está presente en la progenie del cruzamiento en la misma localización cromosómica. El término "evento" también se refiere al ADN del transformante original y de progenie del mismo que comprende el ADN insertado y la secuencia genómica flanqueante inmediatamente adyacente al ADN insertado que se espera que se transfiera a una progenie que recibe ADN insertado que incluye el transgén de interés como el resultado de un cruzamiento sexual de una línea parental que incluye el ADN insertado (*p. ej.*, el transformante original y la progenie que resulta de la autofecundación) y una línea parental que no contiene el ADN insertado.

Una "secuencia de unión" abarca el punto en el que el ADN insertado en el genoma se une con el ADN del genoma nativo de maíz que flanquea el punto de inserción, la identificación o detección de una u otra secuencia de unión en el material genético de una planta es suficiente para diagnosticar el evento. Se incluyen las secuencias de ADN que abarcan las inserciones en eventos de maíz descritos en la presente memoria y longitudes similares de ADN flanqueante. En la presente memoria se proporcionan ejemplos específicos de tales secuencias de diagnóstico; sin embargo, otras secuencias que se solapan con las uniones de las inserciones, o las uniones de las inserciones y la secuencia genómica, también son diagnósticas y se podrían utilizar según la presente invención.

La presente invención se refiere a la identificación de tales secuencias flanqueantes, de unión y del inserto. Los cebadores de PCR relacionados y los amplicones se describen en la presente memoria. Según la presente invención, los métodos de análisis de PCR que utilizan amplicones que se extienden a través del ADN insertado y sus bordes se pueden utilizar para detectar o identificar el evento.

Las secuencias completas de cada una de estas inserciones, junto con partes de las secuencias flanqueantes respectivas, se proporcionan en la presente memoria como SEQ ID NO:29. Las coordenadas de las secuencias flanqueantes y del inserto para este evento con respecto a la SEQ ID NO:29 (total de 8557 pares de bases) se imprimen

a continuación. Esto se discute con más detalle en el Ejemplo 3.8, por ejemplo.

	Flanqueante 5'	Inserto	Flanqueante 3'
restos (SEQ:29):	1-1873	1874-6689	6690-8557
longitud (pb):	1873 pb	4816 pb	1868 pb

Este evento de inserción, y otros componentes del mismo, se ilustran adicionalmente en las Figuras 1 y 2. Estas secuencias (particularmente las secuencias flanqueantes) son únicas. En base a estas secuencias de borde e inserto, se generaron cebadores específicos de evento. El análisis de PCR demostró que estas líneas de maíz se pueden identificar en diferentes genotipos de maíz mediante el análisis de los amplicones de PCR generados con estos conjuntos de cebadores específicos de evento. Por lo tanto, estos y otros procedimientos relacionados se pueden utilizar para identificar de forma única estas líneas de maíz. Las secuencias identificadas en la presente memoria son únicas. Por ejemplo, las búsquedas con BLAST frente a las bases de datos GENBANK no revelaron ninguna homología significativa entre las secuencias de borde clonadas y las secuencias en la base de datos.

Las técnicas de detección de la presente invención son especialmente útiles en conjunción con la mejora vegetal, para determinar qué plantas de la progenie comprenden un evento determinado, después de que una planta parental que comprende un evento de interés está cruzada con otra línea de plantas en un esfuerzo por impartir uno o más rasgos adicionales de interés en la progenie. Estos métodos de análisis de PCR benefician los programas de mejoramiento genético de maíz así como el control de calidad, especialmente para las semillas de maíz transgénicas comercializadas. Los kits de detección de PCR para estas líneas de maíz transgénicas también se pueden hacer y utilizar ahora. Esto también puede beneficiar el registro del producto y la administración del producto.

Además, se pueden utilizar secuencias genómicas/flanqueantes de maíz para identificar específicamente la localización genómica de cada inserto. Esta información se puede utilizar para hacer sistemas de marcadores moleculares específicos para cada evento. Estos se pueden utilizar para estrategias de mejoramiento genético aceleradas y para establecer datos de unión.

Todavía más, la información de la secuencia flanqueante se puede utilizar para estudiar y caracterizar los métodos de integración transgénica, las características del sitio de integración genómica, la clasificación de eventos, la estabilidad de transgenes y sus secuencias flanqueantes y la expresión de genes (especialmente relacionado con el silenciamiento de genes, los patrones de metilación de los transgenes, los efectos de posición, y elementos potencialmente relacionados con la expresión, tal como MARS, por sus siglas en inglés [regiones de unión de matriz], y similares).

A la luz de toda la presente descripción, debe estar claro que la presente invención incluye semillas disponibles en el depósito ATCC nº PTA-10244. La presente invención también incluye una planta de maíz resistente a los herbicidas cultivada a partir de una semilla depositada en ATCC con el número de acceso PTA-10244. La presente invención incluye además partes de dicha planta, tales como hojas, muestras de tejidos, semillas producidas por dicha planta, polen y similares.

Todavía más, la presente invención incluye plantas de progenie y/o descendientes de plantas cultivadas a partir de la semilla depositada, una planta de maíz resistente a herbicida en donde dicha planta tiene un genoma que comprende una secuencia de unión de ADN de inserto/ADN genómico de tipo salvaje detectable como se describe en la presente memoria. La progenie, los descendientes y las partes de la planta tienen un genoma que comprende la SEQ ID NO:29. Como se utiliza en la presente memoria, el término "grano de maíz" significa maíz (*Zea mays*) e incluye todas las variedades del mismo que se pueden reproducir con el maíz.

Se describen los métodos para realizar cruzamientos utilizando una planta de la presente invención con al menos un progenitor. Por ejemplo, una planta híbrida F1 que tiene uno o ambos progenitores cualquiera de las plantas ejemplificadas en la presente memoria. También se describe la semilla producida por tales híbridos F1. Se describe un método para producir una semilla híbrida F1 cruzando una planta ejemplificada con una planta diferente (p. ej., progenitor endogámico) y cosechando la semilla híbrida resultante. La presente invención incluye una planta ejemplificada que es un progenitor femenino o un progenitor masculino. Las características de las plantas resultantes se pueden mejorar mediante una cuidadosa consideración de las plantas parentales.

Una planta de maíz tolerante a herbicida se puede obtener cruzando primero sexualmente una primera planta de maíz parental que consiste en una planta de maíz cultivada a partir de semillas de las líneas mencionadas en la presente memoria, y una segunda planta de maíz parental, produciendo así una pluralidad de plantas de la primera progenie; y después seleccionar una planta de la primera progenie que sea resistente a un herbicida (o que posea los eventos de la presente invención); y autofecundar la planta de la primera progenie, produciendo así una pluralidad de plantas de

segunda progenie; y después seleccionar de las plantas de la segunda progenie una planta que sea resistente a un herbicida (o que posea al menos uno de los eventos de la presente invención). Estas etapas pueden incluir además el retrocruzamiento de la planta de la primera progenie o de la planta de la segunda progenie con la segunda planta de maíz parental o con una tercera planta de maíz parental. Un cultivo de maíz que comprende semillas de maíz de la presente invención, o progenie de las mismas, puede entonces ser sembrado.

También se debe entender que dos plantas transgénicas diferentes también se pueden cruzar para producir descendencia que contenga dos genes exógenos añadidos que se segregan independientemente. La autofecundación de la progenie apropiada puede producir plantas homocigotas para ambos genes exógenos añadidos. También se contempla el retrocruzamiento con una planta parental y el exocruzamiento con una planta no transgénica, como es la propagación vegetativa. Otros métodos de mejoramiento genético comúnmente utilizados para diferentes rasgos y cultivos son conocidos en la técnica. El mejoramiento genético mediante retrocruzamiento se ha utilizado para transferir genes para un rasgo hereditario simple y altamente heredable a un cultivar homocigótico deseable o una línea endogámica, que es el progenitor recurrente. La fuente del rasgo a ser transferido se denomina progenitor donante. Se espera que la planta resultante tenga atributos del progenitor recurrente (*p. ej.*, cultivar) y el rasgo de interés transferido desde el progenitor donante. Tras el cruzamiento inicial, se seleccionan individuos que poseen el fenotipo del progenitor donante y se cruzan (retrocruzados) repetidamente con el progenitor recurrente. Se espera que el progenitor resultante tenga los atributos del progenitor recurrente (*p. ej.* cultivar) y el rasgo de interés transferido desde el progenitor donante.

Las moléculas de ADN de la presente invención se pueden utilizar como marcadores moleculares en un método de mejoramiento genético asistido por marcadores (MAB, por sus siglas en inglés). Las moléculas de ADN de la presente invención se pueden utilizar en métodos (tales como, marcadores AFLP, marcadores RFLP, marcadores RAPD, SNP y SSR) que identifican rasgos útiles agrónomicamente ligados genéticamente, como se conoce en la técnica. El rasgo de tolerancia a herbicidas se puede rastrear en la progenie de un cruzamiento con una planta de maíz de la presente invención (o progenie de la misma y cualquier otro cultivar o variedad de maíz) utilizando los métodos de MAB. Las moléculas de ADN son marcadores para este rasgo, y los métodos de MAB que son bien conocidos en la técnica se pueden utilizar para rastrear el rasgo o rasgos de resistencia a herbicida en plantas de maíz donde al menos una línea de maíz de la presente invención, o progenie de la misma, fue un parental o ancestro. Los métodos de la presente invención se pueden utilizar para identificar cualquier variedad de maíz que tiene el evento objeto.

Se describe un método para producir una planta de maíz tolerante a herbicida en donde dicho método comprende el mejoramiento genético con una planta de la presente invención. Más específicamente, dichos métodos pueden comprender cruzar dos plantas de la presente invención, o una planta de la presente invención y cualquier otra planta. Los métodos preferidos comprenden además la selección de la progenie de dicho cruzamiento analizando dicha progenie para un evento detectable según la presente invención. Por ejemplo, la presente invención se puede utilizar para rastrear el evento objeto a través de ciclos de mejoramiento genético con plantas que comprenden otros rasgos deseables, tales como rasgos agrónomicos tales como los ensayados en la presente memoria en varios ejemplos. Las plantas que comprenden el evento objeto y el rasgo de interés se pueden detectar, identificar, seleccionar y utilizar rápidamente en rondas adicionales de mejoramiento genético, por ejemplo. El evento/rasgo objeto también se puede combinar a través de mejoramiento genético, y rastrear según la presente invención, con uno o más rasgos resistentes a insectos y/o con rasgos de tolerancia a herbicidas adicionales. Una realización preferida de esta última es una planta que comprende el evento objeto combinado con un gen que codifica resistencia al herbicida dicamba.

Por lo tanto, la presente invención se puede combinar con, por ejemplo, rasgos que codifican resistencia al glifosato (*p. ej.*, *EPSPS*, *GOX*, *GAT* bacterianos o de plantas resistentes), resistencia al glufosinato (*p. ej.*, *Pat*, *bar*), resistencia a herbicidas inhibidores de la acetolactato sintasa (ALS) (*p. ej.*, imidazolinonas [tal como imazetapir], sulfonilureas, triazopirimidina sulfonanilida, pirimidiniltiobenzatoos y otros productos químicos [*Csr1*, *SurA*, *et al.*]), resistencia al bromoxinil (*p. ej.*, *Bxn*), resistencia a inhibidores de la enzima HPPD (4-hidroxifenil piruvato dioxigenasa), resistencia a inhibidores de la fitoeno desaturasa (PDS), resistencia a herbicidas inhibidores del fotosistema II (*p. ej.*, *pdbA*), resistencia a herbicidas inhibidores del fotosistema I, resistencia a herbicidas inhibidores de la protoporfirinógeno oxidasa IX (PPO) (*p. ej.*, *PPO-1*), resistencia a herbicidas de fenilurea (*p. ej.*, *CYP76B1*), enzimas degradadoras de la dicamba (véase, *p. ej.*, el documento de patente US 20030135879), y otros pueden ser apilados solos o en múltiples combinaciones para proporcionar la habilidad de controlar de forma efectiva o prevenir migración de malas hierbas y/o la resistencia a cualquier herbicida de las clases anteriormente mencionadas.

Respecto a herbicidas adicionales, algunos otros inhibidores de la ALS (también denominados AHAS) preferidos incluyen las triazopirimidina sulfonanilidas (tal como cloransulam metil, diclosulam, florasulam, flumetsulam, metosulam, y penoxsulam), pirimidiniltiobenzatoos (tal como bispiribac y piritiobac), y flucarbazona. Algunos inhibidores de la HPPD preferidos incluyen mesotriona, isoxaflutol, y sulcotriona. Algunos inhibidores de la PPO preferidos incluyen flumiclorac, flumioxazin, flufenpir, piraflufeno, flutiacet, butafenacil, carfentrazona, sulfentrazona, y los difeniléteres (tal como acifluorfen, fomesafeno, lactofeno, y oxifluorfen).

Además, la AAD-1 sola o apilada con uno o más rasgos adicionales de HTC pueden estar apilados con uno o más rasgos adicionales de entrada (*p. ej.*, resistencia a insectos, resistencia a hongos, o tolerancia al estrés, *et al.*) o salida (*p. ej.*, mayor rendimiento, mejor perfil de aceite, mejor calidad de fibra, *et al.*). Por lo tanto, la presente invención se puede utilizar para proporcionar un paquete agronómico completo de calidad de cultivo mejorada con la capacidad de

controlar de forma flexible y rentable cualquier número de plagas agronómicas.

Los métodos para integrar una secuencia de polinucleótidos dentro de un sitio cromosómico específico de una célula vegetal mediante recombinación homóloga se han descrito en la técnica. Por ejemplo, la integración específica del sitio como se describe en la solicitud de patente de EE. UU. n° de publicación 2009/0111188 A1, describe el uso de recombinasas o integrasas para mediar en la introducción de una secuencia de polinucleótido donante en una diana cromosómica. Además, la solicitud de patente internacional n° WO 2008/021207 describe la recombinación homóloga mediada por dedos de zinc para integrar una o más secuencias de polinucleótidos donantes en localizaciones específicas del genoma. El uso de recombinasas tales como FLP/FRT como se describe en la patente de EE.UU. n° 6720475 o de CRE/LOX como se describe en la patente de EE.UU. n° 5658772 se pueden utilizar para integrar una secuencia de polinucleótidos en un sitio cromosómico específico. Finalmente, el uso de meganucleasas para dirigir los polinucleótidos donantes a una localización cromosómica específica se describió en Puchta *et al.*, PNAS USA 93 (1996) pp. 5055-5060.

Otros diversos métodos para la integración específica del sitio dentro de las células vegetales son generalmente conocidos y aplicables (Kumar *et al.*, Trends in Plant Sci. 6 (4) (2001) pp. 155-159). Además, los sistemas de recombinación específicos del sitio que se han identificado en varios organismos procariotas y eucariotas inferiores se pueden aplicar para uso en plantas. Los ejemplos de tales sistemas incluyen, pero no se limitan a: el sistema recombinasa R/RS del plásmido pSR1 de la levadura *Zygosaccharomyces rouxii* (Araki *et al.* (1985) J. Mol. Biol. 182: 191-203), y el sistema Gin/gix del fago Mu (Maeser and Kahlmann (1991) Mol. Gen. Genet. 230: 170-176).

En algunas realizaciones de la presente invención, puede ser deseable integrar o apilar un nuevo transgén o transgenes en la proximidad de un evento transgénico existente. El evento transgénico es un locus genómico preferido que se seleccionó en base a características únicas tal como el sitio de inserción único, la segregación mendeliana normal y la expresión estable, y una combinación superior de eficacia, que incluye tolerancia a herbicidas y rendimiento agronómico en y a través de múltiples localizaciones ambientales. Los transgenes recién integrados deben mantener las características de expresión transgénica de los transformantes existentes. Además, el desarrollo de ensayos para la detección y confirmación del evento recién integrado se superaría, ya que las secuencias flanqueantes genómicas y la localización cromosómica del evento recién integrado ya están identificadas. Finalmente, la integración de un nuevo transgén en una localización cromosómica específica que está ligada a un transgén existente aceleraría la introgresión de los transgenes en otros orígenes genéticos mediante el exocruzamiento sexual utilizando métodos de mejoramiento genético convencionales.

Puede ser deseable cortar secuencias de polinucleótidos de un evento transgénico. Por ejemplo, la escisión del transgén como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. provisional n° 61/297,628, describe el uso de nucleasas con dedos de zinc para eliminar una secuencia de polinucleótidos, que consiste en un casete de expresión génica, de un evento transgénico integrado cromosómicamente. La secuencia de polinucleótidos que se elimina puede ser un marcador seleccionable. Tras la escisión y eliminación de una secuencia de polinucleótidos, el evento transgénico modificado se puede redireccionar mediante la inserción de una secuencia de polinucleótidos. La escisión de una secuencia de polinucleótidos y la posterior reorientación del evento transgénico modificado proporcionan ventajas tales como la reutilización de un marcador seleccionable o la capacidad de superar cambios no intencionados en el transcriptoma de la planta que resulta de la expresión de genes específicos.

La presente invención describe en la presente memoria un sitio específico en el cromosoma 2 en el genoma del maíz que es excelente para la inserción de ácidos nucleicos heterólogos. También se describe un marcador molecular 5', un marcador molecular 3', una secuencia flanqueante 5' y una secuencia flanqueante 3' útil para identificar la localización de un sitio diana en el cromosoma 2. Por lo tanto, la presente invención proporciona métodos para introducir ácidos nucleicos heterólogos de interés en este sitio diana preestablecido o en la vecindad de este sitio diana. La presente invención también abarca una semilla de maíz y/o una planta de maíz que comprende cualquier secuencia de nucleótidos heteróloga insertada adicionalmente en el sitio diana descrito o en la vecindad general de dicho sitio. Una opción para lograr dicha integración dirigida es escindir y/o sustituir un inserto diferente en lugar del casete de expresión *pat* ejemplificado en la presente memoria. En este aspecto general, por ejemplo y sin limitación, se puede utilizar una recombinación homóloga dirigida.

Como se utiliza en la presente memoria, el "apilamiento" de genes, eventos o rasgos es la combinación de rasgos deseados en una línea transgénica. Los mejoradores genéticos de la planta apilan rasgos transgénicos haciendo cruzamientos entre los progenitores, cada uno con un rasgo deseado y después identificando los descendientes que tienen ambos rasgos deseados. Otra forma de apilar genes es mediante la transferencia de dos o más genes al núcleo celular de una planta al mismo tiempo durante la transformación. Otra forma de apilar genes es volviendo a transformar una planta transgénica con otro gen de interés. Por ejemplo, el apilamiento de genes se puede utilizar para combinar dos o más rasgos diferentes, que incluye, por ejemplo, dos o más rasgos de insectos diferentes, rasgo o rasgos de resistencia a insectos y rasgo o rasgos de resistencia a enfermedades, dos o más rasgos de resistencia a herbicidas, y/o rasgo o rasgos de resistencia a insectos y rasgo o rasgos de resistencia a herbicidas. El uso de un marcador seleccionable además de un gen de interés también se puede considerar apilamiento de genes.

"Recombinación homóloga" se refiere a una reacción entre cualquier par de secuencias de nucleótidos que tienen sitios correspondientes que contienen una secuencia de nucleótidos similar a través de la cual las dos secuencias de

nucleótidos pueden interactuar (recombinarse) para formar una nueva secuencia de ADN recombinante. Los sitios de secuencias de nucleótidos similares se denominan en la presente memoria como una "secuencia de homología". En general, la frecuencia de recombinación homóloga aumenta a medida que aumenta la longitud de la secuencia de homología. Por lo tanto, mientras que la recombinación homóloga puede ocurrir entre dos secuencias de nucleótidos que son menos que idénticas, la frecuencia (o eficiencia) de recombinación disminuye a medida que aumenta la divergencia entre las dos secuencias. La recombinación se puede lograr utilizando una secuencia de homología en cada una de las moléculas diana y donante, generando así un producto de recombinación de "entrecruzamiento único". Alternativamente, se pueden colocar dos secuencias de homología en cada una de las secuencias de nucleótidos diana y donante. La recombinación entre dos secuencias de homología en el donante con dos secuencias de homología en la diana genera un producto de recombinación de "doble entrecruzamiento". Si las secuencias de homología en la molécula donante flanquean una secuencia que se va a manipular (*p. ej.*, una secuencia de interés), la recombinación de doble entrecruzamiento con la molécula diana dará como resultado un producto de recombinación en donde la secuencia de interés reemplaza una secuencia de ADN que estaba originalmente entre las secuencias de homología en la molécula diana. El intercambio de secuencia de ADN entre la diana y el donante a través de un evento de recombinación de doble entrecruzamiento se denomina "reemplazo de secuencia".

La enzima AAD-1 objeto permite la expresión transgénica, que da como resultado tolerancia a combinaciones de herbicidas que controlarían casi todas las malezas de hoja ancha y gramíneas. AAD-1 puede servir como un excelente rasgo de cultivo tolerante a herbicida (HTC) para apilar con otros rasgos de HTC (*p. ej.*, resistencia a glifosato, resistencia a glufosinato, resistencia a imidazolinona, resistencia a bromoxinilo, *et al.*) y rasgos de resistencia a insectos (*Cry1F*, *Cry1Ab*, *Cry 34/45*, *et al.*) por ejemplo. Además, AAD-1 puede servir como un marcador seleccionable para ayudar en la selección de transformantes primarios de plantas modificadas genéticamente con un segundo gen o grupo de genes.

Los rasgos de HTC de la presente invención se pueden utilizar en combinaciones novedosas con otros rasgos de HTC (que incluyen, pero no se limitan a la tolerancia al glifosato). Estas combinaciones de rasgos dan lugar a nuevos métodos para controlar las especies de malezas (y similares), debido a la nueva resistencia adquirida o la tolerancia inherente a los herbicidas (*p. ej.*, glifosato).

Además, prevalecen los cultivos tolerantes al glifosato cultivados en todo el mundo. Muchas veces en rotación con otros cultivos tolerantes al glifosato, el control de las malezas resistentes al glifosato puede ser difícil en los cultivos rotacionales. Por lo tanto, el uso de los rasgos transgénicos objeto, apilados o transformados individualmente en cultivos, proporciona una herramienta para controlar otros cultivos de maleza HTC.

Una planta, o una semilla, de la presente invención comprende en su genoma la secuencia según la SEQ ID NO: 29. A menos que se indique lo contrario, la referencia a las secuencias flanqueantes se refiere a aquellas identificadas con respecto a la SEQ ID NO: 29 (véase la Tabla anterior). De nuevo, la SEQ ID NO:29 incluye el ADN heterólogo insertado en el transformante original y las secuencias genómicas flanqueantes inmediatamente adyacentes al ADN insertado. Se podría esperar que la totalidad o parte de estas secuencias flanqueantes se transfieren a la progenie que recibe el ADN insertado como resultado de un cruzamiento sexual de una línea parental que incluye el evento.

Se describen cultivos de tejido de células regenerables de una planta de la presente invención. También se describe una planta regenerada a partir de tal cultivo de tejidos, particularmente cuando dicha planta es capaz de expresar todas las propiedades morfológicas y fisiológicas de una variedad ejemplificada. Las plantas preferidas de la presente invención tienen todas las características fisiológicas y morfológicas de una planta cultivada a partir de la semilla depositada. Esta invención comprende además la progenie de tales semillas y semillas que poseen los rasgos de calidad de interés.

Las manipulaciones (tal como la mutación, la transfección adicional y el mejoramiento genético) de plantas o semillas, o partes de las mismas, pueden llevar a la creación de lo que se puede denominar variedades "esencialmente derivadas". La Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV, por sus siglas en inglés) ha proporcionado las siguientes pautas para determinar si una variedad se ha obtenido esencialmente a partir de una variedad protegida:

[A] la variedad se considerará esencialmente obtenida a partir de otra variedad ("la variedad inicial") cuando

(i) se obtiene predominantemente a partir de la variedad inicial, o de una variedad que a su vez se obtiene predominantemente a partir de la variedad inicial, mientras que conserva la expresión de las características esenciales que resultan del genotipo o combinación de genotipos de la variedad inicial;

(ii) se distingue claramente de la variedad inicial; y

(iii) a excepción de las diferencias que resultan del acto de derivación, se ajusta a la variedad inicial en la expresión de las características esenciales que resultan del genotipo o combinación de genotipos de la variedad inicial.

UPOV, Sexta reunión con organizaciones internacionales, Ginebra, 30 de octubre de 1992; Documento preparado por la Oficina de la Unión.

Como se utiliza en la presente memoria, una "línea" es un grupo de plantas que muestra poca o ninguna variación genética entre individuos para al menos un rasgo. Tales líneas pueden ser creadas por varias generaciones de autopolinización y selección, o propagación vegetativa de un solo progenitor utilizando técnicas de cultivo de tejidos o células.

Como se utiliza en la presente memoria, los términos "cultivar" y "variedad" son sinónimos y se refieren a una línea que se utiliza para la producción comercial.

"Estabilidad" o "estable" significa que, con respecto al componente dado, el componente se mantiene de generación en generación y, preferiblemente, al menos tres generaciones en sustancialmente el mismo nivel, *p. ej.*, preferiblemente $\pm 15\%$, más preferiblemente $\pm 10\%$, lo más preferiblemente de $\pm 5\%$. La estabilidad puede verse afectada por la temperatura, la localización, el estrés y el momento de la siembra. La comparación de las generaciones subsiguientes en condiciones de campo produciría el componente de una manera similar.

"Utilidad comercial" se define como tener un buen vigor de la planta y una alta fertilidad, de modo que el cultivo pueda ser producido por los agricultores que utilizan equipos de cultivo convencionales, y el aceite con los componentes descritos se puede extraer de la semilla utilizando equipos convencionales de trituración y extracción. Para ser comercialmente útil, el rendimiento, medido por el peso de la semilla, el contenido de aceite y el aceite total producido por hectárea (acre), está dentro del 15% del rendimiento promedio de una variedad de canola comercial comparable diferente sin los rasgos de valor superior cultivados en la misma región.

"Elite agronómica" significa que una línea tiene características agronómicas deseables tales como rendimiento, madurez, resistencia a enfermedades y similares, además de la resistencia a insectos debido al evento o eventos objeto. Los rasgos agronómicos, tomados individualmente o en cualquier combinación, como se establece en los Ejemplos, a continuación, en una planta que comprende un evento de la presente invención, están dentro del alcance de la presente invención. Cualquiera y todas estas características agronómicas y puntos de datos se pueden utilizar para identificar tales plantas, ya sea como un punto o en uno de los extremos o en ambos extremos de un rango de características utilizadas para definir tales plantas.

Como reconocerá un experto en la técnica a la luz de esta descripción, las realizaciones preferidas de los kits de detección, por ejemplo, pueden incluir sondas y/o cebadores dirigidos a y/o que comprenden "secuencias de unión" o "secuencias de transición" (donde la secuencia flanqueante genómica del maíz se encuentra con la secuencia de inserción). Por ejemplo, esto incluye unas sondas de polinucleótidos, cebadores y/o amplicones diseñados para identificar una o ambas secuencias de unión (donde el inserto se encuentra con la secuencia flanqueante), como se indica en la Tabla 1. Un diseño común es tener un cebador que se hibride en la región flanqueante y un cebador que se hibride en el inserto. Tales cebadores suelen tener una longitud de al menos ~ 15 restos. Con esta disposición, los cebadores se pueden utilizar para generar/amplificar un amplicón detectable que indica la presencia de un evento de la presente invención. Estos cebadores se pueden utilizar para generar un amplicón que abarca (e incluye) una secuencia de unión como se indicó anteriormente.

Los cebadores que "tocan" en la secuencia flanqueante no están diseñados para hibridar más allá de aproximadamente 200 bases o más allá de la unión. Por lo tanto, los cebadores flanqueantes típicos se diseñarán para que comprendan al menos 15 restos de cualquiera de las cadenas dentro de las 200 bases en las secuencias flanqueantes desde el comienzo del inserto. Es decir, los cebadores que comprenden la secuencia de un tamaño apropiado en los restos ~ 1674 - 1873 y/o ~ 6690 - 6890 de la SEQ ID NO:29 están dentro del alcance de la presente invención. Los cebadores de inserto también se pueden diseñar en cualquier lugar del inserto, pero los restos ~ 1874 - 2074 y ~ 6489 - 6689 se pueden utilizar, por ejemplo, no exclusivamente para tal diseño de cebador.

Un experto en la técnica también reconocerá que los cebadores y las sondas se pueden diseñar para hibridarse, en un rango de condiciones de hibridación y/o PCR estándar, con un segmento de la SEQ ID NO:29 (o el complemento), y complementos de la misma, en donde el cebador o la sonda no son perfectamente complementarios a la secuencia ejemplificada. Es decir, se puede tolerar cierto grado de discordancia. Para un cebador de aproximadamente 20 nucleótidos, por ejemplo, típicamente uno o dos o más nucleótidos no necesitan unirse con la cadena opuesta si las bases discordantes están situadas en la parte interna o en el extremo del cebador opuesto al amplicón. A continuación, se proporcionan varias condiciones de hibridación apropiadas. Los análogos de nucleótidos sintéticos, tal como la inosina, también se pueden utilizar en sondas. También se pueden utilizar sondas de ácido nucleico peptídico (PNA, por sus siglas en inglés), así como sondas de ADN y ARN. Lo importante es que tales sondas y cebadores son diagnósticos para (capaces de identificar y distinguir de manera única) la presencia de un evento de la presente invención.

Se debería tener en cuenta que, por ejemplo, se pueden producir errores en la amplificación por PCR, lo que podría dar lugar a errores menores de secuenciación. Es decir, a menos que se indique lo contrario, las secuencias enumeradas en la presente memoria se determinaron generando amplicones largos a partir de ADN genómicos de maíz, y después clonando y secuenciando los amplicones. No es inusual encontrar ligeras diferencias y pequeñas discrepancias en las secuencias generadas y determinadas de esta manera, dadas las numerosas rondas de amplificación que son necesarias para generar suficientes amplicones para la secuenciación de ADN genómicos. Un experto en la materia debe reconocer y advertir que cualquier ajuste necesario debido a estos tipos de errores o

discrepancias de secuenciación comunes está dentro del alcance de la presente invención.

También se debe tener en cuenta que no es infrecuente que se elimine alguna secuencia genómica, por ejemplo, cuando se inserta una secuencia durante la creación de un evento. Por lo tanto, también pueden aparecer algunas diferencias entre las secuencias flanqueantes objeto y las secuencias genómicas enumeradas en GENBANK, por ejemplo.

Algunas de estas diferencias se analizan a continuación en la sección de ejemplos. Los ajustes a sondas y cebadores se pueden hacer en consecuencia.

Los componentes de cada uno de los "insertos" se ilustran en las Figuras 1 y 2 y se explican con más detalle a continuación en los ejemplos. Las secuencias de polinucleótidos de ADN de estos componentes, o fragmentos de los mismos, se pueden utilizar como cebadores o sondas de ADN en los métodos de la presente invención.

En algunas realizaciones de la invención, se proporcionan composiciones y métodos para detectar la presencia de la región de inserción transgénica/genómica, en plantas y semillas y similares, de una planta de maíz. Se proporcionan secuencias de ADN que comprenden la secuencia de unión de la región de inserción genómica/transgén objeto proporcionada en la presente memoria (entre los restos 1873-1874 y 6689-6690 de la SEQ ID NO:29), segmentos de las mismas, y complementos de las secuencias ejemplificadas y cualquier segmento de las mismas. La secuencia de unión de la región de inserción abarca la unión entre el ADN heterólogo insertado en el genoma y el ADN de la célula de maíz que flanquea el sitio de inserción. Tales secuencias pueden ser diagnósticas para el evento dado.

En base a estas secuencias de inserto y borde, se pueden generar cebadores específicos de eventos. El análisis de PCR demostró que las líneas de maíz de la presente invención se pueden identificar en diferentes genotipos de maíz mediante el análisis de los amplicones de PCR generados con estos conjuntos de cebadores específicos de evento. Estos y otros procedimientos relacionados se pueden utilizar para identificar de forma única estas líneas de maíz. Por lo tanto, los amplicones de PCR obtenidos a partir de dichos pares de cebadores son únicos y se pueden utilizar para identificar estas líneas de maíz.

En algunas realizaciones, las secuencias de ADN que comprenden un fragmento contiguo de la nueva región de inserción transgénica/genómica son un aspecto de esta invención. Se incluyen las secuencias de ADN que comprenden una longitud suficiente de polinucleótidos de la secuencia del inserto del transgén y una longitud suficiente de polinucleótidos de secuencia genómica de maíz de una o más de las tres plantas de maíz mencionadas anteriormente y/o de secuencias que son útiles como secuencias de cebadores para la producción de un producto de amplicón diagnóstico para una o más de estas plantas de maíz.

Realizaciones relacionadas pertenecen a secuencias de ADN que comprenden al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, o más nucleótidos contiguos de una porción transgénica de la SEQ ID NO:29 y segmentos de la misma, o complementos de la misma, y una longitud similar de la secuencia de ADN de maíz flanqueante de estas secuencias, o complementos de la misma. Tales secuencias son útiles como cebadores de ADN en los métodos de amplificación de ADN. Los amplicones producidos utilizando estos cebadores son diagnósticos para cualquiera de los eventos de maíz mencionados en la presente memoria.

Esta invención también incluye métodos para detectar la presencia de ADN, en una muestra, que corresponde al evento de maíz al que se hace referencia en la presente memoria, como se reivindica. Se describen métodos que comprenden: (a) poner en contacto la muestra que comprende ADN con un conjunto de cebadores que, cuando se utiliza en una reacción de amplificación de ácido nucleico con ADN de al menos uno de estos eventos de maíz, produce un amplicón que es diagnóstico para dicho evento o eventos; (b) realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico, produciendo así el amplicón; y (c) detectar el amplicón.

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

Se proporcionan métodos para determinar la cigosidad de la progenie de un cruzamiento con una cualquiera (o más) de dichos tres eventos. Dichos métodos pueden comprender poner en contacto una muestra, que comprende ADN de maíz, con un conjunto de cebadores de la presente invención. Dichos cebadores, cuando se utilizan en una reacción de amplificación de ácido nucleico con ADN genómico de al menos uno de tales eventos de maíz, producen un primer amplicón que es diagnóstico para al menos uno de dichos eventos de maíz. Tales métodos comprenden además realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico, produciendo así el primer amplicón; detectar el primer amplicón; y poner en contacto la muestra que comprende ADN de maíz con dicho conjunto de cebadores (dicho conjunto de cebadores, cuando se utiliza en una reacción de amplificación de ácido nucleico con ADN genómico de plantas de maíz, produce un segundo amplicón que comprende el ADN genómico de maíz nativo homólogo a la región genómica de maíz; y realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico, produciendo así el segundo amplicón. Los métodos comprenden además detectar el segundo amplicón y comparar el primer y segundo amplicón en una

muestra, en donde la presencia de ambos amplicones indica que la muestra es heterocigótica para la inserción del transgén.

Se pueden desarrollar kits de detección de ADN utilizando las composiciones descritas en la presente memoria y métodos bien conocidos en la técnica de detección de ADN. Los kits son útiles para la identificación del ADN del evento de maíz objeto en una muestra y se pueden aplicar a métodos para mejorar genéticamente plantas de maíz que contienen este ADN. Los kits contienen secuencias de ADN homólogas o complementarias a los amplicones, por ejemplo, descritas en la presente memoria, o a secuencias de ADN homólogas o complementarias al ADN contenido en los elementos genéticos del transgén de los eventos objeto. Estas secuencias de ADN se pueden utilizar en reacciones de amplificación de ADN o como sondas en un método de hibridación de ADN. Los kits también pueden contener los reactivos y materiales necesarios para la ejecución del método de detección.

Una "sonda" es una molécula de ácido nucleico aislada a la que se une un marcador detectable convencional o molécula informadora (tal como un isótopo radiactivo, un ligando, un agente quimioluminiscente o una enzima). Tal sonda es complementaria a una cadena de un ácido nucleico diana, en el caso de la presente invención, a una cadena de ADN genómico de uno de dichos eventos de maíz, ya sea de una planta de maíz o de una muestra que incluye ADN del evento. Las sondas según la presente invención incluyen no solo ácidos desoxirribonucleicos o ribonucleicos, sino también poliamidas y otros materiales de sondas que se unen específicamente a una secuencia de ADN diana y se pueden utilizar para detectar la presencia de esa secuencia de ADN diana.

Los "cebadores" son ácidos nucleicos sintetizados/aislados que se aparean 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, *p. ej.*, una ADN polimerasa. Los pares de cebadores de la presente invención se refieren a su uso para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico diana, *p. ej.*, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otros métodos convencionales de amplificación de ácido nucleico.

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

Los métodos para preparar y utilizar sondas y cebadores se describen, por ejemplo, en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Vol. 1-3, ed. Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989. Los pares de cebadores de PCR se pueden obtener a partir de una secuencia conocida, por ejemplo, mediante el uso de programas informáticos destinados a tal fin.

Los cebadores y las sondas basados en las secuencias ADN flanqueante e inserto descritas en la presente memoria se pueden utilizar para confirmar (y, si es necesario, para corregir) las secuencias descritas por métodos convencionales, *p. ej.*, mediante la repetición de la clonación y secuenciación de tales secuencias.

Las sondas de ácido nucleico y los cebadores de la presente invención se hibridan en condiciones rigurosas con una secuencia de ADN diana. Se puede utilizar cualquier método convencional de hibridación o amplificación de ácidos nucleicos para identificar la presencia de ADN de un evento transgénico en una muestra. Las moléculas de ácido nucleico, o fragmentos del mismo, se pueden hibridar específicamente con otras moléculas de ácido nucleico bajo ciertas circunstancias. Como se utiliza en la presente memoria, se dice que dos moléculas de ácido nucleico son

capaces de hibridarse específicamente entre sí si las dos moléculas son capaces de formar una estructura de ácido nucleico bicatenario antiparalelo. Se dice que una molécula de ácido nucleico es el "complemento" de otra molécula de ácido nucleico si presentan una complementariedad completa. Como se utiliza en la presente memoria, se dice que las moléculas exhiben una "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 se pueden hibridar entre sí con suficiente estabilidad para permitir que permanezcan apareadas entre sí en al menos condiciones convencionales de "baja rigurosidad". De manera similar, se dice que las moléculas son "complementarias" si se pueden hibridar entre sí con suficiente estabilidad para permitir que permanezcan apareadas entre sí en condiciones convencionales de "alta rigurosidad". Sambrook *et al.*, 1989, describen las condiciones de rigurosidad convencionales. Por lo tanto, se permiten desviaciones de la complementariedad completa, siempre que tales desviaciones no impidan por completo la capacidad de las moléculas para formar una estructura de doble cadena. Para que una molécula de ácido nucleico sirva como cebador o sonda, solo necesita ser lo suficientemente complementaria en su secuencia para poder formar una estructura estable de doble cadena bajo el disolvente particular y las concentraciones de sal empleadas.

Como se utiliza en la presente memoria, una secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia de ácido nucleico que se hibridará específicamente con el complemento de la secuencia de ácido nucleico con la que se está comparando en condiciones de alta rigurosidad. El término "condiciones rigurosas" se define funcionalmente con respecto a la hibridación de una sonda de ácido nucleico con un ácido nucleico diana (es decir, con una secuencia particular de ácido nucleico de interés) mediante el procedimiento de hibridación específico descrito en Sambrook *et al.* 1989, en 9.52-9.55. Véase también, Sambrook *et al.*, 1989 en 9.47-9.52 y 9.56-9.58. Por consiguiente, las secuencias de nucleótidos de la invención se pueden utilizar por su capacidad para formar selectivamente moléculas dúplex con regiones complementarias de fragmentos de ADN.

Dependiendo de la aplicación prevista, se pueden utilizar condiciones variables de hibridación para lograr grados variables de selectividad de la sonda hacia la secuencia diana. Para aplicaciones que requieren una alta selectividad, se empleará típicamente condiciones relativamente estrictas para formar los híbridos, *p. ej.*, se seleccionarán condiciones relativamente bajas de sal y/o alta temperatura, tales como las proporcionadas por aproximadamente 0.02 M a aproximadamente 0.15 M de NaCl a temperaturas de aproximadamente 50°C a aproximadamente 70°C. Las condiciones rigurosas, por ejemplo, podrían involucrar el lavado del filtro de hibridación al menos dos veces con tampón de lavado de alta rigurosidad (0.2X SSC, 0.1% SDS, 65°C). Las condiciones de rigurosidad apropiadas que promueven la hibridación de ADN, por ejemplo, 6.0X cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente una temperatura de 45°C, seguido de un lavado de 2.0X SSC a una temperatura de 50°C son conocidas por los expertos en la técnica, 6.3.1-6.3.6. Por ejemplo, la concentración de sal en la etapa de lavado se puede seleccionar desde una rigurosidad baja de aproximadamente 2.0X SSC a una temperatura de 50°C hasta una rigurosidad alta de aproximadamente 0.2X SSC a una temperatura de 50°C. Además, la temperatura en la etapa de lavado se puede aumentar desde condiciones de baja rigurosidad a temperatura ambiente, aproximadamente a una temperatura de 22°C, hasta condiciones de alta rigurosidad a aproximadamente una temperatura de 65°C. Tanto la temperatura como la sal pueden variar, o la temperatura o la concentración de sal se pueden mantener constantes mientras se cambia la otra variable. Tales condiciones selectivas toleran poca o ninguna discrepancia entre la sonda y la cadena molde o diana. La detección de secuencias de ADN a través de la hibridación es bien conocida por los expertos en la técnica, y las enseñanzas de las patentes de EE.UU. n° 4,965,188 y 5,176,995 son ejemplos de los métodos de análisis de hibridación.

En una realización particularmente preferida, un ácido nucleico se hibridará específicamente con uno o más de los cebadores (o amplicones u otras secuencias) ejemplificados o sugeridos en la presente memoria, que incluyen complementos y fragmentos de los mismos, en condiciones de alta rigurosidad. En un aspecto de la presente invención, una molécula de ácido nucleico marcadora tiene la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 3-14, o complementos y/o fragmentos de la misma.

En otro aspecto de la presente invención, una molécula de ácido nucleico marcadora comparte entre 80% y 100% o 90% y 100% de identidad de secuencia con tales secuencias de ácido nucleico. En un aspecto adicional de la presente invención, una molécula de ácido nucleico marcadora comparte entre el 95% y el 100% de identidad de secuencia con tal secuencia. Tales secuencias se pueden utilizar como marcadores en los métodos de mejora vegetal para identificar la progenie de cruzamientos genéticos. La hibridación de la sonda con la molécula de ADN diana se puede detectar mediante cualquier número de métodos conocidos por los expertos en la técnica, estos pueden incluir, pero no se limitan a, etiquetas fluorescentes, etiquetas radiactivas, etiquetas basadas en anticuerpos y etiquetas quimioluminiscentes.

Con respecto a la amplificación de una secuencia de ácido nucleico diana (*p. ej.*, mediante PCR) que utiliza un par de cebadores de amplificación particular, las "condiciones rigurosas" son condiciones que permiten que el par de cebadores se hibride solo con la secuencia de ácido nucleico diana a la que un cebador que tiene la correspondiente secuencia de tipo salvaje (o su complemento) se uniría y, preferiblemente, produciría un único producto de amplificación, el amplicón.

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

Como se utiliza en la presente memoria, "ADN amplificado" o "amplicón" se refiere al producto de la amplificación de ácido nucleico de una secuencia de ácido nucleico diana que forma parte de un ácido nucleico molde. Por ejemplo, para determinar si la planta de maíz resultante de un cruzamiento sexual contiene ADN genómico de eventos transgénicos de la planta de maíz de la presente invención, el ADN extraído de una muestra de tejido de planta de maíz se puede someter a un método de amplificación de ácido nucleico utilizando un par de cebadores que incluye un cebador obtenido a partir de la secuencia flanqueante en el genoma de la planta adyacente al sitio de inserción del ADN heterólogo insertado, y un segundo cebador obtenido a partir del ADN heterólogo insertado para producir un amplicón que es diagnóstico para la presencia del ADN del evento. El amplicón tiene una longitud y una secuencia que también son diagnósticas para el evento. El amplicón puede oscilar en longitud entre la longitud combinada de los pares de cebadores más un par de bases de nucleótidos, y/o la longitud combinada de los pares de cebadores más aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, ó 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750, 2000, o más pares de bases de nucleótidos (más o menos cualquiera de los incrementos enumerados anteriormente). Alternativamente, un par de cebadores se puede obtener a partir de la secuencia flanqueante en ambos lados del ADN insertado para producir un amplicón que incluye la secuencia completa de nucleótidos del inserto. Un miembro de un par de cebadores obtenido a partir de la secuencia genómica de la planta se puede localizar a una distancia de la secuencia de ADN insertada. Esta distancia puede variar desde un par de bases de nucleótidos hasta aproximadamente veinte mil pares de bases de nucleótidos. El uso del término "amplicón" excluye específicamente los dímeros de cebadores que se pueden formar en la reacción de amplificación térmica del ADN.

La amplificación de ácidos nucleicos se puede lograr mediante cualquiera de los diversos métodos de amplificación de ácidos nucleicos conocidos en la técnica, que incluye la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Una variedad de métodos de amplificación son conocidos en la técnica y se describen, entre otros, en la patente de EE.UU. n° 4,683,195 y la patente de EE.UU. n° 4,683,202. Se han desarrollado métodos de amplificación de PCR para amplificar hasta 22 kb de ADN genómico. Estos métodos, así como otros métodos conocidos en la técnica de amplificación de ADN, se pueden utilizar en la práctica de la presente invención. La secuencia del inserto de ADN heterólogo transgénico o la secuencia genómica flanqueante de un evento de maíz objeto se puede verificar (y corregirse si es necesario) amplificando tales secuencias del evento utilizando cebadores obtenidos a partir de las secuencias proporcionadas en la presente memoria seguidas de secuenciación de ADN estándar del amplicón de PCR o del ADN clonado.

El amplicón producido por estos métodos puede ser detectado por una pluralidad de técnicas. La electroforesis en gel de agarosa y la tinción con bromuro de etidio es un método común bien conocido para detectar amplicones de ADN. Otro método de este tipo es el análisis genético de bits, donde se diseña un oligonucleótido de ADN que se solapa tanto con la secuencia de ADN genómica flanqueante adyacente como a la secuencia de ADN insertada. El oligonucleótido se inmoviliza en pocillos de una placa de micropocillos. Tras la PCR de la región de interés (utilizando un cebador en la secuencia insertada y uno en la secuencia genómica flanqueante adyacente), se puede hibridar un producto de PCR monocatenario con el oligonucleótido inmovilizado y servir como molde para una reacción de extensión de una sola base utilizando una ADN polimerasa y ddNTPs específicos marcados para la siguiente base esperada. La lectura puede ser fluorescente o basada en ELISA. Una señal indica la presencia de la secuencia flanqueante/inserto debido a una amplificación exitosa, hibridación y extensión de una sola base.

Otro método es la técnica de pirosecuenciación descrita por Winge (Innov. Pharma. Tech. 00:18-24, 2000). En este método, se diseña un oligonucleótido que solapa con la unión de ADN genómico adyacente y ADN del inserto. El oligonucleótido se hibrida con un producto de PCR monocatenario de la región de interés (un cebador en la secuencia insertada y otro 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 luminosa indica la presencia de la secuencia flanqueante/inserto del transgén debido a la amplificación exitosa, la hibridación y la extensión de una o varias bases.

- 5 La polarización fluorescente es otro método que se puede utilizar para detectar un amplicón. Siguiendo este método, se diseña un oligonucleótido que solapa con la unión de ADN genómico flanqueante e insertado. El oligonucleótido se hibrida a un producto de PCR monocatenario de la región de interés (un cebador en el ADN insertado y otro 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 da como resultado la incorporación del ddNTP. La incorporación se
10 puede medir como un cambio en la polarización utilizando un fluorómetro. Un cambio en la polarización indica la presencia de la secuencia flanqueante/inserto del transgén debido a una amplificación, hibridación y extensión exitosa de base única.

- 15 TAQMAN (PE Applied Biosystems, Foster City, California) es un método para detectar y cuantificar la presencia de una secuencia de ADN. Brevemente, se diseña una sonda oligonucleotídica FRET que solapa con la unión del ADN genómico flanqueante y del inserto. La sonda FRET y los cebadores de PCR (un cebador en la secuencia de ADN del inserto y uno en la secuencia genómica flanqueante) se ciclan en presencia de una polimerasa termoestable y dNTP. Durante la amplificación específica, la ADN polimerasa Taq limpia y libera el resto fluorescente del resto de extinción en la sonda FRET. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia flanqueante/inserto del transgén debido a una exitosa amplificación e hibridación.

- 20 Las balizas moleculares se han descrito para uso en la detección de secuencias. Brevemente, se diseña una sonda oligonucleotídica FRET que solapa con la unión de ADN genómico flanqueante y del inserto. La estructura única de la sonda FRET hace que contenga una estructura secundaria que mantiene los restos fluorescentes y de extinción muy cerca. La sonda FRET y los cebadores de PCR (un cebador en la secuencia de ADN del inserto y otro en la secuencia genómica flanqueante) se ciclan en presencia de una polimerasa termoestable y dNTP. Tras la exitosa amplificación
25 por PCR, la hibridación de la sonda FRET con la secuencia diana da como resultado la eliminación de la estructura secundaria de la sonda y la separación espacial de los restos fluorescentes y de extinción. Se produce una señal fluorescente. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia inserto del transgén/genómica flanqueante debido a una amplificación e hibridación exitosas.

- 30 Habiendo descrito una localización en el genoma del maíz que es excelente para una inserción, la presente invención también comprende una semilla de maíz y/o una planta de maíz que comprende además al menos un inserto no *aad1* en la vecindad general de esta localización genómica. En estos aspectos generales, se puede utilizar una recombinación homóloga dirigida, por ejemplo. Este tipo de tecnología es el objeto de, por ejemplo, el documento WO 03/080809 A2 y la correspondiente solicitud de EE.UU. publicada (US 20030232410).

- 35 Los siguientes ejemplos se incluyen para ilustrar los procedimientos para practicar la invención y para demostrar ciertas realizaciones preferidas de la invención. Estos ejemplos no deben interpretarse como limitantes. Los expertos en la técnica deberían apreciar que las técnicas descritas en los siguientes ejemplos representan enfoques específicos utilizados para ilustrar los modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los expertos en la técnica deberían, a la luz de la presente descripción, apreciar que se pueden realizar muchos cambios en estas realizaciones específicas mientras se obtienen resultados iguales o similares. A menos que se indique lo contrario, todos los porcentajes son
40 en peso y todas las proporciones de la mezcla de disolventes son en volumen, a menos que se indique lo contrario.

Las siguientes abreviaturas se utilizan a menos que se indique lo contrario.

	AAD-1	ariloxialcanoato dioxigenasa 1
	pb	pares de bases
	°C	grados Celcius
45	ADN	ácido desoxirribonucleico
	DIG	digoxigenina
	EDTA	ácido etilenediaminotetraacético
	kb	kilobase
	µg	microgramo
50	µL	microlitro
	mL	millilitro
	M	masa molar

OLP	sonda solapante, por sus siglas en inglés
PCR	reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés
PTU	unidad de transcripción de plantas, por sus siglas en inglés
5 SDS	dodecilsulfato sódico
SOP	protocolo de operación estándar, por sus siglas en inglés
SSC	una disolución tampón que contiene una mezcla de cloruro sódico y citrato sódico, pH 7.0
TBE	una disolución tampón que contiene una mezcla de Tris base, ácido bórico y EDTA, pH 8.3
V	voltios

10 Ejemplos

Ejemplo 1. Transformación y selección del evento de AAD-1 pDAS1740-278

El evento AAD1, pDAS1740-278, fue producido por WHISKER - transformación mediada de la línea de maíz Hi-II. El método de transformación utilizado se describe en la solicitud de patente de EE. UU. # 20090093366. Un fragmento FspI del plásmido pDAS1740, también denominado pDAB3812 (Figura 1) se transformó en la línea de maíz. Este constructo de plásmido contiene el casete de expresión de la planta que contiene el RB7 MARv3 :: promotor de Ubiquitina 1 de Zea mays v2 // AAD1 v3 // PER5 3'UTR de Zea mays:: unidad de transcripción de plantas (PTU) de RB 7 MARv4.

Se produjeron numerosos eventos. Aquellos eventos que sobrevivieron y produjeron tejido calloso resistente a haloxifop, sano se les asignó códigos de identificación únicos que representan supuestos eventos de transformación y se transfirieron continuamente a un medio de selección nuevo. Las plantas se regeneraron a partir de tejido obtenido a partir de cada evento único y se transfirieron al invernadero.

Se tomaron muestras de hojas para el análisis molecular para verificar la presencia del transgén AAD-1 mediante transferencia Southern, confirmación de borde de ADN y confirmación asistida de marcador genómico. Las plantas T0 positivas se polinizaron con líneas puras para obtener semillas T1. Se seleccionaron las plantas T1 de evento pDAS1470-278-9 (DAS-40278-9), se autopolinizaron y se caracterizaron durante cinco generaciones. Mientras tanto, las plantas T1 se retrocruzaron y se intrograsaron en germoplasma elite (XHH13) mediante selección asistida por marcadores durante varias generaciones. Este evento se generó a partir de un aislado transformado independiente. El evento se seleccionó en base a sus características únicas, tal como el sitio de inserción único, la segregación mendeliana normal y la expresión estable, y una combinación superior de eficacia, que incluye tolerancia a herbicidas y rendimiento agronómico en orígenes genotípicos amplios y sobre múltiples localizaciones ambientales. Los siguientes ejemplos contienen los datos que se utilizaron para caracterizar el evento pDAS-1740-278-9.

Ejemplo 2. Caracterización del evento pDAS1740-278-9 a través de transferencia Southern

Se utilizó el análisis de transferencia Southern para establecer el patrón de integración del fragmento de ADN insertado y determinar el número de copia/inserto del gen *aad-1* en el evento pDAS-1740-278-9 (DAS-40278-9). Se generaron datos para demostrar la integración y la integridad del transgén *aad-1* insertado en el genoma del maíz.

Los datos de transferencia Southern sugirieron que el inserto del fragmento pDAS1740/*Fsp I* en el evento de maíz DAS-40278-9 se produjo como una integración simple de una copia única e intacta de la PTU de *aad-1* del plásmido pDAS1740. Se realizó un análisis detallado de transferencia Southern utilizando sondas específicas para el gen, promotor, terminador y otros elementos de regulación contenidos en la región del plásmido y enzimas de restricción descriptivas que tienen sitios de escisión localizados dentro del plásmido y producen fragmentos de hibridación internos al plásmido o fragmentos que abarcan la unión del plásmido con ADN genómico de maíz (fragmentos de borde). Los pesos moleculares indicados a partir de la hibridación Southern para la combinación de la enzima de restricción y la sonda fueron únicos para el evento y establecieron sus patrones de identificación. Estos análisis también mostraron que el fragmento de plásmido se había insertado en el ADN genómico de maíz sin reordenamientos de la PTU de *aad-1*. Se observaron fragmentos de hibridación idénticos en cinco generaciones distintas del evento transgénico de maíz DAS-40278-9 que indica la estabilidad de la herencia de la inserción de PTU de *aad-1* a través de las generaciones. La hibridación con una mezcla de tres sondas de cadena principal localizadas fuera del sitio de restricción de *Fsp I* en el plásmido pDAS1740 no detectó ningún fragmento específico de ADN/gen, lo que indica la ausencia del gen de resistencia a la ampicilina y la ausencia de las otras regiones de la cadena principal del vector inmediatamente adyacentes a los sitios de restricción *Fsp I* del plásmido pDAS1740 en el evento transgénico de maíz DAS-40278-9. El mapa ilustrado del inserto en el evento de maíz DAS-40278-9 que incorpora *aad-1* se presenta en las Figuras 2-3.

Ejemplo 2.1 Recolección de muestras de hojas de maíz y aislamiento de ADN genómico (ADNg)

El ADNg preparado a partir de la hoja de las plantas individuales del evento de maíz DAS-40278-9 que incorpora *aad-1*. El ADNg se extrajo a partir del tejido de la hoja recogido de plantas individuales que portan el evento de maíz DAS-40278-9 que incorpora *aad-1*. Se utilizaron semillas de maíz transgénicas de cinco generaciones distintas del evento DAS-40278-9. Se seleccionaron veinte plantas de maíz individuales, obtenidas a partir de cuatro plantas por generación, para el evento DAS-40278-9. Además, se aisló el ADNg de una planta de maíz convencional, XHH13, que contiene el origen genético que es representativo de la línea de la sustancia, sin el gen *aad-1*.

Antes de aislar el ADNg, se tomaron incisiones de hojas de cada planta para someter a ensayo la expresión de la proteína *aad-1* utilizando un kit de tiras reactivas rápido (American Bionostica, Swedesboro, NJ) según el procedimiento recomendado por el fabricante. Cada muestra de incisión de hoja recibió una puntuación de + o - por la presencia o ausencia de *aad-1*, respectivamente. Solo las plantas positivas de las cinco generaciones del evento DAS-40278-9 se sometieron a una caracterización adicional.

Se recogieron muestras de hojas de maíz de las plantas individuales del evento DAS-40278-9 y el control convencional XHH13. Las muestras de hojas se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a una temperatura de aproximadamente -80°C hasta su uso.

Se extrajo ADN genómico individual de tejido de hoja de maíz congelado siguiendo el método estándar de CTAB. Cuando fue necesario, parte del ADN genómico se purificó adicionalmente con Qiagen Genomic-Tip (Qiagen, Valencia, CA) siguiendo los procedimientos recomendados por el fabricante. Después de la extracción, el ADN se cuantificó espectrofluorométricamente utilizando el reactivo Pico Green (Invitrogen, Carlsbad, CA). El ADN se visualizó después en un gel de agarosa para confirmar los valores del análisis Pico Green y para determinar la calidad del ADN.

Ejemplo 2.2 Digestión y separación de ADN

Para la caracterización molecular del ADN, se digirieron nueve microgramos (9 µg) de ADN genómico de la muestra de ADN del evento de maíz DAS-40278-9 y el control convencional añadiendo aproximadamente de cinco a once unidades de enzima de restricción seleccionada por µg de ADN y el tampón de reacción correspondiente a cada muestra de ADN. Cada muestra se incubó a una temperatura de aproximadamente 37°C durante la noche. Las enzimas de restricción *EcoR I*, *Nco I*, *Sac I*, *Fse I* y *Hind III* se utilizaron para los productos de digestión (New England Biolabs, Ipswich, MA). Se preparó una muestra control de hibridación positiva combinando ADN plasmídico, pDAS1740 (pDAB3812), con ADN genómico del control convencional en una proporción aproximadamente equivalente a 1 copia de transgén por genoma del maíz, y se digirió utilizando los mismos procedimientos y enzima de restricción que las muestras de ensayo. El ADN del control de maíz convencional (XHH13) se digirió utilizando los mismos procedimientos y enzimas de restricción que las muestras de ensayo para servir como control negativo.

Las muestras de ADN digeridas se precipitaron con Quick-Precip (Edge BioSystems, Gaithersburg, MD) y se resuspendieron en 1×Blue Juice (Invitrogen, Carlsbad, CA) para lograr el volumen deseado para la carga del gel. Las muestras de ADN y los marcadores de tamaño molecular se sometieron a electroforesis a través de geles de agarosa al 0,8% con tampón 1×TBE (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) a 55-65 voltios durante aproximadamente 18-22 horas para lograr la separación de fragmentos. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (Invitrogen, Carlsbad, CA) y el ADN se visualizó bajo luz ultravioleta (UV).

Ejemplo 2.3 Transferencia Southern y tratamiento de membrana

El análisis de transferencia Southern se realizó esencialmente como se describe por Memelink, *et al.* (1994) Southern, Northern, and Western Blot Analysis. Plant Mol. Biol. Manual F1:1-23. Brevemente, después de la separación electroforética y la visualización de los fragmentos de ADN, los geles se despurinaron con HCl 0.25N (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) durante aproximadamente 15 minutos y después se expusieron a una solución desnaturalizante (AccuGENE, Sigma, St. Louis, MO) durante aproximadamente 30 minutos, seguido de una solución neutralizante (AccuGENE, Sigma, St. Louis, MO) durante al menos 30 minutos. La transferencia Southern se realizó durante la noche en membranas de nailon (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) utilizando un sistema de absorción con 10×SSC (Sigma, St. Louis, MO). Después de la transferencia, las membranas se lavaron en una solución 2×SSC y el ADN se unió a la membrana mediante reticulación UV. Este método dio como resultado membranas de transferencia Southern listas para la hibridación.

Ejemplo 2.4 Marcaje de sonda de ADN e hibridación

Los fragmentos de ADN unidos a la membrana de nylon se detectaron utilizando una sonda marcada. Las sondas utilizadas para el estudio se generaron mediante una incorporación basada en PCR de un nucleótido marcado con digoxigenina (DIG), [DIG-11]-dUTP, a partir de fragmentos generados por cebadores específicos con elementos génicos y otras regiones del plásmido pDAS 1740. La generación de sondas de ADN por síntesis de PCR se llevó a cabo utilizando un kit de síntesis de sonda PCR DIG (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) siguiendo los procedimientos recomendados por el fabricante. En la Tabla 1 se describe una lista de las sondas utilizadas para el estudio.

Tabla 1. Localización y longitud de sondas utilizadas en el análisis Southern.

Nombre de la sonda	Elemento genético	Posición en pDAS1740 (pb)	Longitud (pb)
OLP1-3	promotor de ubiquitina (ZmUbi1)	28-2123	2096
OLP2	gen <i>aad-1</i>	2103-3022	920
OLP3A	terminador peroxidasa (ZmPer5)	3002-3397	396
OLP3B	RB7 Mar v4	3375-4865	1491
OLP4ABC	Cadena principal (OLP4A)	4900-5848	949
	Cadena principal del gen Ap ^r (OLP4B)	5828-6681	855
	Cadena principal (OLP4C)	6660-7144	485
OLP5-2	RB7 Mar v3	7124-8507	1384

Las sondas marcadas se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa para determinar su calidad y cantidad. Después se utilizó una cantidad deseada de sonda marcada para la hibridación con el ADN diana en las membranas de nylon para la detección de los fragmentos específicos utilizando los procedimientos descritos para la solución de DIG Easy Hyb (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Brevemente, las transferencias de membrana de nailon con ADN fijado se lavaron brevemente en 2xSSC y se prehibridaron con 20-25 ml de solución de DIG Easy Hyb precalentada en botellas de hibridación a una temperatura de aproximadamente 50°C durante un mínimo de 30 minutos en un horno de hibridación. La solución de prehibridación se decantó después y se reemplazó con 20 ml de solución de DIG Easy Hyb precalentada que contenía una cantidad deseada de sondas específicas predesnaturalizadas hirviendo en agua durante 5 minutos. La etapa de hibridación se realizó después a una temperatura de aproximadamente 40-60°C durante la noche en el horno de hibridación.

Ejemplo 2.5 Detección

Al final de la hibridación de la sonda, las soluciones de DIG Easy Hyb que contenían las sondas se decantaron en tubos limpios y se almacenaron a una temperatura de -20°C. Estas sondas se podrían reutilizar 2 o 3 veces según el procedimiento recomendado por el fabricante. Las transferencias de membrana se enjuagaron brevemente y se lavaron dos veces en recipientes de plástico limpios con tampón de lavado de baja rigurosidad (2xSSC, SDS al 0.1%) durante aproximadamente 5 minutos a temperatura ambiente, seguido de lavado dos veces con tampón de lavado de alta rigurosidad (0,1xSSC, 0.1% SDS) durante 15 minutos cada uno a una temperatura de aproximadamente 65°C. Las transferencias de membrana se transfirieron después a otros recipientes de plástico limpios y se lavaron brevemente con 1x de tampón de lavado del conjunto de tampón de lavado DIG y tampón de bloqueo (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) durante aproximadamente 2 minutos, se procedió a bloquear en 1x tampón de bloqueo durante un mínimo de 30 minutos, seguido de incubación con anticuerpo anti-DIG-AP (fosfatasa alcalina) (dilución 1:5000, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) en 1x tampón de bloqueo durante un mínimo de 30 minutos. Después de 2-3 lavados con 1x tampón de lavado, las sondas de ADN específicas permanecen unidas a las transferencias de membrana y los patrones de ADN marcados con DIG se visualizaron utilizando el sistema de detección quimioluminiscente de ácidos nucleicos con CDP-Star (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las transferencias se expusieron a una película quimioluminiscente (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) durante uno o más intervalos de tiempo para detectar fragmentos de hibridación y visualizar patrones de tamaño molecular. Después, las películas se desarrollaron con un desarrollador de películas All-Pro 100 Plus (Konica SRX-101) y las imágenes se escanearon para el informe. El número y el tamaño de las bandas detectadas se documentaron para cada sonda. El marcador II de peso molecular de ADN marcado con DIG (MWM DIG II), visible después de la detección de DIG como se describe, se utilizó para determinar el tamaño del fragmento de hibridación en las transferencias Southern.

Ejemplo 2.6 Separación de la sonda

Las sondas de ADN se separaron de las transferencias a membranas después de que se obtuvieron los datos de hibridación Southern, y las transferencias a membranas se pudieron reutilizar para la hibridación con una sonda de ADN diferente según los procedimientos recomendados por el fabricante (DIG Application Manual for Filter Hybridization, (2003). Roche Diagnostics). Brevemente, después de la detección de la señal y la exposición de la película, las transferencias a membranas se enjuagaron completamente con agua Milli-Q y seguidamente se lavaron

dos veces en tampón de separación (NaOH 0.2N, 0.1% de SDS) durante aproximadamente 15 minutos a temperatura ambiente o a 37°C. Las transferencias a membranas después se lavaron brevemente en 2×SSC y estaban listas para la prehibridación e hibridación con otra sonda de ADN. Las transferencias a membranas se expusieron a una nueva película quimioluminiscente para garantizar que se separaban todas las sondas de ADN antes de proceder a la siguiente hibridación. Las películas expuestas de nuevo se mantuvieron junto con el paquete de datos de hibridación anterior en el archivo de estudio para su registro.

Ejemplo 2.7 Resultados de transferencia Southern

Los tamaños de fragmentos esperados y observados con un producto de digestión y una sonda particulares, en base a los sitios de enzimas de restricción conocidos del fragmento pDAS1740/*Fsp* I, se dan en la Tabla 2. Se identificaron dos tipos de fragmentos a partir de estos productos de digestión e hibridaciones: fragmentos internos, donde los sitios de enzimas conocidos flanquean la región de sonda y están completamente contenidos dentro del fragmento pDAS1740/*Fsp* I y fragmentos de borde donde un sitio de enzima conocido está localizado en un extremo de la región de sonda y se espera un segundo sitio en el genoma del maíz. Los tamaños de los fragmentos de borde varían según el evento porque, en la mayoría de los casos, los sitios de integración de fragmentos de ADN son únicos para cada evento. Los fragmentos de borde proporcionan un medio para localizar un sitio de enzimas de restricción en relación con el ADN integrado y evaluar el número de inserciones de ADN. En base a los análisis de transferencia Southern completados en este estudio, se concluyó que se insertó una copia única de una PTU de *aad-1* intacta del plásmido pDAS1740/*Fsp* I en el genoma del maíz del evento DAS-40278-9 como se detalla en el mapa de inserción (Figuras 2-3).

Tabla 2. Fragmentos de hibridación estimados y observados en el análisis de transferencia Southern

Sonda de ADN	Enzimas de restricción		Tamaños de fragmento esperados (pb) ¹	Tamaños de fragmento observados (pb) ²
<i>aad-1</i>	<i>EcoR</i> I	pDAS1740	8512	8512
		XHH13	ninguno	ninguno
		DAS-40278-9	>3382 (borde)	~12000
	<i>Nco</i> I	pDAS1740	8512	8512
		XHH13	ninguno	ninguno
		DAS-40278-9	>2764 (borde)	~4000
	<i>Sac</i> I	pDAS1740	8512	8512
		XHH13	ninguno	ninguno
		DAS-40278-9	>4389 (borde)	~16000
	<i>Fse</i> I / <i>Hind</i> III	pDAS1740	3361	3361
		XHH13	ninguno	ninguno
		DAS-40278-9	3361	3361
Promotor ZmUbi1	<i>Nco</i> I	pDAS1740	8512	8512, ~3600*
		XHH13	ninguno	~3600*
		DAS-40278-9	>3472 (borde)	~6300, ~3600*
	<i>Sac</i> I	pDAS1740	8512	8512, ~3800*
		XHH13	ninguno	~3800*
		DAS-40278-9	>4389 (borde)	~3800*, ~16000
	<i>Fse</i> I / <i>Hind</i> III	pDAS1740	3361	3361, ~6400*
		XHH13	ninguno	~6400*
		DAS-40278-9	3361	3361, ~6400*#

Sonda de ADN	Enzimas de restricción		Tamaños de fragmento esperado (pb) ¹	Tamaños de fragmento observado (pb) ²
Terminador ZmPer5	Nco I	pDAS1740	8512	8512, ~3900*
		XHH13	ninguno	~3900*
		DAS-40278-9	>2764 (borde)	~4000, ~3900*
	Sac I	pDAS1740	8512	8512, ~9000*
		XHH13	ninguno	~9000*
		DAS-40278-9	>1847 (borde)	~1900, ~9000*
	Fse I / Hind III	pDAS1740	3361	3361, ~2100*
		XHH13	ninguno	~2100*
		DAS-40278-9	3361	3361, ~2100*
RB7 mar4	Nco I	pDAS1740	8512	8512
		XHH13	ninguno	ninguno
		DAS-40278-9	>2764 (borde) >3472 (borde)	~4000 ~6300
	Sac I	pDAS1740	8512	8512
		XHH13	ninguno	ninguno
		DAS-40278-9	>1847 (borde) >4389 (borde)	~1900 ~16000
RB7 mar3	Sco I	pDAS 1740	8512	8512
		XHH13	ninguno	ninguno
		DAS-40278-9	>2764 (borde) >3472 (borde)	~4000 ~6300
	Sac I	pDAS1740	8512	8512
		XHH13	ninguno	ninguno
		DAS-40278-9	>1847 (borde) >4389 (borde)	~1900 ~16000
cadena principal	Nco I	pDAS1740	8512	8512
		XHH13	ninguno	ninguno
		DAS-40278-9	ninguno	ninguno
	Sac I	pDAS1740	8512	8512
		XHH13	ninguno	ninguno
		DAS-40278-9	ninguno	ninguno

Nota: * Un asterisco después del tamaño del fragmento observado indica la hibridación de secuencia endógena que se detectó sobre todas las muestras (que incluye los controles negativos)

5 # Dobletes en el control convencional, BC3S1 y algunas muestras de BC3S2

1. Los tamaños de fragmentos esperados están basados en el mapa de plásmido del pDAS1740 (pDAB3812) como se muestra en la Figura 1.

10 2. Los tamaños de los fragmentos observados se consideran aproximadamente a partir de estos análisis y están basados en los tamaños indicados de los fragmentos del Marcador II de peso molecular de ADN marcado con DIG. Debido a la incorporación de moléculas DIG para la visualización, los fragmentos marcadores normalmente se analizan aproximadamente un 5-10% más que su peso molecular real indicado.

Las enzimas de restricción con sitio de restricción único en el plásmido pDAS1740, EcoR I, Nco I, Sac I, Fse I/Hind III, se seleccionaron para caracterizar el inserto del gen *aad-1* en el evento DAS-40278-9. Se estimó el fragmento de

borde de >3382 pb, >2764 pb, >4389 pb para hibridarse con la sonda del gen *aad-1* después de la digestión con *EcoR* I, *Nco* I y *Sac* I, respectivamente (Tabla 2). Cuando se utilizaron *EcoR* I, *Nco* I y *Sac* I, se observó una banda de hibridación de *aad-1* de ~12000 pb, ~4000 pb y ~16000 pb, respectivamente, que indica un sitio único de inserción del gen *aad-1* en el genoma del maíz de evento DAS-40278-9. Se seleccionó la doble digestión con *Fse* I y *Hind* III para liberar un fragmento de 3361 pb que contiene la unidad de transcripción de plantas de *aad-1* (PTU, promotor/gen/terminador) (Tabla 2). El fragmento de 3361 pb estimado se observó con la sonda del gen *aad-1* después de la digestión con *Fse* I/*Hind* III. Los resultados obtenidos con las cuatro enzimas/digestión con combinación de enzimas de la muestra DAS-40278-9 seguida de hibridación de la sonda del gen *aad-1* indicaron que una única copia de una PTU de *aad-1* intacta del plásmido pDAS1740 se insertó en el genoma del maíz del evento DAS-40278-9.

Las enzimas de restricción *Nco* I, *Sac* I y *Fse* I/*Hind* III se seleccionaron para caracterizar la región promotora (ZmUbi1) para *aad-1* en el evento DAS-40278-9. Se espera que las digestiones de *Nco* I y *Sac* I generen un fragmento de región de borde de >3472 pb y >4389 pb, respectivamente, cuando se hibridan con sondas de ADN específicamente con la región promotora de ZmUbi1 (Tabla 2). Se detectaron dos bandas de hibridación de ~6300 pb y 3600 pb con la sonda del promotor ZmUbi1 después de la digestión con *Nco* I. Sin embargo, la banda de ~3600 pb estaba presente en todos los carriles de muestra, que incluye los controles convencionales, lo que sugiere que la banda de ~3600 pb es una banda de señal no específica que resulta de la unión homóloga de la sonda del promotor de ubiquitina derivada del maíz (ZmUbi1) con el gen *ubi* endógeno del maíz. Por el contrario, la banda de señal de ~6300 pb se detectó en las muestras de DAS-40278-9 analizadas pero no en los controles convencionales, lo que indica que la banda de ~6300 pb es específica de la sonda del promotor ZmUbi1 del plásmido pDAS1740 y, por lo tanto, es la banda *Nco* I/ZmUbi1 esperada, indicada en la Tabla 2. De manera similar, se detectaron dos bandas de hibridación de ~3800 pb y ~16000 pb con la sonda del promotor ZmUbi1 después de la digestión con *Sac* I. La banda de ~3800 pb apareció en todos los carriles de muestra, que incluye los controles convencionales y, por lo tanto, se considera como una hibridación no específica de la sonda del promotor ZmUbi1 con el gen *ubi* endógeno del maíz. La banda de hibridación de ~16000 pb que solo está presente en las muestras de DAS-40278-9 se considera la banda *Sac* I/ZmUbi1 esperada. Se espera que la doble digestión con *Fse* I/*Hind* III libere el fragmento PTU de *aad-1* de 3361 pb que se hibrida con la sonda del promotor ZmUbi1 (Tabla 2). Esta banda de 3361 pb y una banda de hibridación no específica de ~6400 pb se detectaron mediante la sonda del promotor ZmUbi1 después de la digestión con *Fse* I/*Hind* III. La banda de ~6400 pb se considera una unión no específica de la sonda del promotor ZmUbi1 con el gen *ubi* endógeno del maíz porque esta banda está presente en todos los carriles de muestra, que incluyen los controles convencionales. Además, se observó otra banda muy cercana a ~6400 pb en el control convencional, BC3S1 y algunas de las muestras de BC3S2. Esta banda adicional muy cercana a ~6400 pb también se considera inespecífica porque está presente en los carriles de muestra de XHH13 control convencionales y lo más probable es que esté asociada con el fondo genético de XHH13.

Se seleccionaron las mismas enzimas de restricción/combinación de enzimas, *Nco* I, *Sac* I y *Fse* I/*Hind* III para caracterizar la región del terminador (ZmPer5) para *aad-1* en el evento DAS-40278-9. Se espera que la digestión con *Nco* I genere un fragmento de región de borde de >2764 pb cuando se hibrida con sondas de ADN específicamente con la región terminadora de ZmPer5 (Tabla 2). Se detectaron dos bandas de hibridación de ~4000 pb y ~3900 pb con la sonda del terminador ZmPer5 después de la digestión con *Nco* I. La banda de ~3900 pb estaba presente en todos los carriles de muestra, que incluye los controles convencionales, lo que sugiere que la banda de ~3900 pb es una banda de señal no específica probablemente debido a la unión homóloga de la sonda del terminador del gen de peroxidasa derivado de maíz (ZmPer5) con el gen *per* del maíz endógeno. Por el contrario, la banda de señal de ~4000 pb se detectó en las muestras de DAS-40278-9 analizadas pero no en los controles convencionales, lo que indica que la banda de ~4000 pb es específica de la sonda del terminador ZmPer5 del plásmido pDAS1740 y, por lo tanto, es la banda *Nco* I/ZmPer5 esperada indicada en la Tabla 2. Se espera que un fragmento de borde de >1847 pb se hibride con la sonda del terminador ZmPer5 después de la digestión con *Sac* I. Se detectaron dos bandas de hibridación de ~1900 pb y ~9000 pb con la sonda del terminador ZmPer5 después de la digestión con *Sac* I. La banda de ~9000 pb apareció en todos los carriles de muestra, que incluye los controles convencionales y, por lo tanto, se considera como una hibridación no específica de la sonda del terminador ZmPer5 con el gen *per* de maíz endógeno. La banda de hibridación de 1900 bp que solo estaba presente en las muestras de DAS-40278-9 se considera la banda *Sac* I/ZmPer5 esperada. Se espera que la doble digestión con *Fse* I/*Hind* III libere el fragmento PTU de *aad-1* de 3361 pb que se hibrida con la sonda del terminador ZmPer5 (Tabla 2). Esta banda de 3361 pb y una banda de hibridación no específica adicional de ~2100 pb se detectaron mediante la sonda del terminador ZmPer5 después de la digestión con *Fse* I/*Hind* III. La banda adicional de ~2100 pb es la unión no específica de la sonda del terminador ZmPer5 con el gen endógeno del maíz, ya que esta banda está presente en todos los carriles de muestra, que incluye los controles negativos. Los resultados obtenidos con estas digestiones de la muestra DAS-40278-9 seguidas por la hibridación de la sonda del promotor ZmUbi1 y de la sonda del terminador ZmPer5 confirmaron además que una única copia de una PTU de *aad-1* intacta del plásmido pDAS1740 se insertó en el genoma del maíz del evento DAS-40278-9.

Las enzimas de restricción, *Nco* I y *Sac* I, se seleccionaron para caracterizar el resto de los componentes del fragmento pDAS1740/*Fsp* I en el evento de maíz DAS-40278-9 que incorpora ADD-1 (Tabla 2). Las secuencias de ADN de los componentes RB7 Mar v3 y RB7 Mar v4 tienen una identidad de más del 99,7%, por lo que se esperaba que las sondas de ADN específicas para RB7 Mar v3 o RB7 Mar v4 se hibridaron con fragmentos de ADN que contenían cualquiera de las versiones de RB7 Mar. Se esperaba que dos fragmentos de borde de >2764 pb y >3472 pb se hibridaran con las sondas de RB7 Mar v4 y RB7 Mar v3 después de la digestión con *Nco* I (Tabla 2). Se observaron dos bandas de hibridación de ~4000 pb y ~6300 pb con la sonda de RB7 Mar v4 o RB7 Mar v3 después de la digestión

con *Nco* I en muestras de DAS-40278-9. De manera similar, se estimaron dos fragmentos de borde de >1847 pb y >4389 pb con las sondas de RB7 Mar v4 y RB7 Mar v3 después de la digestión con *Sac* I (Tabla 2). Se detectaron bandas de hibridación de ~1900 pb y ~16000 pb en muestras de DAS-40278-9 con la sonda de RB7 Mar v4 o RB7 Mar v3 después de la digestión con *Sac* I.

Tomados en conjunto, los resultados de hibridación Southern obtenidos con estas sondas de elementos indicaron que el ADN insertado en el evento de maíz DAS-40278-9 contiene una PTU de *aad-1* intacta junto con las regiones de unión a la matriz RB7 Mar v3 y RB7 Mar v4 en los extremos 5' y 3' de la inserción, respectivamente.

Ejemplo 2.8 Ausencia de secuencias de cadena principal

La combinación de proporción molar igual de tres fragmentos de ADN (Tabla 1) que cubren casi toda la región de la cadena principal de *Fsp* I (4867-7143 pb en el plásmido pDAS1740) del plásmido pDAS1740 se utilizó como la sonda de cadena principal para caracterizar el evento de maíz DAS-40278-9 que incorpora ADD-1. El fragmento de plásmido pDAS1740/*Fsp* I se utilizó para generar el evento DAS-40278-9, por lo tanto, no se esperaba una señal de hibridación específica con la combinación de la sonda de cadena principal (Tabla 2) después de cualquier digestión con enzimas de restricción. Se confirmó que no se detectó ninguna señal de hibridación específica con la sonda de cadena principal después de la digestión con *Nco* I o *Sac* I en todas las muestras de DAS-40278-9. Los carriles de control positivo contenían las bandas de hibridación estimadas que demostraban que las sondas eran capaces de hibridarse con cualquier fragmento de ADN homólogo, si estaban presentes en las muestras. Los datos sugirieron que la inserción en el evento de maíz DAS-40278-9 no incluía ninguna secuencia de cadena principal del vector fuera de la región *Fsp* I del plásmido pDAS1740.

Se utilizaron muestras de hojas de cinco generaciones distintas del evento DAS-40278-9 para realizar el análisis de transferencia Southern para la caracterización molecular. El patrón de integración se investigó utilizando combinaciones seleccionadas de sonda y productos de digestión de enzimas de restricción para caracterizar el gen insertado, *aad-1*, así como las regiones no codificantes que incluyen el promotor, el terminador de la expresión génica y las regiones de unión a la matriz.

La caracterización de transferencia Southern del ADN insertado en el evento DAS-40278-9 indica que una única copia intacta de la PTU de *aad-1* se ha integrado en el evento DAS-40278-9. Los pesos moleculares indicados por la hibridación Southern para la combinación de la enzima de restricción y la sonda fueron únicos para el evento y establecieron sus patrones de identificación. El patrón de hibridación es idéntico en las cinco generaciones, lo que indica que el inserto es estable en el genoma del maíz. La hibridación con sondas que cubren la región de la cadena principal más allá del fragmento de transformación pDAS1740/*Fsp* I del plásmido pDAS1740 confirma que no se han incorporado secuencias de la cadena principal del vector en el evento DAS-40278-9.

Ejemplo 3. Clonación y caracterización de la secuencia de ADN en el inserto y las regiones de borde flanqueantes del evento de maíz DAS-40278-9

Para caracterizar el ADN insertado y describir el sitio de inserción genómica, se determinaron las secuencias de ADN del inserto y las regiones de borde del evento DAS-40278-9. En total, se confirmaron 8557 pb de la secuencia genómica del evento DAS-40278-9, que comprende 1873 pb de la secuencia del borde flanqueante 5', 1868 pb de la secuencia del borde flanqueante 3' y 4816 pb del inserto de ADN. El inserto de ADN de 4816 pb contiene un casete de expresión de *aad-1* intacto, un MAR v3 parcial de 259 pb en el extremo 5' y un MAR v4 parcial de 1096 pb en el extremo 3'. El análisis de secuencia reveló una inserción de 21 pb en la unión de integración 5' y una eliminación de dos pares de bases del locus de inserción del genoma del maíz. Se encontró una inserción de un par de bases en la unión de integración 3' entre el genoma del maíz y el inserto DAS-40278-9. Además, se encontró un solo cambio de base (T a C) en el inserto en la posición 5212 en la región no codificante de la 3' UTR. Ninguno de estos cambios afecta la composición del marco de lectura abierto del casete de expresión de *aad-1*.

La amplificación por PCR basada en el evento DAS-40278-9 y las secuencias de borde confirmaron que las regiones de borde eran procedentes del maíz y que las regiones de unión se podrían utilizar para la identificación específica del evento DAS-40278-9. El análisis de la secuencia que abarca las regiones de unión indicó que no se obtuvieron nuevos marcos de lectura abiertos (ORF, por sus siglas en inglés, >= 200 codones) como resultado de la inserción de ADN en el evento DAS-40278-9 y tampoco se interrumpieron los marcos de lectura abiertos genómicos por la integración de DAS-40278-9 en el genoma del maíz nativo. En general, la caracterización de las secuencias de inserto y borde del evento de maíz DAS-40278-9 que incorpora ADD-1 indicó que una única copia intacta del casete de expresión de *aad-1* se integró en el genoma del maíz nativo.

Ejemplo 3.1. Extracción y cuantificación de ADN genómico

El ADN genómico se extrajo de tejidos de hojas liofilizadas o recién molidas utilizando un método CTAB modificado. Las muestras de ADN se disolvieron en 1xTE (Tris 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM) (Fluka, Sigma, St. Louis, MO) y se cuantificaron con el método Pico Green según las instrucciones del fabricante (Molecular Probes, Eugene, OR). Para el análisis de PCR, las muestras de ADN se diluyeron con agua grado biología molecular (5 PRIME, Gaithersburg, MD) para dar como resultado una concentración de 10-100 ng/μL.

Ejemplo 3.2 Cebadores de PCR

La Tabla 3 enumera las secuencias de cebadores que se utilizaron para clonar el inserto de ADN y las regiones de borde flanqueante del evento DAS-40278-9, con las posiciones y descripciones marcadas en la Figura 4. La Tabla 4 enumera las secuencias de cebadores que se utilizaron para confirmar las secuencias de inserto y borde. Las posiciones del cebador se marcaron en las Figuras 4 y 5, respectivamente. Todos los cebadores fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies, Inc. (Coralville, IA). Los cebadores se disolvieron en agua (5 PRIME, Gaithersburg, MD) a una concentración de 100 μ M para la solución madre y se diluyeron con agua a una concentración de 10 μ M para la solución de trabajo.

10 Tabla 3. Lista de secuencias de cebadores utilizadas en la clonación del inserto en evento de maíz DAS-40278-9 y secuencia de borde flanqueante

Nombre del cebador	Tamaño (pb)	Localización (pb)	Secuencia	Propósito
5End3812_A	26	2231-2256 (-)	Seq ID No: 1: 5' – TGCACTGCAGGTCGACTCTAGAGGAT – 3'	PCR primaria para secuencia de borde 5'
5End3812_B	23	2110-2132 (-)	Seq ID No: 2: 5' – GCGGTGGCCACTATTTTCAGAAG – 3'	PCR secundaria para secuencia de borde 5'
3End3812_C	26	5535-5560 (+)	Seq ID No: 3: 5' – TTGTTACGGCATATATCCAATAGCGG – 3'	PCR primaria para secuencia de borde 3'
3End3812_D	26	5587-5612 (+)	Seq ID No: 4: 5' – CCGTGGCCTATTTTCAGAAGAAGTTC – 3'	PCR secundaria para secuencia de borde 3'
Amp 1F	23	736-758 (+)	Seq ID No: 5: 5' – ACAACCATATTGGCTTTGGCTGA – 3'	Amplificación del inserto, Amplicón 1, utilizado con Amp 1R
Amp 1R	28	2475-2502 (-)	Seq ID No: 6: 5' CCTGTTGTCAAAAATACTCAATTGTCCTT – 3'	Amplificación del inserto, Amplicón 1, utilizado con Amp 1F
Amp 2F	23	1696-1718 (+)	Seq ID No: 7: 5' – CTCCATTACAGGAGACCTCGCTTG – 3'	Amplificación del inserto, Amplicón 2, utilizado con Amp 2R
Amp 2R	23	3376-3398 (-)	Seq ID No: 8: 5' GTACAGGTCGCATCCGTGTACGA – 3'	Amplificación del inserto, Amplicón 2, utilizado con Amp 2F
Amp 3F	25	3254-3278 (+)	Seq ID No: 9: 5' CCCCCCTCTCTACCTTCTCTAGAT – 3'	Amplificación del inserto, Amplicón 3, utilizado con Amp 3R
Amp 3R	23	4931-4953 (-)	Seq ID No: 10: 5' GTCATGCCCTCAATTCTCTGACA – 3'	Amplificación del inserto, Amplicón 3, utilizado con Amp 3F
Amp 4F	23	4806-4828 (+)	Seq ID No: 11: 5' – GTCGCTTCAGCAACACCTCAGTC – 3'	Amplificación del inserto, Amplicón 4, utilizado con Amp 4R
Amp 4R	23	6767-6789 (-)	Seq ID No: 12: 5' – AGCTCAGATCAAAGACACACCCC – 3'	Amplificación del inserto, Amplicón 4, utilizado con Amp 4F

Nombre del cebador	Tamaño (pb)	Localización (pb)	Secuencia	Propósito
Amp 5F	28	6300-6327 (+)	Seq ID No: 13: 5' – TCGTTTGACTAATTTTCGTTGATGTAC 3'	Amplificación del inserto, Amplicón 5, utilizado con Amp 5R
Amp 5R	23	7761-7783 (-)	Seq ID No: 14: 5' – TCTCACTTTCGTGTCATCGGTCG 3'	Amplificación del inserto, Amplicón 5, utilizado con Amp 5F
(+): Secuencia directa; (-): Secuencia complementaria;				

Tabla 4. Lista de secuencias de cebadores utilizadas en la confirmación de ADN genómico de maíz

Nombre del cebador	Tamaño (pb)	Localización (pb)	Secuencia	Propósito
1F5End01	17	1816-1832 (+)	Seq ID No: 15: 5' – CCAGCACGAACCATTGA – 3'	Confirmación de ADN genómico de borde 5', utilizado con AI5End01
1F5End02	24	1629-1652 (+)	Seq ID No: 16: 5' – CGTGTATATAAGGICCAGAGGGTA– 3'	Confirmación de ADN genómico de borde 5', utilizado con AI5End02
AI5End01	17	4281-4297 (-)	Seq ID No: 17: 5' – TTGGGAGAGAGGGCTGA– 3'	Confirmación de ADN genómico de borde 5', utilizado con 1F5End01
AI5End02	20	4406-4426 (-)	Seq ID No: 18: 5' – TGGTAAGTGTGGAAGGCATC– 3'	Confirmación de ADN genómico de borde 5', utilizado con 1F5End02
1F3End03	20	8296-8315 (-)	Seq ID No: 19: 5' – GAGGTACAACCGGAGCGTTT– 3'	Confirmación de ADN genómico, utilizado con 1F5End03
1F3End04	19	8419-8437 (-)	Seq ID No: 20: 5' – CCGACGCTTTTCTGGAGTA– 3'	Confirmación de ADN genómico, utilizado con 1F5End04
1F5End03	22	378-399 (+)	Seq ID No: 21: 5' – TGTGCCACATAATCACGTAACA– 3'	Confirmación de ADN genómico, utilizado con 1F3End03
1F5End04	20	267-286 (+)	Seq ID No: 22: 5' – GAGACGTATGCGAAAATTTCG– 3'	Confirmación de ADN genómico, utilizado con 1F3End04
AI3End01	22	4973-4994 (+)	Seq ID No: 23: 5' – TTGCTTCAGTTCTCTATGAGC– 3'	Confirmación de ADN genómico de borde 3', utilizado con 1F3End05
1F3End05	19	7060-7078 (-)	Seq ID No: 24: 5' – TCCGTGTCCACTCCTTTGT– 3'	Confirmación de ADN genómico de borde 3', utilizado con AI3End01
1F5EndT1F	22	2033-2054 (-)	Seq ID No: 25: 5' – GCAAAGGAAACTGCCATTCTT– 3'	Amplificación de secuencia específica 278 en la unión 5'
1F5EndT1R	20	1765-1784 (+)	Seq ID No: 26: 5' – TCTCTAAGCGGCCCAAACCTT 3'	Amplificación de secuencia específica 278 en la unión 5'

Nombre del cebador	Tamaño (pb)	Localización (pb)	Secuencia	Propósito
Corn278-F	23	1884-1906 (-)	Seq ID No: 27: 5' ATTCTGGCTTTGCTGTAAATCGT- 3'	Amplificación de secuencia específica 278 en la unión 5'
Corn278-R	24	1834-1857 (+)	Seq ID No: 28: 5' - TTACAATCAACAGCACCGTACCTT- 3'	Amplificación de secuencia específica 278 en la unión 5'
(+): Secuencia directa; (-): Secuencia complementaria;				

Ejemplo 3.3. Paseo genómico

- 5 El kit universal GenomeWalker™ (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA) se utilizó para clonar las secuencias de borde flanqueantes 5' y 3' del evento de maíz DAS-40278-9. Según las instrucciones del fabricante, se digirieron aproximadamente 2,5 µg de ADN genómico del evento de maíz DAS-40278-9 que incorpora ADD-1 durante la noche con *EcoR* V, *Stu* I (ambos proporcionados por el kit) o *Sca* I (New England Biolabs, Ipswich, MA). El ADN digerido se purificó utilizando el DNA Clean & Concentrator™-25 (ZYMO Research, Orange, CA) seguido de la unión a los adaptadores GenomeWalker™ para construir colecciones GenomeWalker™. Cada colección GenomeWalker™ se utilizó como molde de ADN para la amplificación primaria por PCR con el cebador del adaptador AP1, proporcionado en el kit, y cada cebador específico de construcción 5End3812_A y 3End3812_C. Después se utilizó un microlitro de una dilución 1:25 de la reacción de PCR primaria como molde para la amplificación de PCR secundaria con el cebador del adaptador AP2 anidado y cada cebador 5End3812_B y 3End3812_D específico de construcción anidado. TaKaRa LA Taq™ HS (Takara Bio Inc., Shiga, Japón) se utilizó en la amplificación por PCR. En una reacción de PCR de 50 µL se utilizaron, 1 µL de molde de ADN, 8 µL de mezcla de dNTP 2.5 mM, 0.2 µM de cada cebador, 2.5 unidades de ADN polimerasa TaKaRa LA Taq™ HS, 5 µL de 10× LA PCR Buffer II (Mg2+ plus), y 1.5 µL de MgCl₂ 25 mM. Las condiciones específicas de la PCR se enumeran en la Tabla 5.

Tabla 5. Condiciones para el paseo genómico del evento de maíz DAS-40278-9 que incorpora ADD-1 para amplificar las regiones de borde flanqueantes

Secuencia diana	Conjunto de cebadores	Pre- desnaturalizaci ón (°C/min)	Desnaturaliz ación (°C/sec.)	Apareamiento(° C/sec.)	Extensión (°C/min:sec)	Desnaturaliz ación(°C/sec .)	Apareamien to (°C/sec.)	Extensión (°C/min:sec)	Extensión final (°C/min)
Borde 5'	5End3812_A / AP1	95/3	95/30	68-0.5/ciclo→64 /30	68/10:00	95/30	64/30	68/10:00	72/10
			8 ciclos			22 ciclos			
Borde (anidado)	5' 5End3812_B / AP2	95/3	95/30	68-0.5/ciclo→64 /30	68/10:00	95/30	64/30	68/10:00	72/10
			8 ciclos			22 ciclos			
Borde 3'	3End3812_C / AP1	95/3	95/30	68-0.5/ciclo→64 /30	68/10:00	95/30	64/30	68/10:00	72/10
			8 ciclos			22 ciclos			
Borde (anidado)	3' 3End3812_D / AP2	95/3	95/30	68-0.5/ciclo→64 /30	68/10:00	95/30	64/30	68/10:00	72/10
			8 ciclos			22 ciclos			

Ejemplo 3.4 PCR convencional

Se utilizó la PCR estándar para clonar y confirmar el inserto de ADN y la secuencia de borde en el evento de maíz DAS-40278-9. TaKaRa LA Taq™ (Takara Bio Inc., Shiga, Japón), ADN polimerasa HotStarTaq (Qiagen, Valencia, CA), Expand High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics, Inc., Indianapolis, IN), o Easy-A® High-Fidelity PCR Cloning Enzyme & Master Mix (Stratagene, LaJolla, CA) se utilizó para la amplificación por PCR convencional según los procedimientos recomendados por el fabricante. Las condiciones específicas de la PCR y las descripciones de los amplicones se enumeran en la Tabla 6.

Tabla 6. Condiciones para la amplificación por PCR estándar de las regiones de borde en el evento de maíz DAS-40278-9

Secuencia diana	Conjunto de cebadores	Pre-desnaturalización (°C/min)	Desnaturalización (°C/sec.)	Apareamiento (°C/sec.)	Extensión (°C/min:sec)	Extensión final (°C/min)
Borde 5'	1F5End01 / A15End01	95/3	95/30	60/30	68/5:00	72/10
			35 ciclos			
Borde 5'	1F5End02 / A15End02	95/3	95/30	60/30	68/5:00	72/10
			35 ciclos			
A través del locus del inserto	1F3End03 / 1F5End03	95/3	95/30	60/30	68/5:00	72/10
			35 ciclos			
A través del locus del inserto	1F3End04 / 1F5Erd04	95/3	95/30	60/30	68/5:00	72/10
			35 ciclos			
Unión 5' (Amplicón 1)	Amp 1F / Amp 1R	95/2	94/60	55/60	72/2:00	72/10
			35 ciclos			
Amplicón 2	Amp 1F / Amp 1R	95/2	94/60	55/60	72/2:00	72/10
			35 ciclos			
Amplicón 3	Amp 1F / Amp 1R	95/2	94/60	55/60	72/2:00	72/10
			35 ciclos			
Amplicón 4	Amp 1F / Amp 1R	95/2	94/60	55/60	72/2:00	72/10
			35 ciclos			
Unión 3' (Amplicón 5)	Amp 1F / Amp 1R	95/2	94/60	55/60	72/2:00	72/10
			35 ciclos			
Borde 3'	1F3End05 / A13End01	95/3	95/30	60/30	68/5:00	72/10
			35 ciclos			

Ejemplo 3.5 Detección de productos de PCR, purificación, subclonación de productos de PCR y secuenciación

Los productos de la PCR se inspeccionaron por electroforesis utilizando un 1.2% o 2% de gel E (Invitrogen, Carlsbad, CA) según las instrucciones del producto. El tamaño del fragmento se estimó por comparación con los marcadores de ADN. Si fuera necesario, los fragmentos de PCR se purificaron escindiendo los fragmentos del gel de agarosa al 1%

en 1x TBE teñido con bromuro de etidio, utilizando el kit de extracción de gel QIAquick (Qiagen, Carlsbad, CA).

Los fragmentos de PCR se subclonaron en el pCR®4-TOPO® utilizando el kit TOPO TA Cloning® para secuenciación (Invitrogen, Carlsbad, CA) según las instrucciones del producto. Específicamente, de dos a cinco microlitros de la reacción de clonación TOPO® se transformaron en las células químicamente competentes One Shot TOP10 siguiendo las instrucciones del fabricante. Los fragmentos clonados se verificaron mediante minipreparación del ADN plasmídico (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen, Carlsbad, CA) seguido de digestión de restricción con *EcoR* I o mediante PCR directa de colonias utilizando los cebadores T3 y T7, proporcionados en el kit. Las reservas de ADN plasmídico o glicerol de las colonias seleccionadas se enviaron después para la secuenciación.

Después de la subclonación, los productos de PCR diana putativos se secuenciaron inicialmente para confirmar que los fragmentos de ADN esperados se habían clonado. Las colonias que contenían secuencias de ADN apropiadas se seleccionaron por paseo con cebador para determinar las secuencias de ADN completas. La secuenciación fue realizada por Cogenics (Houston, TX).

El ensamblaje final de las secuencias de inserto y borde se completó utilizando el software Sequencher (versión 4.8 Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI). La anotación de las secuencias de inserto y borde del evento de maíz DAS-40278-9 se realizó utilizando el Vector NTI (Versión 10 y 11, Invitrogen, Carlsbad, CA).

La búsqueda de homología se realizó utilizando el programa BLAST frente a la base de datos GenBank. Se realizó un análisis de marco de lectura abierto (ORF) utilizando Vector NTI (Versión 11, Invitrogen) para identificar los ORF (>= 200 codones) en las secuencias de inserto y borde flanqueante completas.

Ejemplo 3.6. Secuencia de borde del extremo 5'

Se amplificó un fragmento de ADN de cada colección GenomeWalker™ de eventos de maíz DAS-40278-9 utilizando el conjunto de cebadores anidados específicos para el extremo 5' del transgén. Se observó un producto de PCR de aproximadamente 800 pb a partir de las colecciones GenomeWalker™ *EcoR* V y *Stu* I del evento DAS-40278-9. La colección GenomeWalker™ *Sca* I generó un producto de aproximadamente 2 kb. Los fragmentos se clonaron en pCR®4-TOPO® y se seleccionaron aleatoriamente seis colonias de cada colección para la secuenciación final para confirmar que el inserto contenía las secuencias esperadas. La secuenciación completa mediante el paseo con cebador de los insertos reveló que los fragmentos amplificados de las colecciones GenomeWalker™ *Stu* I, *EcoR* V y *Sca* I del evento de maíz DAS-40278-9 fueron 793, 822 y 2132 pb, respectivamente. Los fragmentos de ADN generados a partir de las colecciones GenomeWalker™ *Stu* I y *EcoR* V coincidieron al 100% con el fragmento de ADN generado a partir de la colección GenomeWalker™ *Sca* I, lo que sugiere que estos fragmentos de ADN se amplificaron desde la región 5' del inserto del transgén. La búsqueda BLAST de la secuencia genómica de maíz de 1873 pb resultante indicó una alta similitud con la secuencia de un clon BAC de maíz. Además, el análisis de secuencia de la inserción indicó que 917 pb del MAR v3 en su región del extremo 5' se truncó en comparación con el fragmento pDAS1740/*Fsp* I de plásmido, dejando un MAR v3 parcial de 259 pb en la región 5' del casete de expresión *add-1*.

Ejemplo 3.7. Secuencia de borde del extremo 3'

Un fragmento de ADN con un tamaño de aproximadamente 3 kb se amplificó a partir de la colección GenomeWalker™ *Stu* I del evento de maíz DAS-40278-9 utilizando el conjunto de cebadores anidados específicos para el extremo 3' del transgén. El fragmento de ADN se clonó en pCR®4-TOPO® y se seleccionaron aleatoriamente diez colonias para la secuenciación final para confirmar la inserción de las secuencias esperadas. Se secuenciaron completamente tres clones con los insertos esperados, generando un fragmento de ADN de 2997 pb. El análisis de secuencia de este fragmento de ADN reveló un elemento parcial MAR v4 (faltan 70 pb de su región 5') y una secuencia genómica de maíz de 1867 pb. La búsqueda BLAST mostró que la secuencia de ADN genómico de 1867 pb tenía una coincidencia del 100% con la secuencia en el mismo clon BAC de maíz que se identificó con la secuencia de borde 5'.

Ejemplo 3.8. Inserto de ADN y secuencia de unión

El inserto de ADN y las regiones de unión se clonaron a partir del evento de maíz DAS-40278-9 utilizando métodos basados en PCR como se describió anteriormente. Se diseñaron cinco pares de cebadores basados en las secuencias de borde flanqueantes 5' y 3' y la secuencia de transgén esperada. En total, se clonaron y secuenciaron cinco fragmentos de ADN solapados (Amplicón 1 de 1767 pb, Amplicón 2 de 1703 pb, Amplicón 3 de 1700 pb, Amplicón 4 de 1984 pb y Amplicón 5 de 1484 pb) (Figura 4). Las las secuencias de borde flanqueantes e inserto completas se ensamblaron en base a una secuencia solapada entre los cinco fragmentos. La secuencia final confirma la presencia de 4816 pb del inserto de ADN obtenido a partir de pDAS1740/*Fsp* I, 1873 pb de la secuencia de borde flanqueante 5', y 1868 pb de la secuencia de borde flanqueante 3'. El inserto de ADN de 4816 pb contiene un casete de expresión de *aad-1* intacto, un MAR v3 parcial de 259 pb en el extremo 5' y un MAR v4 parcial de 1096 pb en el extremo 3' (Seq ID No: 29).

Se utilizaron al menos dos clones para cada par de cebadores para el paseo con cebador con el fin de obtener la información completa de la secuencia en el inserto de ADN y sus secuencias de borde. El análisis de la secuencia indicó una inserción de 21 pb en la unión de integración 5' entre el ADN genómico de maíz y el MAR v3 parcial integrado del pDAS1740/*Fsp* I. La búsqueda BLAST y los resultados del análisis de Vector NTI indicaron que el ADN

del inserto de 21 pb no demostró homología con el ADN de ninguna especie de la planta o el ADN del plásmido pDAS1740. Se encontró una inserción de un solo par de bases en la unión de integración 3' entre el ADN del genoma del maíz y el MAR4 v4 parcial del pDAS1740/Fsp I. La integración del ADN también dio como resultado una delección de dos pares de bases en el locus de inserción del genoma del maíz (Figura 6). Además, se observó una diferencia de nucleótidos (T a C) en la posición de 5212 pb en la región UTR 3' no traducida del inserto de ADN (Seq ID No: 29). Sin embargo, ninguno de estos cambios parece ser crítico para una expresión de *aad-1* o para crear nuevos ORF (≥ 200 codones) a través de las uniones en el inserto de DAS-40278-9.

Ejemplo 3.9. Confirmación de secuencias genómicas de maíz

Para confirmar el sitio de inserción del transgén del evento DAS-40278-9 en el genoma del maíz, la amplificación por PCR se llevó a cabo con diferentes pares de cebadores (Figura 4). El ADN genómico del evento DAS-40278-9 y otras líneas de maíz transgénicas o no transgénicas se utilizaron como molde. Se utilizaron dos cebadores específicos de *aad-1*, A15End01 y A15End02, y dos cebadores diseñados según la secuencia de borde del extremo 5', 1F5End01 y 1F5End02, para amplificar fragmentos de ADN que abarcan el gen *aad-1* hasta la secuencia de borde del extremo 5'. De manera similar, para amplificar un fragmento de ADN que abarca el *aad-1* hasta la secuencia de borde del extremo 3', se utilizó el cebador 1F3End05 obtenido a partir de la secuencia de borde del extremo 3' y el cebador A13End01 específico de *aad-1*. Los fragmentos de ADN con los tamaños esperados se amplificaron solo a partir del ADN genómico del evento de maíz DAS-40278-9 que incorpora ADD-1, y cada par de cebadores que consisten en un cebador localizado en el borde flanqueante del evento de maíz DAS-40278-9 que incorpora ADD-1 y otro cebador específico de *aad-1*. Las muestras de ADN control no produjeron productos de PCR con los mismos pares de cebadores, lo que indica que las secuencias de los extremos 5' y 3' clonados son de hecho la secuencia ascendente y descendente de la construcción del gen *aad-1* insertado, respectivamente. Cabe destacar que se observó una banda débil con un tamaño de aproximadamente 8 kb en todas las muestras de maíz, que incluye el evento de maíz DAS-40278-9 que incorpora ADD-1, el evento de maíz DAS-40474 que incorpora AAD-1 y la línea de maíz no transgénica XHH13 cuando el par de cebadores de 1F5End01 y A15End01 se utilizaron para la amplificación por PCR. Una banda débil observada (en un gel preparado) podría ser el resultado de una amplificación no específica en el genoma del maíz con este par de cebadores.

Además, para confirmar la inserción de ADN en el genoma del maíz, se utilizaron dos cebadores localizados en la secuencia de borde del extremo 5', 1F5End03 y 1F5End04, y dos cebadores localizados en la secuencia de borde del extremo 3', 1F3End03 y 1F3End04, para amplificar los fragmentos de ADN que abarcan el locus de inserción. La amplificación por PCR con el par de cebadores de 1F5End03/1F3End03 o el par de cebadores de 1F5End04/1F3End04 dio como resultado un fragmento con un tamaño esperado de aproximadamente 8 kb a partir del ADN genómico del evento de maíz DAS-40278-9 que incorpora ADD-1. En contraste, ningún producto de PCR resultó del ADN genómico del evento de AAD-1 de maíz DAS-40474-7 o de la línea de maíz no transgénica XHH13. Dado que el evento de maíz DAS-40278-9 que incorpora ADD-1 y el evento DAS-40474-7 fueron generados por la transformación de Hill, seguido por un retrocruzamiento de los eventos transgénicos originales con la línea de maíz XHH13, la mayoría del genoma en cada uno de estos dos eventos es teóricamente a partir de la línea de maíz XHH13. Es muy probable que solo las secuencias de borde flanqueantes cercanas al transgén de *aad-1* se transfirieran del ADN genómico original y se conserven durante el método de introgresión del evento de AAD-1, mientras que otras regiones de secuencias genómicas podrían haber sido reemplazadas por las secuencias genómicas de XHH13. Por lo tanto, no es sorprendente que no se hayan amplificado fragmentos del ADN genómico del evento de maíz DAS-40474-7 que incorpora AAD-1 y XHH13 con el par de cebadores de 1F5End03/1F3End03 o el par de cebadores de 1F5End04/1F3End04. Aproximadamente los fragmentos de 3.1 y 3.3 kb se amplificaron con el par de cebadores de 1F5End03/1F3End03 y 1F5End04/1F3End04 respectivamente en el ADN genómico de las líneas de maíz Hill y B73, pero no en la línea de maíz A188. Los resultados indican que las secuencias de borde se originaron a partir del genoma de la línea de maíz B73.

Se realizó una clonación adicional de ADN genómico de maíz a partir de B73/Hill para asegurar la validez de las secuencias de borde flanqueantes. Los fragmentos amplificados por PCR se secuenciaron para probar la región de ADN insertada integrada en la localización específica del ADN genómico de B73/Hill. Los cebadores fueron diseñados en base a la secuencia obtenida. El conjunto de cebadores Amp 1F/Amp 5R se utilizó para amplificar un fragmento de 2212 pb que abarca las uniones 5' a 3' del genoma nativo de B73/Hill sin ADN del inserto. El análisis de secuencia reveló que había una delección de dos pares de bases del genoma nativo de B73 en el locus de inserción transgénica. El análisis de las secuencias de ADN del fragmento genómico nativo de B73 clonado identificó un ORF (≥ 200 codones) localizado secuencia abajo de la región de unión de integración 3'. Además, no hay otros ORF en el locus original donde se integró el evento de maíz DAS-40278-9 que incorpora ADD-1. La búsqueda BLAST también confirmó que las secuencias de borde del extremo 5' y del extremo 3' del evento DAS40278-9 están localizadas lado a lado en el mismo clon BAC de maíz.

Dada la singularidad de la unión de integración 5' del evento de maíz DAS-40278-9 que incorpora AAS-1, se diseñaron dos pares de cebadores de PCR específicos, 1F5EndT1F/1F5EndT1R y Corn278-F/Corn278-R, para amplificar este inserto a la unión genómica de la planta. Como se predijo, el fragmento de ADN deseado solo se generó en el ADN genómico del evento de maíz DAS-40278-9 que incorpora ADD-1, pero no en ninguna otra línea de maíz transgénica o no transgénica. Por lo tanto, esos dos pares de cebadores se pueden utilizar como identificadores de eventos específicos del evento de maíz DAS-40278-9 que incorpora ADD-1.

Ejemplo 4. Caracterización genómica a través de marcadores SSR flanqueantes de DAS-40278-9

Para caracterizar y describir el sitio de inserción genómica, se determinaron las secuencias de marcadores localizadas cerca del inserto. Se utilizó un panel de marcadores SSR polimórficos para identificar y mapear la localización del transgén. El evento pDAS 1740-278 está localizado en el cromosoma 2 a aproximadamente 20 cM entre los marcadores SSR UMC1265 y MMC0111 a aproximadamente 20 cM en el mapa de ligamientos de maíz DAS 2008. La Tabla 6 resume la información del cebador para estos dos fabricantes que se encuentran muy cerca del transgén pDAS1740-278.

Tabla 6. Nombres de cebadores, marcadores de tinte, posiciones de locus, secuencias de cebadores directas e inversas y notas significativas para los marcadores flanqueantes asociados con el evento pDAS1740-278.

Nombre del cebador	Marcador	Cromosoma	~cM	Bin	Cebador directo	Cebador inverso	Notas
umc1265	NED	2	20	2.02	Seq ID No: 30: 5' -- GCCTAGTCGCC TACCCTACCAAT -- 3'	Seq ID No: 31: 5'-- TGTGTTCTTGATT GGGTGAGACAT -- 3'	Marcador flanqueante izquierdo
mmc0111	FAM	2	20	2.03	Seq ID No: 32: 5' -- TACTGGGG ATTAGAGCAGAAG -- 3'	Seq ID No: 33: 5'-- AATCTATGT GTGAACAGCAGC -- 3'	Marcador flanqueante derecho

Ejemplo 4.1. Aislamiento de ADNg

El ADNg se extrajo de las incisiones de hojas utilizando el kit de ensayo DNEasy 96 Pant (Qiagen, Valencia, California). Se hicieron modificaciones al protocolo para adaptarse a la automatización. El ADNg aislado se cuantificó utilizando el colorante PicoGreen® de Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR). La concentración de ADNg se diluyó a 5 ng/μl para todas las muestras utilizando agua desionizada estéril.

Ejemplo 4.2. Cribado de ADNg con marcadores

El ADNg diluido se genotipó con un subconjunto de marcadores de repetición de secuencia simple (SSR, por sus siglas en inglés). Los marcadores SSR se sintetizaron por Applied Biosystems (Foster City, California) con cebadores directos marcados con etiquetas fluorescentes 6-FAM, HEX/VIC o NED (azul, verde y amarillo, respectivamente). Los marcadores se dividieron en grupos o paneles según su etiqueta fluorescente y el tamaño del amplicón para facilitar la multiplexación y el análisis post-PCR.

La PCR se llevó a cabo en placas de ensayo de 384 pocillos con cada reacción que contenía 5 μg de ADN genómico, 1.25X tampón de PCR (Qiagen, Valencia, California), 0.20 μM de cada cebador directo e inverso, MgCl₂ 1.25 mM, 0.015 mM de cada dNTP y 0.3 unidades de ADN polimerasa HotStart Taq (Qiagen, Valencia, California). La amplificación se realizó en un GeneAmp PCR System 9700 con un módulo de 384 cabezales dobles (Applied Biosystems, Foster City, California). El programa de amplificación fue el siguiente: (1) activación inicial de Taq a una temperatura de 95°C durante 12 minutos; (2) 30 segundos a una temperatura de 94°C; (3) 30 segundos a una temperatura de 55°C; (4) 30 segundos a una temperatura de 72°C; (5) repetir los pasos 2-4 durante 40 ciclos; y (6) extensión final de 30 min a una temperatura de 72°C. Los productos de PCR para cada panel marcador SSR se multiplexaron juntos añadiendo 2 μl de cada producto de PCR de la misma planta a agua desionizada estéril para un volumen total de 60 μl. De los productos de la PCR multiplexados, se estamparon 0.5 μl en placas de carga de 384 pocillos que contenían 5 μl de tampón de carga compuesto de una relación 1:100 de GeneScan 500 base pair LIZ size standard y Formamida ABI HiDi (Applied Biosystems, Foster City, California). Después, las muestras se cargaron en un analizador de ADN ABI Prism 3730x1 (Applied Biosystems, Foster City, California) para electroforesis capilar utilizando las recomendaciones del fabricante con un tiempo total de ejecución de 36 minutos. Los datos del marcador se recopilaron por el software de recopilación de datos del secuenciador automático ABI Prism 3730x1, versión 4.0, y se extrajeron mediante el software GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems) para la caracterización de alelos y el marcaje del tamaño del fragmento.

Ejemplo 4.3. Resultados del marcador SSR

Los datos del cebador para los marcadores flanqueantes que se identificaron en la proximidad más cercana al transgén se enumeran en la Tabla 6. Los dos marcadores asociados más cercanos, *UMC1265* y *MMC0111*, están localizados aproximadamente a 20 cm del inserto transgénico en el cromosoma 2.

Ejemplo 5. Caracterización de la proteína *aad-1* en el Evento DAS-40278-9

Se caracterizaron las propiedades bioquímicas de la proteína *aad-1* recombinante obtenida a partir del evento de maíz DAS-40278-9 transgénico. Se utilizaron electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE, teñido con azul de Coomassie y métodos de detección de glicoproteína), transferencia Western, análisis de tiras reactivas de inmunodiagnóstico, espectrometría de masas desorción/ionización láser asistida por matriz con tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS, por sus siglas en inglés) y análisis de secuenciación de proteínas por MS en tándem para caracterizar las propiedades bioquímicas de la proteína.

Ejemplo 5.1. Ensayo de tira de inmunodiagnóstico

La presencia de la proteína *aad-1* en el tejido de la hoja de DAS-40278-9 se confirmó utilizando tiras reactivas de inmunodiagnóstico preparadas comercialmente de American Bionostica. Las tiras fueron capaces de discriminar entre plantas transgénicas y no transgénicas mediante el análisis de extractos de hojas crudas (datos no mostrados). Los extractos no transgénicos (XHH13) no contenían cantidades detectables de proteína inmunoreactiva. Este resultado también fue confirmado por el análisis de transferencia Western.

Para ensayar la expresión de la proteína *aad-1*, se realizó un análisis de tira inmunodiagnóstica. Se recogieron cuatro incisiones de hojas de cada planta para XHH13 (planta control) y el evento DAS-40278-9 pellizcando el tejido entre las tapas de cierre rápido de tubos de microcentrífuga de 1.5 ml marcados individualmente. Una vez recibido en el laboratorio, se añadieron 0.5 ml de tampón de extracción de *aad-1* (American Bionostica, Swedesboro, NJ) a cada tubo y el tejido se homogeneizó utilizando un pistilo desechable seguido de agitación de la muestra durante ~10 segundos. Después de la homogeneización, la tira de ensayo se colocó en el tubo y se dejó desarrollar durante ~5 minutos. La presencia o ausencia de la proteína *aad-1* en el extracto de la planta se confirmó en base a la apariencia (o falta de apariencia) de una línea de prueba en la tira de inmunodiagnóstico. Una vez que se confirmó la expresión de la proteína *aad-1* para el evento transgénico, el tejido del tallo de maíz se recolectó y se liofilizó y se almacenó a una temperatura de aproximadamente -80°C hasta su uso.

Ejemplo 5.2. Purificación de la proteína *aad-1* del maíz

Se prepararon proteínas *aad-1* obtenidas a partir del maíz inmunopurificadas (peso molecular: ~33 kDa) o extractos acuosos crudos de tejido de tallo común. Todos los tejidos de las hojas y los tallos se recolectaron y transportaron al laboratorio de la siguiente manera: las hojas se cortaron de la planta con tijeras y se colocaron en bolsas de tela y se almacenaron a una temperatura de aproximadamente -20°C para uso futuro. Por separado, los tallos se cortaron justo por encima de la línea del suelo, se colocaron en bolsas de tela y se congelaron inmediatamente a una temperatura de aproximadamente -80°C durante ~6 horas. Después se colocaron los tallos en un liofilizador durante 5 días para retirar el agua. Una vez que los tejidos se secaron completamente, se trituraron hasta obtener un polvo fino con hielo seco y se almacenaron a una temperatura de aproximadamente -80°C hasta que se necesitaron.

La proteína *aad-1* obtenida a partir del maíz se extrajo de tejido liofilizado del tallo en un tampón a base de fosfato (véase Tabla 7 para los componentes del tampón) pesando ~30 gramos de tejido liofilizado en un mezclador de vidrio de 1000 ml enfriado y añadiendo 500 ml de tampón de extracción. El tejido se mezcló a alta durante 60 segundos y las proteínas solubles se recolectaron mediante centrifugación de la muestra durante 20 minutos a 30.000 xg. El sedimento se volvió a extraer como se describe y los sobrenadantes se combinaron y filtraron a través de un filtro de 0.45 µ. Los sobrenadantes filtrados se cargaron a aproximadamente +4°C en una columna de inmunoafinidad anti-*aad-1* que se conjugó con un anticuerpo monoclonal preparado por Strategic Biosolution Inc. (MAb 473F1 85.1; Proteína A purificada; Lot #: 609.03C-2-4; 6.5 mg/ml (~35.2 mg total)) (Windham, ME); Conjugado con Sefarosa 4B activada con CNBr (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Las proteínas no unidas se recolectaron y la columna se lavó extensivamente con tampón bicarbonato de amonio 20 mM preenfriado, pH 8.0. Las proteínas unidas se eluyeron con NaSCN 3.5 M, (Sigma, St. Louis, MO), tampón Tris 50 mM (Sigma, St. Louis, MO) pH 8.0. Se recolectaron siete fracciones de 5 ml y los números de fracción 2 → 7 se dializaron durante la noche a una temperatura de aproximadamente +4°C frente a Tris 10 mM, tampón de pH 8.0. Las fracciones se examinaron por SDS-PAGE y transferencia Western y las muestras restantes se almacenaron a una temperatura de aproximadamente +4°C hasta que se utilizaron para análisis posteriores.

Tabla 7. Las sustancias de referencia disponibles comercialmente utilizadas en este estudio se enumeran en la siguiente tabla:

Sustancia de referencia	Nombre del producto	Número de lote	Ensayo	Referencia
Inhibidor de la tripsina de soja	Un componente de GelCode Kit de tinción de glicoproteínas	IA110577	Glicosilación	Pierce Cat #: 1856274

Sustancia de referencia	Nombre del producto	Número de lote	Ensayo	Referencia
Peroxidasa de rábano picante	Un componente de GelCode Kit de tinción de glicoproteínas	JG124509	Glicosilación	Pierce Cat #: 1856273
Fracción de albúmina de suero bovino V (BSA)	Ensayo de proteína de BSA prediluida Standard Set	FH71884A	Glicosilación, SDS-PAGE y transferencia Western	Pierce Cat #: 23208
Marcadores de peso molecular preteñidos	Novex Sharp Marcadores de proteínas preteñidos	469212 & 419493	Transferencia Western	Invitrogen Cat #: LC5800, marcadores con pesos moleculares de 260, 160, 110, 80, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10 y 3.5 kDa
Marcadores de peso molecular	Mezcla de marcador de proteína Invitrogen Mark 12	39983 & 399895	SDS-PAGE	Invitrogen Cat #: LC5677, marcadores con pesos moleculares de 200, 116.3, 97.4, 66.3, 55.4, 36.5, 31.0, 21.5, 14.4, 6.0, 3.5 y 2.5 kDa

La proteína que se unió a la columna de inmunoafinidad se examinó mediante SDSPAGE y los resultados mostraron que las fracciones eluidas contenían la proteína *aad-1* con un peso molecular aproximado de 33 kDa. Además, también se realizó una transferencia Western y fue positivo para la proteína *aad-1*. La proteína *aad-1* obtenida a partir del maíz se aisló a partir de ~30 g de material de tallo liofilizado.

Ejemplo 5.3. SDS-PAGE y transferencia Western

El tejido liofilizado del evento DAS-40278-9 y el tallo XHH13 (~100 mg) se pesaron en tubos de microcentrífuga de 2 ml y se extrajeron con ~1 ml de PBST (Sigma, St. Louis, MO) que contenía un 10% de cóctel de inhibidor de proteasa vegetal (Sigma, St. Louis, MO). La extracción se facilitó mediante la adición de 4 bolas de metal pequeñas y la molienda Geno de la muestra durante 1 minuto. Después de la molienda, las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 20000×g y los sobrenadantes se mezclaron 4:1 con 5x tampón de muestra Laemmli (2% de SDS, Tris 50 mM, pH 6.8, azul de bromofenol 0.2 mg/ml, 50% (p/p) de glicerol que contiene un 10% de 2-mercaptoetanol recién añadido) y se calienta durante 5 minutos a una temperatura de ~100°C. Después de una breve centrifugación, se cargaron 45 µL del sobrenadante directamente en un gel BioRad Criterion SDS-PAGE (Bio-Rad, Hercules, CA) instalado en un módulo de gel Criterion Cell. Un estándar de referencia positivo de *aad-1* obtenido a partir de microbios se resuspendió en 1 mg/ml en PBST pH 7.4 y se diluyó adicionalmente con PBST. La muestra se mezcló después con tampón Bio-Rad Laemmli con 5% de 2-mercaptoetanol y se procesó como se describió anteriormente. La electroforesis se realizó con tampón Tris/glicina/SDS (Bio-Rad, Hercules, CA) a voltajes de 150 a 200 V hasta que el frente de tinte se acercó al final del gel. Después de la separación, el gel se cortó a la mitad y una mitad se tiñó con la tinción de proteína Pierce GelCode Blue y la otra mitad se electrotransfirió a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad, Hercules, CA) con una célula de transferencia electroforética Mini trans-blot (Bio-Rad, Hercules, CA) durante 60 minutos a una tensión constante de 100 voltios. El tampón de transferencia contenía 20% de metanol y tampón Tris/glicina de Bio-Rad. Para la inmunodetección, la membrana se probó con un anticuerpo policlonal de conejo específico para *aad-1* (Strategic Biosolution Inc., Newark, DE, anticuerpo policlonal de conejo purificado de proteína A Lote #: DAS F1 197-15 1, 1.6 mg/ml). Se utilizó un conjugado de cabra anti-IgG de conejo (H+L) y fosfatasa alcalina (Pierce Chemical, Rockford, IL) como anticuerpo secundario. El sustrato SigmaFast BCIP/NBT se utilizó para el desarrollo y la visualización de las bandas de proteínas inmunoreactivas. La membrana se lavó abundantemente con agua para detener la reacción y se capturó un registro de los resultados con un escáner digital (Hewlett Packard, Palo Alto, CA).

En la *aad-1* producida por *P. fluorescens*, la banda de proteína principal, tal como se visualiza en geles de SDS-PAGE teñidos con Coomassie, era de aproximadamente 33 kDa. Como se esperaba, la proteína *aad-1* obtenida a partir del maíz correspondiente (evento DAS-40278-9) era idéntica en tamaño a las proteínas expresadas en microbios. Predeciblemente, las fracciones purificadas de la planta contenían una cantidad menor de impurezas no inmunorreactivas además de la proteína *aad-1*. Las proteínas co-purificadas probablemente fueron retenidas en la

columna por interacciones débiles con la matriz de la columna o por lixiviación del anticuerpo monoclonal fuera de la columna bajo las rigurosas condiciones de elución. Otros investigadores también han informado sobre la adsorción no específica de péptidos y aminoácidos en inmunoabsorbentes de Sefarosa 4B activados con bromuro de cianógeno (Kennedy y Barnes, 1983; Holroyde *et al.*, 1976; Podlaski y Stern, 2008).

La proteína *aad-1* obtenida a partir de *Pseudomonas* mostró una señal positiva del tamaño esperado por el análisis de transferencia western del anticuerpo policlonal. Esto también se observó en el extracto de tallo del maíz transgénico DAS-40278-9. En el análisis de transferencia western de *aad-1*, no se observaron proteínas inmunorreactivas en el extracto de control XHH13 y no se observaron proteínas de tamaño alternativo (agregados o productos de degradación) en las muestras transgénicas.

Ejemplo 5.4. Detección de glicosilación postraduccional

La proteína *aad-1* obtenida a partir del maíz purificada mediante cromatografía de inmunoafinidad (Fracción #3) se mezcló en proporción 4:1 con 5x tampón de Laemmli. El *aad-1* obtenido a partir de microbios, el inhibidor de tripsina de soja, la albúmina de suero bovino y la peroxidasa de rábano picante se diluyeron con agua Milli-Q a la concentración aproximada de la *aad-1* obtenida a partir de plantas y se mezclaron con tampón Bio-Rad Laemmli. Las proteínas se calentaron después a una temperatura de ~95°C durante 5 minutos y se centrifugaron a 20.000×g durante 2 minutos para obtener un sobrenadante clarificado. Los sobrenadantes resultantes se aplicaron directamente a un gel Bio-Rad Criterion y se sometieron a electroforesis con solución tampón de corrida XT MES (Bio-Rad, Hercules, CA) esencialmente como se describe anteriormente, excepto que la electroforesis se realizó a 170 V durante ~60 minutos. Después de la electroforesis, el gel se cortó por la mitad y la mitad se tiñó con tinte azul GelCode para la proteína total según el protocolo del fabricante. Una vez que se completó la tinción, se examinó el gel con un densitómetro Molecular Dynamics para obtener un registro visual permanente del gel. La otra mitad del gel se tiñó con un kit de tinción de glicoproteínas GelCode (Pierce Chemical, Rockford, IL) según el protocolo del fabricante para visualizar las glicoproteínas. Las glicoproteínas (con un límite de detección tan bajo como 0.625 ng por banda) se visualizaron como bandas magenta sobre un fondo rosa claro. Una vez que se completó la tinción de glicoproteína, el gel se exploró con un escáner digital Hewlett Packard para obtener un registro visual permanente del gel. Después de capturar la imagen de la tinción de glicosilación, el gel se tiñó con azul GelCode para verificar la presencia de las proteínas no glicosiladas. Los resultados mostraron que tanto las proteínas *aad-1* obtenidas a partir del maíz como de los microbios no tenían carbohidratos enlazados covalentemente detectables. Este resultado también fue confirmado por la huella dactilar del péptido.

Ejemplo 5.5. Obtención de la huella peptídica por espectrometría de masas y secuenciación de *aad-1* obtenido a partir del maíz y *Pseudomonas*

Se realizó un análisis de espectrometría de masas de la *Pseudomonas* y *aad-1* obtenido a partir del maíz. La proteína *aad-1* obtenida a partir del tallo de maíz transgénico (evento DAS-40278-9) se sometió a digestión en solución por tripsina seguida de MALDI-TOF MS y ESI-LC/MS. Las masas de los péptidos detectados se compararon con las deducidas en base a los posibles sitios de escisión de proteasas en la secuencia de proteína *aad-1* obtenida a partir del maíz. La escisión teórica se generó *in silico* utilizando el software gratuito Protein Analysis Worksheet (PAWS) de Proteometrics LLC. La proteína *aad-1*, una vez desnaturalizada, es fácilmente digerida por las proteasas y generará numerosos picos de péptidos.

En los productos de digestión con tripsina de la proteína *aad-1* obtenida a partir de maíz transgénico (evento DAS-40278-9), los fragmentos peptídicos detectados cubrieron casi toda la secuencia proteica que carece solo de un pequeño fragmento triptico en el extremo C-terminal de la proteína, F²⁴⁸ a R²⁵³ y un fragmento peptídico corto (2 aminoácidos). Este análisis confirmó que la secuencia de aminoácidos de la proteína obtenida a partir del maíz coincidía con la de la proteína *aad-1* obtenida a partir de un microbio. Los resultados de estos análisis indican que la secuencia de aminoácidos de la proteína *aad-1* obtenida a partir del maíz fue equivalente a la proteína expresada en *P. fluorescens*.

Ejemplo 5.5.1. Secuenciación de fragmentos de péptidos tripticos

Además de la huella peptídica, se secuenciaron los restos de aminoácidos en los extremos N- y C- de la proteína *aad-1* obtenida a partir del maíz (inmunoafinidad purificada del evento DAS-40278-9 del maíz) y se comparó con la secuencia de proteína obtenida a partir de un microbio. Las secuencias de proteínas se obtuvieron, mediante espectrometría de masas en tándem, para los primeros 11 restos de las proteínas obtenidas a partir de un microbio y maíz (Tabla 8). Las secuencias de aminoácidos para ambas proteínas fueron A' H A A L S P L S Q R" (SEQ ID NO:30) que muestran que la metionina N-terminal se eliminó con una aminopeptidasa (Tabla 8). Se esperaba que la secuencia de la proteína *aad-1* N-terminal fuera M' A H A A L S P L S Q R² (SEQ ID NO:31). Estos resultados sugieren que durante o después de la traducción en maíz y *P. fluorescens*, la metionina N-terminal es escindida por una metionina aminopeptidasa (MAP). Las MAP escinden los restos de metionilo rápidamente cuando el segundo resto de la proteína es pequeño, tal como Gly, Ala, Ser, Cys, Thr, Pro y Val (Walsh, 2006). Además de que se eliminó la metionina, se mostró que una pequeña porción del péptido N-terminal de la proteína *aad-1* se había acetilado después de que la metionina N-terminal se escindió (Tabla 8). Este resultado se observa frecuentemente en las proteínas expresadas en eucariotas (plantas) ya que aproximadamente el 80-90% de los restos N-terminales están modificados (Polevoda y

Sherman, 2003). Además, se ha demostrado que las proteínas con serina y alanina en los extremos N son las más frecuentemente acetiladas (Polevoda y Sherman, 2002). Los dos procesos cotranslacionales, la escisión del resto de metionina N-terminal y la acetilación N-terminal, son por mucho las modificaciones más comunes y ocurren en la gran mayoría (~85%) de las proteínas eucarióticas (Polevoda y Sherman, 2002). Sin embargo, los ejemplos que demuestran la importancia biológica asociada con la acetilación N-terminal son raros (Polevoda y Sherman, 2000).

Tabla 8. Resumen de los datos de la secuencia N-terminal de las proteínas AAD-1 obtenidas a partir de un microbio y de maíz

Fuente	Secuencia N-terminal esperada ¹	
<i>P. fluorescens</i>	M ¹ A H A A L S P L S Q R ¹²	(SEQ ID NO:31)
Evento de maíz DAS-40278-9	M ¹ A H A A L S P L S Q R ¹²	
Fuente	Relativa ³	Abundancia
Fuente	Secuencia N-terminal esperada ²	Abundancia
<i>P. fluorescens</i>	A H A A L S P L S Q R ¹²	100%
Evento de maíz DAS-40278-9	A H A A L S P L S Q R ¹²	31%
Evento de maíz DAS-40278-9	N-Ac A H A A L S P L S Q R ¹²	3%
		(SEQ ID NO:30)
Evento de maíz DAS-40278-9	H A A L S P L S Q R ¹²	50%
		(SEQ ID NO:32)
Evento de maíz DAS-40278-9	A A L S P L S Q R ¹²	6%
		(SEQ ID NO:33)
Evento de maíz DAS-40278-9	A L S P L S Q R ¹²	12%
		(SEQ ID NO:34)

¹ Secuencia N-terminal esperada de los primeros 12 restos de aminoácidos de AAD-1 obtenido a partir de *P. fluorescens* y maíz.

² Secuencias N-terminal detectadas de AAD-1 obtenidas a partir de *P. fluorescens* y maíz.

³ Los datos de MS en tándem para los péptidos N-terminales revelaron una mezcla de AHAALSPLSQR (acetilado) y N-acetil-AHAALSPLSQR (acetilado). También se detectaron "extremos N-terminales truncados" (péptidos que corresponden a las secuencias de aminoácidos HAALSPLSQR, AALSPLSQR y ALSPLSQR). La abundancia relativa, una estimación de la cantidad relativa de fragmentos de péptidos, se realizó en base a las correspondientes áreas de pico de LC a 214 nm.

Notas:

Los números en superíndice (R^x) indican el número de restos de aminoácidos en la secuencia.

Abreviaturas de los restos aminoácidos:

A: alanina	H: histidina
L: leucina	M: metionina
P: prolina	Q: glutamina
R: arginina	S: serina
T: treonina	

Además de la N-acetilación, también hubo un ligero truncamiento N-terminal que apareció durante la purificación de la proteína *aad-1* obtenida a partir del maíz (Tabla 8). Estos "extremos truncados" dieron como resultado la pérdida de los aminoácidos A₂, H³ y A⁴ (en formas y cantidades variables) de la proteína obtenida a partir del maíz. Se cree que este truncamiento se produjo durante la purificación de la proteína *aad-1*, ya que la sonda de transferencia Western de los extractos de hojas crudas contenía una única banda nítida en el mismo PM que la proteína *aad-1* obtenida a partir de un microbio. El tampón de extracción para las muestras de transferencia Western contenía un exceso de un

cóctel de inhibidores de proteasa que contiene una mezcla de inhibidores de proteasas con amplia especificidad para la inhibición de serina, cisteína, aspártico, metaloproteasas y aminopeptidasas.

- 5 La secuencia C-terminal de las proteínas *aad-1* obtenidas a partir de maíz y un microbio se determinó como se describió anteriormente y se comparó con las secuencias de aminoácidos esperadas (Tabla 9). Los resultados indicaron que las secuencias medidas eran idénticas a las secuencias esperadas, y tanto las proteínas *aad-1* obtenidas a partir de maíz como de un microbio eran idénticas y sin alteraciones en el extremo C-terminal.

Tabla 9. Resumen de los datos de la secuencia C-terminal de las proteínas AAD-1 obtenidas a partir de un microbio y maíz

Fuente	Secuencia C-terminal esperada ¹
<i>P. fluorescens</i>	²⁸⁷ T T V G G V R P A R ²⁹⁶
Evento de maíz DAS-40278-9	²⁸⁷ T T V G G V R P A R ²⁹⁶
(SEQ ID NO:35)	
Fuente	Secuencia C-terminal esperada ²
<i>P. fluorescens</i>	²⁸⁷ T T V G G V R P A R ²⁹⁶
Evento de maíz DAS-40278-9	²⁸⁷ T T V G G V R P A R ²⁹⁶
(SEQ ID NO:35)	

- 10 ¹ Secuencia C-terminal esperada de los últimos 10 restos de aminoácidos de AAD-1 obtenida a partir de *P. fluorescens* y maíz.

² Secuencias C-terminal detectadas de AAD-1 obtenidas a partir de *P. fluorescens* y maíz.

Notas:

Los números en superíndice (Rx) indican los números de restos de aminoácidos en la secuencia.

- 15 Abreviaturas de los restos aminoácidos:

A: alanina	G: glicina
P: prolina	R: arginina
T: treonina	V: valina

Ejemplo 6. Expresión de campo, análisis de composición de nutrientes y características agronómicas de una línea de maíz híbrida que contiene el evento DAS-40278-9

- 20 El propósito de este estudio fue determinar los niveles de proteína AAD-1 encontrados en los tejidos del maíz. Además, se realizó un análisis de composición en forraje y grano de maíz para investigar la equivalencia entre la línea de maíz isogénica no transformada y la línea de maíz transgénica DAS-40278-9 (no rociada, rociada con 2,4-D, rociada con quizalofop, y rociada con 2,4-D y quizalofop). Las características agronómicas de la línea de maíz isogénica no transformada también se compararon con el maíz DAS-40278-9. La expresión de campo, la composición y los ensayos agronómicos se realizaron en seis sitios de ensayo localizados dentro de las principales regiones productoras de maíz de los EE. UU. y Canadá. Estos sitios representan regiones de diversas prácticas agronómicas y condiciones ambientales. Los ensayos se localizaron en Iowa, Illinois (2 sitios), Indiana, Nebraska y Ontario, Canadá.

- 25 Todos los valores medios del sitio para el control, AAD-1 no rociado, AAD-1 + quizalofop, AAD-1 + 2,4-D y AAD-1 + ambos de las muestras de entrada estaban dentro de los intervalos de la literatura para el maíz. Se observó un número limitado de diferencias significativas entre AAD-1 no rociado, AAD-1 + quizalofop, AAD-1 + 2,4-D o AAD-1 + ambos del maíz y el control, pero las diferencias no se consideraron biológicamente significativas porque eran pequeñas y los resultados estaban dentro del intervalo encontrado para el maíz comercial. Las gráficas de los resultados de composición no indican diferencias de composición relacionadas con el tratamiento biológicamente significativas entre AAD-1 no rociado, AAD-1 + quizalofop, AAD-1 + 2,4-D o AAD-1 + ambos del maíz y la línea de maíz control. En conclusión, los resultados de composición de maíz de AAD-1 no rociado, AAD-1 + quizalofop, AAD-1 + 2,4-D y AAD-1 + ambos confirmaron la equivalencia de maíz AAD-1 (Evento DAS 40278-9) con líneas de maíz convencionales.

Ejemplo 6.1. Líneas de maíz sometidas a ensayo

Las semillas híbridas que contienen el evento DAS-40278-9 y las plantas control que son semillas híbridas convencionales del mismo origen genético que la línea de la sustancia sometida a ensayo, pero que no contienen el

evento DAS-40278-9, se enumeran en la Tabla 10.

Tabla 10.

Entrada de ensayo	Descripción
1	Control sin <i>aad-1</i>
2	<i>aad-1</i> no rociado
3	<i>aad-1</i> rociado con quizalofop
4	<i>aad-1</i> rociado con 2,4-D
5	<i>aad-1</i> rociado con 2,4-D y quizalofop

- 5 Las plantas de maíz descritas anteriormente se cultivaron en ubicaciones dentro de las principales regiones productoras de maíz de los EE. UU. y Canadá. Las seis instalaciones de prueba de campo, Richland, IA; Carlyle, IL; Wyoming, IL; Rockville, IN; York, NE; y Branchton, Ontario, Canadá (referidas como IA, IL1, IL2, IN, NE y ON) representan regiones de diversas prácticas agronómicas y condiciones ambientales para el maíz.

- 10 La semilla de maíz de ensayo y control se sembró a una tasa de siembra de aproximadamente 24 semillas por fila con un espacio de semilla dentro de cada fila de aproximadamente 25 cm (10 pulgadas). En cada sitio, se establecieron 4 parcelas repetidas de cada tratamiento, y cada parcela consistió en filas de 0.61 a 7.62 m (2 a 25 pies). Las parcelas se organizaron en un diseño de bloques completos al azar (RCB, por sus siglas en inglés), con una aleatorización única en cada sitio. Cada parcela de maíz estaba rodeada por 2 filas de un híbrido de maíz no transgénico de madurez similar. Todo el sitio de ensayo estaba rodeado por un mínimo de 12 filas (o 9.14 m (30 pies)) de un híbrido de maíz no transgénico de madurez relativa similar.

Se aplicaron prácticas apropiadas de control de insectos, malezas y enfermedades para producir un cultivo agronómicamente aceptable. Las temperaturas máximas y mínimas mensuales junto con la lluvia y el riego fueron promedio para el sitio. Estos intervalos se encuentran típicamente en la producción de maíz.

Ejemplo 6.2. Aplicaciones de herbicidas

- 20 Los tratamientos con herbicidas se aplicaron con un volumen de rociado de aproximadamente 187 l/ha (20 galones por acre). Estas aplicaciones se diseñaron para replicar las prácticas comerciales de tasa máxima de marcaje. La tabla 11 enumera los herbicidas que se utilizaron.

Tabla 11

Herbicida	TSN	Concentración
Weedar 64	026491-0006	39%, 3.76 lb ae ^a /gal, 451 g ae/l
Assure II	106155	10.2%, 0.87 lb ai ^b /gal, 104 g ai/l

^a ae, por sus siglas en inglés = equivalente ácido.

- 25 ^b ai, por sus siglas en inglés = ingrediente activo.

- 30 2,4-D (Weedar 64) se aplicó como 3 aplicaciones en superficie al voleo a las entradas de ensayo 4 y 5 (total estacional de 3363 g ae/ha (3 lb ae/A). Las aplicaciones individuales fueron en pre-emergencia y aproximadamente en las etapas V4 y V8-V8.5. Las tasas de aplicación objetivo individuales fueron 1120 g ae/ha para Weedar 64, o 1.0 lb ae/A. Las tasas de aplicación reales oscilaron entre 1096 y 1231 g ae/A.

Quizalofop (Assure II) se aplicó como una única aplicación en superficie al voleo a las entradas de ensayo 3 y 5. La elección del momento de aplicación fue aproximadamente en la etapa de crecimiento V6. La tasa de aplicación objetivo fue de 92 g ai/ha para Assure II, o 0.0825 lb ai/A. Las tasas de aplicación reales oscilaron entre 90.8 y 103 g ai/ha.

Ejemplo 6.3. Recopilación de datos agronómicos y resultados

- 35 Las características agronómicas se registraron para todas las entradas de ensayo dentro de los Bloques 2, 3 y 4 en

cada localización. La Tabla 12 enumera las siguientes características que fueron medidas.

Tabla 12

Rasgo	Tiempo de Evaluación	Descripción de los datos
Población temprana	V1 y V4	Número de plantas emergidas por parcela
Vigor de plántula	V4	Estimación visual del vigor promedio de plantas emergidas por parcela
Vigor de planta/Lesión	Aproximadamente 1-2 semanas después de la aplicación	Lesiones por aplicación de herbicidas
Tiempo hasta formación de la barba (silking)	Aproximadamente el 50% de la formación de la barba	El número de unidades de calor acumulado desde el momento de la plantación hasta que aproximadamente el 50% de las plantas han emergido las barbas
Tiempo hasta emitir polen	Aproximadamente el 50% de emisión de polen	El número de unidades de calor acumulado desde el momento de la plantación hasta que aproximadamente el 50% de las plantas emiten polen
Viabilidad del polen	Aproximadamente 50%	Evaluación del color y la forma del polen a lo largo del tiempo
Altura de la planta	Aproximadamente R6	Altura hasta la punta de la panoja
Altura de la espiga	Aproximadamente R6	Altura hasta la base de la espiga primaria
Encamado del tallo	Aproximadamente R6	Estimación visual del porcentaje de plantas en la parcela con tallos rotos debajo la espiga primaria
Encamado de la raíz	Aproximadamente R6	Estimación visual del porcentaje de plantas en la parcela que se inclina aproximadamente 30° o más en el primer ~1/2 metro sobre la superficie del suelo
Población final	Aproximadamente R6	El número de plantas restantes por parcela
Días hasta la madurez	Aproximadamente R6	El número de unidades de calor acumulado desde el momento de la plantación hasta que aproximadamente el 50% de las plantas ha alcanzado la madurez fisiológica
Extensión del verdor	Aproximadamente R6	Salud general de la planta
Incidencia de enfermedades	Aproximadamente R6	Estimación visual de la incidencia de enfermedades foliares
Daño por insectos	Aproximadamente R6	Estimación visual del daño por insectos

Nota: Unidad de calor = ((temp MAX + temp MIN) / 2) – 10°C (50°F)

- 5 Se realizó un análisis de los datos agronómicos recopilados del control, entradas de *aad-1* no rociado, *aad-1* + 2,4-D, *aad-1* + quizalofop y *aad-1* + *ambos*. Para el análisis a través del sitio, no se observaron diferencias estadísticamente significativas para la población temprana (V1 y V4), el vigor, la población final, la lesión en el cultivo, el tiempo hasta la formación de la barba, el tiempo hasta la emisión de polen, el encamado del tallo, el encamado de la raíz, la

5 incidencia de enfermedades, el daño por insectos, los días hasta la madurez, la altura de la planta y los valores de viabilidad del polen (forma y color) en el análisis resumido a través de la localización (tabla 13). Para la extensión del verdor y la altura de la espiga, se observaron pruebas t apareadas significativos entre el control y las entradas de *aad-1* + quizalofop, pero no fueron acompañados por efecto del tratamiento global significativos o valores p ajustados por tasas de descubrimiento falso (FDR, por sus siglas en inglés) (Tabla 31).

Tabla 13. Análisis resumido de los resultados de las características agronómicas en las localizaciones para el maíz DAS-40278-9 que incorpora *aad-1* (rociado y no rociado) y el control

Analito	Efecto del tto. general (Pr>F) ^a	Control	No rociado (valor P, ^b Adj.P) ^c	Rociado con Quizalofop (valor P, Adj.P)	Rociado con 2,4-D (valor P, Adj.P)	Rociado con ambos (valor P, Adj.P)
Población temprana V1 (n° de plantas)	(0.351)	42.8	41.3 (0.303, 0.819)	41.7 (0.443, 0.819)	41.9 (0.556, 0.819)	44.1 (0.393, 0.819)
Población temprana V4 (n° de plantas)	(0.768)	43.1	43.3 (0.883, 0.984)	43.7 (0.687, 0.863)	44.3 (0.423, 0.819)	44.8 (0.263, 0.819)
Vigor de plántula ^d	(0.308)	7.69	7.39 (0.197, 0.819)	7.36 (0.161, 0.819)	7.58 (0.633, 0.819)	7.78 (0.729, 0.889)
Población final (número de plantas)	(0.873)	40.1	39.6 (0.747, 0.889)	39.7 (0.802, 0.924)	39.9 (0.943, 1.00)	41.1 (0.521, 0.819)
Lesiones de los cultivos - 1ª apl. ^e	NA ¹	0	0	0	0	0
Lesiones de los cultivos - 2ª apl. ^e	(0.431)	0	0 (1.00, 1.00)	0 (1.00, 1.00)	0 (1.00, 1.00)	0.28 (0.130, 0.819)
Lesiones de los cultivos - 3ª apl. ^e	NA	0	0	0	0	0
Lesiones de los cultivos - 4ª apl. ^e	NA	0	0	0	0	0
Tiempo hasta la formación de la barba (unidades de calor) ^f	(0.294)	1291	1291 (0.996, 1.00)	1293 (0.781, 0.917)	1304 (0.088, 0.819)	1300 (0.224, 0.819)
Tiempo hasta emitir polen (unidades de calor) ^f	(0.331)	1336	1331 (0.564, 0.819)	1342 (0.480, 0.819)	1347 (0.245, 0.819)	1347 (0.245, 0.819)
Forma del polen 0 minutos (%) ^g	(0.872)	10.9	10.9 (0.931, 1.00)	11.3 (0.546, 0.819)	11.4 (0.439, 0.819)	11.3 (0.605, 0.819)
Forma del polen 30 minutos (%)	(0.486)	49.2	50.8 (0.618, 0.819)	46.4 (0.409, 0.819)	48.1 (0.739, 0.889)	51.9 (0.409, 0.819)
Forma del polen 60 minutos (%)	(0.724)	74.4	74.7 (0.809, 0.924)	73.6 (0.470, 0.819)	73.9 (0.629, 0.819)	75.0 (0.629, 0.819)
Forma del polen 120 minutos (%)	(0.816)	82.6	82.6 (1.00, 1.00)	82.6 (1.00, 1.00)	82.6 (1.00, 1.00)	82.5 (0.337, 0.819)
Color de polen 30 minutos (%) ^h	(0.524)	51.9	52.5 (0.850, 0.960)	48.9 (0.306, 0.819)	50.3 (0.573, 0.819)	53.6 (0.573, 0.819)

Analito	Efecto del tto. general (Pr>F) ^a	Control	No rociado (valor P, ^b Adj.P) ^c	Rociado con Quizalofo p (valor P, Adj.P)	Rociado con 2,4-D (valor P, Adj.P)	Rociado con ambos (valor P, Adj.P)
Color de polen 60 minutos (%)	(0.332)	75.3	75.9 (0.612, 0.819)	74.2 (0.315, 0.819)	74.2 (0.315, 0.819)	75.9 (0.612, 0.819)
Color de polen 120 minutos (%)	NA	84.0	84.0	84.0	84.0	84.0
Encamado del tallo (%)	(0.261)	5.11	5.22 (0.356, 0.819)	5.00 (0.356, 0.819)	5.00 (0.356, 0.819)	5.00 (0.356, 0.819)
Encamado de la raíz (%)	(0.431)	0.44	0.17 (0.457, 0.819)	0.72 (0.457, 0.819)	0.17 (0.457, 0.819)	0.11 (0.373, 0.819)
Extensión del verdor ⁱ	(0.260)	4.67	4.28 (0.250, 0.819)	3.92 (0.034 ^m , 0.819)	4.17 (0.144, 0.819)	4.11 (0.106, 0.819)
Incidencia de la enfermedades ^j	(0.741)	6.42	6.22 (0.383, 0.819)	6.17 (0.265, 0.819)	6.17 (0.265, 0.819)	6.17 (0.265, 0.819)
Daño por insectos ^k	(0.627)	7.67	7.78 (0.500, 0.819)	7.78 (0.500, 0.819)	7.72 (0.736, 0.889)	7.56 (0.500, 0.819)
Días hasta la madurez (unidades de calor) ^f	(0.487)	2411	2413 (0.558, 0.819)	2415 (0.302, 0.819)	2416 (0.185, 0.819)	2417 (0.104, 0.819)
Altura de la planta (cm)	(0.676)	294	290 (0.206, 0.819)	290 (0.209, 0.819)	291 (0.350, 0.819)	291 (0.286, 0.819)
Altura de la espiga (cm)	(0.089)	124	120 (0.089, 0.819)	118 (0.018 ^m , 0.786)	121 (0.214, 0.819)	118 (0.016 ^m , 0.786)

^a Efecto del tratamiento global estimado utilizando una prueba F

^b Comparación de los tratamientos rociados y no rociados con el control utilizando una prueba t.

^c Valores P ajustados utilizando un procedimiento de tasa de descubrimiento falso (FDR).

5 ^d Estimación visual en escala 1-9; 9 = plantas altas con hojas grandes robustas.

^e Escala 0-100%; con 0 = sin lesiones y 100 = planta muerta.

^f El número de unidades de calor que se han acumulado desde el momento de la plantación.

^g Escala 0-100%; con % de granos de polen con paredes colapsadas.

^h Escala 0-100%; con % de granos de polen de color amarillo intenso.

10 ⁱ Estimación visual en escala 1-9 con 1 tejido verde no visible.

^j Estimación visual en la escala 1-9, siendo 1 poca resistencia a la enfermedad.

^k Estimación visual en la escala 1-9, siendo 1 deficiente resistencia al insecto.

^l NA = análisis estadístico no realizado, ya que no hay variabilidad entre las réplicas o el tratamiento.

^m Diferencia estadística indicada por valor P <0,05.

15

Ejemplo 6.4. Colección de muestra

Las muestras para análisis de expresión y composición se recogieron como se indica en la Tabla 14.

Tabla 14

Bloque	Tejido	Etapa de crecimiento aprox. ^a	Tamaño de la muestra	Muestras por entrada	
				Entrada 1 de control	Entradas 2-5 de ensayo
1 (expresión)	Hoja	V2-4	3 hojas	3	3
	Hoja	V9	3 hojas	3	3
	Polen ^b	R1	1 planta	3	3
	Raíz ^b	R1	1 planta	3	3
	Hoja ^b	R1	1 hoja	3	3
	Forraje	R4	2 plantas ^c	3	3
	Toda la planta	R6	2 plantas ^c	3	3
	Grano	R6-Madurez	1 espiga	3	3
Bloque	Tejido	Etapa de crecimiento ^a	Tamaño de la muestra	Entrada de control 1	Entradas de prueba 2-5
2 - 4 (composición)	Forraje	R4	3 plantas ^c	1	1
	Grano	R6-Madurez	5 espigas	1	1

^a Etapa de crecimiento aproximado.

^b Las muestras de polen, raíz y hojas recolectadas en R1 recolectadas de la misma planta.

5 ^c Dos plantas cortadas, combinadas y submuestreadas para la expresión, o 3 plantas para la composición.

Ejemplo 6.5. Determinación de la proteína *aad-1* en muestras de maíz

10 Se analizaron muestras de maíz para determinar la cantidad de proteína *aad-1*. La proteína *aad-1* extraíble soluble se cuantifica utilizando un kit de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de Beacon Analytical System, Inc. (Portland, ME).

15 Las muestras de tejidos de maíz se aislaron a partir de plantas de ensayo y se prepararon para el análisis de expresión mediante molienda gruesa, liofilización y molienda fina (si es necesario) con un Geno/Grinder (Certiprep, Metuchen, New Jersey). No se requirió preparación adicional para el polen. La proteína *aad-1* se extrajo a partir de tejidos de maíz con una solución salina tamponada con fosfato que contenía el detergente Tween-20 (PBST) que contenía un 0.5% de albúmina de suero bovino (BSA). Para el polen, la proteína se extrae con un tampón de PBST/BSA al 0.5% que contiene 1 mg/ml de ascorbato de sodio y 2% de cóctel inhibidor de proteasa. Los extractos de tejido vegetal y polen se centrifugaron; el sobrenadante acuoso se recogió, se diluyó con el tampón apropiado si fuera necesario y se analizó utilizando un kit de ELISA *aad-1* en formato sándwich. El kit utiliza las siguientes etapas. Una alícuota de la muestra diluida y un anticuerpo monoclonal anti-*aad-1* biotinilado se incuban en los pocillos de una placa de microtitulación recubierta con un anticuerpo monoclonal anti-*aad-1* inmovilizado. Los anticuerpos se unen con la proteína *aad-1* en los pocillos y forman un "sándwich" con la proteína *aad-1* unida entre los anticuerpos solubles e inmovilizados. Las muestras no unidas y el conjugado se eliminaron después de la placa lavando con PBST. Se añadió una cantidad en exceso de conjugado estreptavidina-enzima (fosfatasa alcalina) a los pocillos para la incubación. Al final del período de incubación, los reactivos no unidos se eliminaron de la placa mediante lavado. La posterior adición de un sustrato enzimático generó un producto coloreado. Dado que la *aad-1* se unió en el sándwich de anticuerpos, el nivel de desarrollo de color se relacionó con la concentración de *aad-1* en la muestra (es decir, las concentraciones más bajas de restos dan como resultado un menor desarrollo de color). La absorbancia a 405 nm se midió utilizando un lector de placa Molecular Devices V-max o Spectra Max 190. Se generó una curva de calibración y la concentración de *aad-1* en muestras desconocidas se calculó a partir de la ecuación de regresión polinomial utilizando el software Soft-MAX Pro™ que era compatible con el lector de placa. Las muestras se analizaron en pocillos duplicados y se dio a conocer la concentración promedio de los pocillos duplicados.

5 En la Tabla 15 se muestra un resumen de las concentraciones de proteína *aad-1* (promediada en todos los sitios) en las diferentes matrices de maíz. La concentración de proteína promedio de *aad-1* osciló entre 2,87 ng/mg de peso seco en la raíz de la etapa R1 y 127 ng/mg en el polen. Los resultados de expresión para las parcelas no rociadas y rociadas fueron similares. La proteína *aad-1* no se detectó en ninguna muestra control, con la excepción de una muestra de raíz control del sitio de Indiana.

Tabla 15. Resumen de los niveles de concentración media de la proteína *aad-1* medida en *aad-1* no rociada, *aad-1* + Quizalofop, *aad-1* + 2,4-D y *aad-1* + Quizalofop y 2,4-D en tejidos de maíz

Tejidos de maíz	Tratamiento	AAD-1 ng/mg tejido de peso seco		
		Promedio	DE	Intervalo
Hoja V2-V4	AAD-1 no rociada	13.4	8.00	1.98-29.9
	AAD-1 + Quizalofop	13.3	6.89	4.75-24.5
	AAD-1 + 2,4-D	14.2	7.16	4.98-26.7
	AAD-1 + Quizalofop y 2,4-D	12.3	7.09	4.07-22.5
Hoja V9	AAD-1 no rociada	5.96	2.50	2.67-10.9
	AAD-1 + Quizalofop	5.38	1.84	2.52-9.15
	AAD-1 + 2,4-D	6.37	2.41	3.03-10.9
	AAD-1 + Quizalofop y 2,4-D	6.52	2.38	3.11-11.1
Hoja V1	AAD-1 no rociada	5.57	1.66	3.47-9.34
	AAD-1 + Quizalofop	5.70	1.63	2.70-7.78
	AAD-1 + 2,4-D	5.99	1.90	2.40-9.42
	AAD-1 + Quizalofop y 2,4-D	6.06	2.27	1.55-10.2
Polen	AAD-1 no rociada	127	36.2	56.3-210
	AAD-1 + Quizalofop	108	29.9	52.2-146
	AAD-1 + 2,4-D	113	30.2	37.5-137
	AAD-1 + Quizalofop y 2,4-D	112	32.6	45.4-162
Raíz R1	AAD-1 no rociada	2.92	1.87	0.42-6.10
	AAD-1 + Quizalofop	3.09	1.80	0.56-6.06
	AAD-1 + 2,4-D	3.92	2.03	0.91-7.62
	AAD-1 + Quizalofop y 2,4-D	2.87	1.23	1.09-5.56
Forraje R4	AAD-1 no rociada	6.87	2.79	2.37-12.1
	AAD-1 + Quizalofop	7.16	2.84	3.05-11.6
	AAD-1 + 2,4-D	7.32	2.46	2.36-10.6
	AAD-1 + Quizalofop y 2,4-D	6.84	2.31	2.25-10.3

Tejidos de maíz	Tratamiento	AAD-1 ng/mg tejido de peso seco		
		Promedio	DE	Intervalo
Toda la planta	AAD-1 no rociada	4.53	2.55	0.78-8.88
	AAD-1 + Quizalofop	4.61	2.22	0.75-8.77
	AAD-1 + 2,4-D	5.16	2.53	0.83-10.2
	AAD-1 + Quizalofop y 2,4-D	4.55	1.77	1.30-8.21
Grano	AAD-1 no rociada	5.00	1.53	2.66-8.36
	AAD-1 + Quizalofop	4.63	1.51	1.07-6.84
	AAD-1 + 2,4-D	4.98	1.78	2.94-9.10
	AAD-1 + Quizalofop y 2,4-D	4.61	1.62	1.81-7.49

^a ND = valor menor que el método Límite de Detección (LOD, por sus siglas en inglés).

^b Los valores entre paréntesis están entre el método LOD y el límite de cuantificación (LOQ, por sus siglas en inglés).

5 Ejemplo 6.6. Análisis composicional

Las muestras de forraje y grano de maíz se analizaron para determinar el contenido de nutrientes con una variedad de ensayos. Los análisis realizados para el forraje incluyeron ceniza, grasa total, humedad, proteínas, carbohidratos, fibra cruda, fibra detergente ácido, fibra detergente neutro, calcio y fósforo. Los análisis realizados para granos incluyeron composiciones proximales (ceniza, grasa total, humedad, proteínas, carbohidratos, fibra cruda, fibra detergente ácido), fibra detergente neutro (NDF, por sus siglas en inglés), minerales, aminoácidos, ácidos grasos, vitaminas, metabolitos secundarios y antinutrientes. Los resultados del análisis nutricional para forraje y grano de maíz se compararon con los valores dados a conocer en la literatura (véase; Watson, 1982 (4); Watson, 1984 (5); ILSI Crop Composition Database, 2006 (6); OECD Consensus Document on Compositional Considerations for maize, 2002 (7); and Codex Alimentarius Commission 2001 (8)).

15 Ejemplo 6.6.1. Análisis de composiciones proximales, fibra y minerales del forraje.

Se realizó un análisis de la proteína, grasa, ceniza, humedad, hidratos de carbono, ADF, NDF, calcio y fósforo en muestras de forraje de maíz del control, entradas de *aad-1* no rociado, *aad-1* + quizalofop, *aad-1* + 2,4-D y *aad-1* + *ambos*. Un resumen de los resultados en todas las localizaciones se muestra en la Tabla 16. Para el análisis a través del sitio y del sitio individual, todos los valores medios de la composición proximal, de fibra y minerales estuvieron dentro de los intervalos de la literatura. No se observaron diferencias estadísticas en el análisis a través del sitio entre el control y las entradas transgénicas para humedad, ADF, NDF, calcio y fósforo. Para la proteína y la ceniza, se observaron pruebas t pareadas significativas para el *aad-1* no rociado (proteína), el *aad-1* + quizalofop (proteína) y el *aad-1* + *ambos* (ceniza), pero no fueron acompañados por efectos del tratamiento globales significativos o valores p ajustados por FDR. Para la grasa, se observó una prueba t pareada significativa y un valor p ajustado para *aad-1* + quizalofop en comparación con el control, pero no se observó un efecto del tratamiento global significativo. Para los carbohidratos, se observó un efecto del tratamiento global estadísticamente significativo, una prueba t pareada y un valor p ajustado por FDR entre el *aad-1* + quizalofop y el control. Además, para los carbohidratos, se observó una prueba t pareada significativa para la entrada de *aad-1* no rociada, pero sin un valor p ajustado por FDR significativo. Estas diferencias no son biológicamente significativas, ya que todos los resultados a través del sitio para estos analitos estuvieron dentro de los intervalos de la literatura dados a conocer para el maíz, y las diferencias del control fueron pequeñas (<23%).

Tabla 16. Resumen del análisis de composición proximal, fibra y minerales del forraje de maíz de todos los sitios

Composición proximal (% de peso seco)	Valores de la literatura ^a	Efecto del tratamiento global (Pr>F) ^b	Control	No rociado (valor P, ^c Adj.P) ^d	Rociado con Quizalofop (valor P, Adj. P)	Rociado con 2,4-D (valor P, Adj.P)	Rociado con ambos (valor P, Adj.P)	
Proteína	3.14-15.9	(0.054)	7.65	6.51 (0.016^e , 0.066)	6.41 (0.010^e , 0.051)	7.17 (0.285, 0.450)	7.13 (0.245, 0.402)	
Grasa	0.296-6.7	(0.068)	2.29	2.08 (0.202, 0.357)	1.78 (0.005^e , 0.028^e)	2.10 (0.233, 0.391)	2.01 (0.093, 0.213)	
Ceniza	1.3-10.5	(0.072)	3.90	3.84 (0.742, 0.859)	4.03 (0.525, 0.708)	3.99 (0.673, 0.799)	4.40 (0.019^e , 0.069)	
Humedad	53.3-87.5	(0.819)	69.5	69.2 (0.651, 0.782)	69.5 (0.988, 0.988)	69.8 (0.699, 0.820)	70.0 (0.501, 0.687)	
Carbohidratos	66.9-94.5	(0.026^e)	86.1	87.6 (0.015^e , 0.061)	87.8 (0.006^e , 0.034^e)	86.8 (0.262, 0.424)	86.5 (0.538, 0.708)	
Fibra (% de peso seco)								
Fibra de detergente ácido (ADF, por sus siglas en inglés)		16.1-47.4	(0.968)	26.5	26.6 (0.925, 0.970)	26.8 (0.833, 0.925)	26.0 (0.677, 0.800)	26.8 (0.851, 0.937)
Fibra de detergente neutro (NDF)		20.3-63.7	(0.345)	41.6	43.6 (0.169, 0.322)	43.3 (0.242, 0.402)	41.3 (0.809, 0.911)	41.6 (0.978, 0.985)
Minerales (% de peso seco)								
Calcio	0.071-0.6	(0.321)	0.212	0.203 (0.532, 0.708)	0.210 (0.930, 0.970)	0.215 (0.815, 0.911)	0.231 (0.150, 0.296)	
Fósforo	0.094-0.55	(0.163)	0.197	0.189 (0.198, 0.354)	0.202 (0.427, 0.615)	0.203 (0.288, 0.450)	0.200 (0.608, 0.762)	

^a Intervalo combinado.

^b Efecto del tratamiento global estimado utilizando una prueba F.

5 ^c Comparación de los tratamientos transgénicos con el control utilizando pruebas t.

^d Valores P ajustados utilizando un procedimiento de tasa de descubrimiento falso (FDR).

^e Diferencia estadística indicada por valor P <0,05.

Ejemplo 6.6.2. Análisis de composición proximal y fibra del grano

En la Tabla 17 se muestra un resumen de los resultados para las composiciones proximales (proteína, grasa, ceniza, humedad, colesterol y carbohidratos) y fibra (ADF, NDF y fibra dietética total) en el grano de maíz en todas las localizaciones. Todos los resultados para las composiciones proximales y fibra están dentro de los intervalos de la literatura, y no se observaron diferencias significativas en el análisis a través del sitio entre el control y las entradas transgénicas para grasa, ceniza, NDF y fibra dietética total. Para la humedad, se observó un efecto del tratamiento global significativo, pero no acompañado por pruebas t pareadas significativas o valores p ajustados por FDR. Para ADF, se observó una prueba t pareada significativa para *aad-1* + ambos, pero no se observó un efecto del tratamiento global significativo o un valor p ajustado por FDR. Tanto para proteínas como para carbohidratos, se encontraron pruebas pareadas significativas, valores p ajustados y efectos del tratamiento globales para el *aad-1* no rociado, *aad-1* + quizalofop, y *aad-1* + ambos. Dado que estas diferencias eran pequeñas (<12%) y todos los valores estaban dentro de los intervalos de la literatura, las diferencias no se consideran biológicamente significativas.

Tabla 17. Resumen del análisis de composición proximal y fibra del grano de maíz de todos los sitios.

Composición proximal (% de peso seco)	Valores de la literatura ^a	Efecto del tratamiento global (Pr>F) ^b	Control	No rociado (valor P, ^c Adj.P) ^d	Rociado con Quizalofop (valor P, Adj. P)	Rociado con 2,4-D (valor P, Adj.P)	Rociado con ambos (valor P, Adj.P)
Proteína	6-17.3	(0.003 ^e)	9.97	10.9 (0.002 ^e , 0.016 ^e)	11.1 (0.0004 ^e , 0.013 ^e)	10.5 (0.061, 0.161)	10.9 (0.002 ^e , 0.015 ^e)
Grasa	1.2-18.8	(0.369)	4.26	4.19 (0.238, 0.397)	4.16 (0.095, 0.215)	4.26 (0.955, 0.977)	4.22 (0.427, 0.615)
Ceniza	0.62-6.28	(0.553)	1.45	1.55 (0.178, 0.330)	1.52 (0.364, 0.557)	1.45 (0.982, 0.985)	1.51 (0.397, 0.587)
Humedad	6.1-40.5	(0.038 ^e)	25.1	25.5 (0.406, 0.594)	24.4 (0.056, 0.152)	24.5 (0.117, 0.254)	24.5 (0.114, 0.250)
Carbohidratos	NR ^f	NA ^g	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Proteína	63.3-89.8	(0.005 ^e)	84.3	83.3 (0.002 ^e , 0.015 ^e)	83.2 (0.001 ^e , 0.013 ^e)	83.8 (0.074, 0.185)	83.4 (0.003 ^e , 0.019 ^e)
Fibra (% de peso seco)							
Fibra de detergente ácido (ADF)	1.82-11.3	(0.247)	4.23	3.94 (0.130, 0.269)	3.99 (0.197, 0.354)	3.89 (0.078, 0.193)	3.82 (0.035 ^e , 0.106)
Fibra de detergente neutro (NDF)	5.59-22.6	(0.442)	10.6	10.3 (0.455, 0.638)	9.89 (0.120, 0.254)	9.90 (0.121, 0.254)	10.3 (0.552, 0.708)
Fibra dietética total	8.3-35.3	(0.579)	13.4	12.8 (0.164, 0.313)	12.9 (0.195, 0.353)	13.1 (0.487, 0.679)	12.9 (0.215, 0.370)

^a Intervalo combinado.

^b Efecto del tratamiento global estimado utilizando una prueba F.

^c Comparación de los tratamientos transgénicos con el control utilizando pruebas t.

5 ^d Valores P ajustados utilizando un procedimiento de tasa de descubrimiento falso (FDR).

^e Diferencia estadística indicada por valor P <0,05.

^f NR = No reportado.

^g NA = el análisis estadístico no se realizó ya que la mayoría de los datos fue <LOQ.

10 Ejemplo 6.6.3 Análisis de minerales de grano

Se realizó un análisis de muestras de granos de maíz para los minerales calcio, cromo, cobre, yodo, hierro, magnesio, manganeso, molibdeno, fósforo, potasio, selenio, sodio y zinc. En la Tabla 18 se muestra un resumen de los resultados en todas las localizaciones. Todos los resultados estuvieron dentro de los intervalos de la literatura dados a conocer. Para el análisis a través del sitio, no se observaron diferencias significativas para el calcio, el cobre, el hierro y el potasio. Los resultados promedio para cromo, yodo, selenio y sodio estuvieron por debajo del límite de cuantificación del método. Para el magnesio y el fósforo, se observaron pruebas t pareadas significativas para las entradas de *aad-1* no rociado y *aad-1* + quizalofop, pero no fueron acompañados por efectos del tratamiento globales significativos o valores p ajustados por FDR. Para el manganeso y el molibdeno, se observó una prueba t pareada significativa para el *aad-1* no rociado, pero no se encontró un valor p ajustado por FDR significativo y el efecto del tratamiento global. Para la entrada *aad-1* + ambos, se observó una prueba t pareada significativa para el zinc, pero no se presentó un valor p ajustado por FDR significativo o el efecto del tratamiento global. Además, estas diferencias del control fueron pequeñas (<13%), y todos los valores estaban dentro de los intervalos de la literatura, cuando estaban disponibles.

Tabla 18. Resumen del análisis mineral del grano de maíz de todos los sitios.

Minerales (mg/100g de peso seco)	Valores de la literatura ^a	Efecto del tratamiento global (Pr>F) ^b	Control	No rociado (valor P, ^c Adj.P) ^d	Rociado con Quizalofop (valor P, Adj. P)	Rociado con 2,4-D (valor P, Adj.P)	Rociado con ambos (valor P, Adj.P)
Calcio	1.27-100	(0.493)	4.05	4.21 (0.146, 0.289)	4.12 (0.505, 0.687)	4.04 (0.944, 0.977)	4.06 (0.898, 0.957)
Cromo	0.006-0.016	NA ^e	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Cobre	0.073-1.85	(0.963)	0.144	0.151 (0.655, 0.782)	0.146 (0.890, 0.957)	0.141 (0.817, 0.911)	0.149 (0.749, 0.863)
Yodo	7.3-81	NA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Hierro	0.1-10	(0.333)	2.49	2.60 (0.086, 0.206)	2.56 (0.310, 0.482)	2.51 (0.801, 0.911)	2.59 (0.145, 0.289)
Magnesio	59.4-1000	(0.072)	122	129 (0.010^f , 0.051)	128 (0.017^f , 0.066)	126 (0.145, 0.289)	127 (0.070, 0.177)
Manganeso	0.07-5.4	(0.099)	0.525	0.551 (0.025^f , 0.082)	0.524 (0.884, 0.957)	0.526 (0.942, 0.977)	0.532 (0.505, 0.687)

Minerales (mg/100g de peso seco)	Valores de la literatura ^a	Efecto del tratamiento global (Pr>F) ^b	Control	No rociado (valor P, ^c Adj.P) ^d	Rociado con Quizalofop (valor P, Adj. P)	Rociado con 2,4-D (valor P, Adj.P)	Rociado con ambos (valor P, Adj.P)
Molibdeno	NR	(0.143)	261	229 (0.020 ^f , 0.072)	236 (0.067, 0.173)	244 (0.206, 0.362)	234 (0.046, 0.132)
Fósforo	147-750	(0.102)	289	303 (0.012 ^f , 0.057)	300 (0.035 ^f , 0.106)	299 (0.055, 0.150)	298 (0.085, 0.206)
Potasio	181-720	(0.453)	362	368 (0.330, 0.510)	359 (0.655, 0.782)	364 (0.722, 0.839)	357 (0.454, 0.638)
Selenio	0.001-0.1	NA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Sodio	0-150	NA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Zinc	0.65-3.72	(0.166)	2.26	2.32 (0.183, 0.336)	2.34 (0.108, 0.238)	2.29 (0.627, 0.768)	2.37 (0.027 ^f , 0.085)

^a Intervalo combinado.

^b Efecto del tratamiento global estimado utilizando una prueba F.

^c Comparación de los tratamientos transgénicos con el control utilizando pruebas t.

5 ^d Valores P ajustados utilizando un procedimiento de tasa de descubrimiento falso (FDR).

^e NA = el análisis estadístico no se realizó ya que la mayoría de los datos fue <LOQ.

^g Diferencia estadística indicada por valor P <0,05.

Ejemplo 6.6.4 Análisis de aminoácidos de grano

- 10 Las muestras de maíz se analizaron para determinar el contenido de aminoácidos en el control, maíz *aad-1* no rociado, *aad-1* + quizalofop, *aad-1* + 2,4-D y *aad-1* + ambos, y un resumen de los resultados en todas las localizaciones y por sitio de campo individual se muestran en la Tabla 19. Los niveles de todos los aminoácidos se dieron a conocer dentro de los intervalos de la literatura, y no se observaron diferencias significativas en el análisis a través de sitio para la arginina, lisina y tirosina. Se observaron diferencias significativas para varios de los aminoácidos en el análisis a través de sitio. En estos casos, el contenido de aminoácidos del control fue más bajo que las líneas transgénicas de *aad-1*, lo que puede estar relacionado con el contenido total de proteínas más bajo en el grano control en comparación con las líneas *aad-1*. Para la entrada de *aad-1* no rociado, se encontraron efectos del tratamiento globales significativos junto con pruebas t pareadas significativas y valores p ajustados por FDR para todos los aminoácidos excepto arginina, glicina, lisina, triptófano y tirosina. Para la entrada *aad-1* + quizalofop, se encontraron efectos del tratamiento globales significativos junto con pruebas t pareadas significativas y valores p ajustados por FDR para todos los aminoácidos excepto arginina, cisteína, glicina, lisina, triptófano y tirosina. Para la entrada *aad-1* + 2,4-D, se encontraron efectos del tratamiento globales significativos junto con pruebas t pareadas significativas (con valores p ajustados por FDR significativos) para todos los aminoácidos excepto arginina, ácido aspártico, glicina, histidina, lisina, tirosina y valina. Para la entrada *aad-1* + ambos, se encontraron efectos del tratamiento globales significativos junto con pruebas t pareadas significativas y valores p ajustados por FDR para todos los aminoácidos excepto arginina, glicina, lisina, serina, triptófano y tirosina. Aunque se observaron muchas diferencias para los aminoácidos, las diferencias fueron pequeñas (<15%), no se observaron en todos los sitios, y todos los valores medios se dieron a conocer dentro de los intervalos de la literatura.

Tabla 19. Resumen del análisis de aminoácidos de grano de maíz de todos los sitios.

Aminoácidos (% de peso seco)	Valores de la literatura ^a	Efecto del tratamiento global (Pr>F) ^b	Control	No rociado (valor P, ^c Adj. P) ^d	Rociado con Quizalofop (valor P, Adj. P)	Rociado con 2,4-D (valor P, Adj. P)	Rociado con ambos (valor P, Adj. P)
Alanina	0.44-1.39	(0.002 ^e)	0.806	0.901 (0.0005 ^e , 0.013 ^e)	0.900 (0.0005 ^e , 0.013 ^e)	0.863 (0.021 ^e , 0.074)	0.894 (0.001 ^e , 0.013 ^e)
Arginina	0.12-0.64	(0.371)	0.486	0.499 (0.286, 0.450)	0.505 (0.139, 0.283)	0.487 (0.929, 0.970)	0.484 (0.897, 0.957)
Ácido aspártico	0.34-1.21	(0.010 ^e)	0.712	0.768 (0.002 ^e , 0.015 ^e)	0.764 (0.003 ^e , 0.021 ^e)	0.743 (0.060, 0.160)	0.762 (0.004 ^e , 0.027 ^e)
Cisteína	0.08-0.51	(0.033 ^e)	0.213	0.225 (0.009 ^e , 0.050 ^e)	0.223 (0.020 ^e , 0.072)	0.223 (0.018 ^e , 0.067)	0.226 (0.005 ^e , 0.028 ^e)
Ácido glutámico	0.97-3.54	(0.001 ^e)	1.97	2.22 (0.0003 ^e , 0.013 ^e)	2.21 (0.0004 ^e , 0.013 ^e)	2.12 (0.017 ^e , 0.067)	2.20 (0.001 ^e , 0.013 ^e)
Glicina	0.18-0.54	(0.052)	0.383	0.397 (0.018 ^e , 0.067)	0.398 (0.013 ^e , 0.059)	0.390 (0.217, 0.371)	0.397 (0.016 ^e , 0.066)
Histidina	0.14-0.43	(0.005 ^e)	0.283	0.303 (0.001 ^e , 0.013 ^e)	0.302 (0.002 ^e , 0.014 ^e)	0.295 (0.036, 0.109)	0.302 (0.002 ^e , 0.014 ^e)
Isoleucina	0.18-0.71	(0.003 ^e)	0.386	0.427 (0.001 ^e , 0.014 ^e)	0.427 (0.001 ^e , 0.014 ^e)	0.410 (0.044 ^e , 0.127)	0.431 (0.001 ^e , 0.013 ^e)
Leucina	0.64-2.49	(0.001 ^e)	1.35	1.54 (0.0003 ^e , 0.013 ^e)	1.54 (0.0003 ^e , 0.013 ^e)	1.47 (0.013 ^e , 0.059)	1.53 (0.001 ^e , 0.013 ^e)
Lisina	0.05-0.56	(0.211)	0.310	0.315 (0.210, 0.367)	0.316 (0.128, 0.265)	0.309 (0.879, 0.956)	0.316 (0.102, 0.226)
Metionina	0.10-0.47	(0.003 ^e)	0.195	0.209 (0.001 ^e , 0.013 ^e)	0.209 (0.001 ^e , 0.013 ^e)	0.205 (0.014 ^e , 0.061)	0.208 (0.001 ^e , 0.014 ^e)
Fenilalanina	0.24-0.93	(0.002 ^e)	0.551	0.617 (0.001 ^e , 0.013 ^e)	0.619 (0.001 ^e , 0.013 ^e)	0.592 (0.023 ^e , 0.077)	0.615 (0.001 ^e , 0.013 ^e)

Aminoácidos (% de peso seco)	Valores de la literatura ^a	Efecto del tratamiento global (Pr>F) ^b	Control	No rociado (valor P, ^c Adj. P) ^d	Rociado con Quizalofop (valor P, Adj. P)	Rociado con 2,4-D (valor P, Adj. P)	Rociado con ambos (valor P, Adj. P)
Prolina	0.46-1.63	(0.002 ^e)	0.910	1.01 (0.0004 ^e , 0.013 ^e)	1.01 (0.001 ^e , 0.013 ^e)	0.975 (0.012 ^e , 0.059)	0.997 (0.001 ^e , 0.014 ^e)
Serina	0.24-0.91	(0.009 ^e)	0.498	0.550 (0.002 ^e , 0.014 ^e)	0.550 (0.001 ^e , 0.014 ^e)	0.529 (0.042 ^e , 0.122)	0.536 (0.015 ^e , 0.061)
Treonina	0.22-0.67	(0.005 ^e)	0.364	0.394 (0.001 ^e , 0.014 ^e)	0.394 (0.001 ^e , 0.013 ^e)	0.384 (0.023 ^e , 0.077)	0.390 (0.003 ^e , 0.020 ^e)
Triptófano	0.03-0.22	(0.088)	0.052	0.055 (0.067, 0.173)	0.056 (0.025 ^e , 0.082)	0.056 (0.014 ^e , 0.060)	0.056 (0.029 ^e , 0.092)
Tirosina	0.10-0.79	(0.390)	0.336	0.355 (0.535, 0.708)	0.375 (0.214, 0.370)	0.339 (0.907, 0.964)	0.314 (0.500, 0.687)
Valina	0.21-0.86	(0.005 ^e)	0.495	0.537 (0.002 ^e , 0.014 ^e)	0.538 (0.002 ^e , 0.014 ^e)	0.519 (0.054, 0.148)	0.538 (0.001 ^e , 0.014 ^e)

^a Intervalo combinado.

^b Efecto del tratamiento global estimado utilizando una prueba F.

^c Comparación de los tratamientos transgénicos con el control utilizando pruebas t.

5 ^d Valores P ajustados utilizando un procedimiento de tasa de descubrimiento falso (FDR).

^e Diferencia estadística indicada por valor P <0,05.

Ejemplo 6.6.5. Análisis de ácidos grasos del grano

10 Se realizó un análisis de muestras de grano de maíz para ácidos grasos. En la Tabla 20 se muestra un resumen de los resultados en todas las localizaciones. Todos los resultados para el control, muestras de grano de maíz *aad-1* no rociado, *aad-1* + quizalofop, *aad-1* + 2,4-D y *aad-1* + ambos analizados para estos ácidos grasos estuvieron dentro de los intervalos de la literatura publicada. Los resultados para caprílico (8:0), cáprico (10:0), láurico (12:0), mirístico (14:0), miristoleico (14:1), pentadecanoico (15:0), pentadecenoico (15:1), heptadecanoico (17:0), heptadecenoico (17:1), gamma linolénico (18:3), eicosadienoico (20:2), eicosatrienoico (20:3), y araquidónico (20:4) estaban por debajo del método de límite de cuantificación (LOQ). En el análisis a través del sitio, no se observaron diferencias significativas para palmítico 16:0, palmitoleico 16:1, esteárico 18:0, linoleico 18:2, linolénico 18:3 y araquídico 20:0. Para oleico 18:1 y eicosenoico 20:1, se observaron pruebas t pareadas significativas para las entradas de *aad-1* no rociado (18:1) y *aad-1* + 2,4-D (18:1 y 20:1), pero no fueron acompañados por efectos del tratamiento globales significativos o valores p ajustados por FDR. Para behénico 22:0, se encontró un efecto del tratamiento global significativo y pruebas t paradas significativas para *aad-1* + 2,4-D y *aad-1* + ambos, pero no hubo valores p ajustados por FDR significativos.

15

20

Tabla 20. Resumen del análisis de ácidos grasos del grano de maíz de todos los sitios.

Ácidos grasos (% total de ácidos grasos) ^a	Valores de la literatura ^b	Efecto del tratamiento global (Pr>F) ^c	Control	No rociado (Valor P, ^d Adj. P) ^e	Rociado con Quizalofop (Valor P, Adj. P)	Rociado con 2,4-D (Valor P, Adj. P)	Rociado con ambos (Valor P, Adj. P)
Caprílico 8:0	0.13-0.34	NA ^f	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Cáprico 10:0	ND	NA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Laurico 12:0	ND-0.687	NA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Mirístico 14:0	ND-0.3	NA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Miristoleico 14:1	NR	NA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Pentadecanoico 15:0	NR	NA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Pentadecenoico 15:1	NR	NA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Palmítico 16:0	7-20.7	(0.559)	9.83	9.88 (0.618, 0.763)	9.95 (0.280, 0.445)	9.78 (0.617, 0.763)	9.90 (0.544, 0.708)
Palmitoleico 16:1	ND-1.0	(0.552)	0.056	0.044 (0.804, 0.911)	0.047 (0.551, 0.708)	0.041 (0.555, 0.708)	0.079 (0.392, 0.582)
Heptadecanoico 17:0	ND-0.11	NA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Heptadecenoico 17:1	ND-0.1	NA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Estearico 18:0	ND-3.4	(0.561)	2.04	1.98 (0.119, 0.254)	2.01 (0.437, 0.626)	2.00 (0.259, 0.421)	2.02 (0.598, 0.756)
Oleico 18:1	17.4 - 46	(0.076)	31.3	30.4 (0.013 ^g , 0.059)	30.8 (0.178, 0.329)	30.4 (0.015 ^g , 0.061)	30.7 (0.092, 0.213)
Linoleico 18:2	34.0-70	(0.474)	47.5	48.3 (0.189, 0.345)	48.4 (0.144, 0.289)	48.0 (0.453, 0.638)	48.5 (0.119, 0.254)
Gamma Linolénico 18:3	NR	NA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Linolénico 18:3	ND-2.25	(0.479)	1.04	1.05 (0.537, 0.708)	1.06 (0.202, 0.357)	1.04 (0.842, 0.932)	1.06 (0.266, 0.428)

Ácidos grasos (% total de ácidos grasos) ^a	Valores de la literatura ^b	Efecto del tratamiento global (Pr>F) ^c	Control	No rociado (Valor P, ^d Adj. P) ^e	Rociado con Quizalofop (Valor P, Adj. P)	Rociado con 2,4-D (Valor P, Adj. P)	Rociado con ambos (Valor P, Adj. P)
Aracídico 20:0	0.1-2	(0.379)	0.400	0.386 (0.061, 0.161)	0.393 (0.341, 0.525)	0.390 (0.153, 0.297)	0.390 (0.175, 0.328)
Eicosenoico 20:1	0.17-1.92	(0.107)	0.232	0.226 (0.089, 0.210)	0.230 (0.497, 0.687)	0.223 (0.013^g , 0.059)	0.227 (0.121, 0.254)
Eicosadienoico 20:2	ND-0.53	NA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Eicosatrienoico 20:3	0.275	NA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Araquidónico 20:4	0.465	NA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Behénico 22:0	ND-0.5	(0.044^g)	0.136	0.088 (0.093, 0.213)	0.076 (0.887, 0.957)	0.086 (0.011^g , 0.054)	0.108 (0.023^g , 0.077)

^a Resultados convertidos de unidades de % de peso seco a % de ácidos grasos.

^b Intervalo combinado.

^c Efecto del tratamiento global estimado utilizando una prueba F.

5 ^d Comparación de los tratamientos transgénicos con el control utilizando pruebas t.

^e Valores P ajustados utilizando un procedimiento de tasa de descubrimiento falso (FDR).

^f NA = no se realizó análisis estadístico ya que la mayoría de los datos fueron < LOQ.

^g Diferencia estadística indicada por el valor P < 0.05.

10 Ejemplo 6.6.6. Análisis de vitaminas del grano

Se determinaron los niveles de vitamina A, B1, B2, B5, B6, B12, C, D, E, niacina y ácido fólico en muestras de granos de maíz del control, entradas de maíz de *aad-1* no rociado, *aad-1* + quizalofop, *aad-1* + 2,4-D y *aad-1* + ambos. En la Tabla 21 se muestra un resumen de los resultados en todas las localizaciones. Las vitaminas B12, D y E no eran cuantificables por los métodos analíticos utilizados. Todos los resultados promedio dados a conocer de las vitaminas fueron similares a los valores dados a conocer en la literatura, cuando estaban disponibles. Los resultados de las vitaminas sin intervalos de literatura dados a conocer (vitaminas B5 y C) fueron similares a los valores de control obtenidos (<22% de diferencia con respecto al control). Para el análisis a través del sitio, no se observaron diferencias estadísticas, con la excepción de las vitaminas B1, C y niacina. Se observaron pruebas t pareadas significativas para las vitaminas B1 entre el control y los *aad-1* no rociados, *aad-1* + quizalofop y *aad-1* + ambos, pero no estuvieron acompañadas de efectos del tratamiento globales significativos o de valores p ajustados por FDR. Para la vitamina C, se observó un efecto del tratamiento global significativo junto con pruebas t pareadas y valores p ajustados por FDR significativos para *aad-1* + quizalofop y *aad-1* + 2,4-D. De manera similar para la niacina, se observó un efecto del tratamiento global significativo junto con pruebas de t pareadas y valores p ajustados por FDR significativos para *aad-1* + quizalofop y *aad-1* + ambos. También se encontró una prueba t pareada significativa para el *aad-1* + 2,4-D para niacina para la entrada de *aad-1* + 2,4-D, pero no fue acompañada por un efecto del tratamiento global significativo o un valor p ajustado por el FDR. Dado que las diferencias no se observaron a través de los sitios y los valores estaban dentro de los intervalos de la literatura (cuando están disponibles), las diferencias no se consideran biológicamente significativas.

Tabla 21. Resumen del análisis de vitaminas del grano de maíz de todos los sitios.

Vitaminas (mg/kg de peso seco)	Valores de la literatura ^a	Efecto del tratamiento global (Pr>F) ^b	Control	No rociado (Valor P, ^c Adj. P) ^d	Rociado con Quizalofop (Valor P, Adj. P)	Rociado con 2,4-D (Valor P, Adj. P)	Rociado con ambos (Valor P, Adj. P)
Beta caroteno (Vitamina A)	0.19 - 46.8	(0.649)	1.80	1.85 (0.372, 0.566)	1.80 (0.967, 0.983)	1.82 (0.770, 0.883)	1.87 (0.221, 0.376)
Vitamina B1 (Tiamina)	1.3 - 40	(0.068)	3.47	3.63 (0.041^e , 0.121)	3.67 (0.013^e , 0.059)	3.54 (0.375, 0.567)	3.64 (0.032^e , 0.100)
Vitamina B2 (Riboflavina)	0.25 - 5.6	(0.803)	2.15	2.05 (0.443, 0.631)	2.08 (0.600, 0.756)	1.99 (0.227, 0.383)	2.07 (0.543, 0.708)
Vitamina B5 (Ácido pantoténico)	NR ^f	(0.820)	5.28	5.17 (0.623, 0.766)	5.09 (0.391, 0.582)	5.29 (0.968, 0.983)	5.10 (0.424, 0.615)
Vitamina B6 (Piridoxina)	3.68 - 11.3	(0.431)	6.52	6.57 (0.859, 0.938)	6.66 (0.652, 0.782)	6.66 (0.652, 0.782)	7.08 (0.088, 0.210)
Vitamina B12	NR	NA ^g	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Vitamina C	NR	(0.018^e)	22.4	21.2 (0.268, 0.429)	17.5 (0.005^e , 0.028^e)	18.0 (0.004^e , 0.026^e)	20.4 (0.068, 0.173)
Vitamina D	NR	NA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Vitamina E (Alfa tocoferol)	1.5 - 68.7	(0.558)	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Niacina (Ácido nicotínico, vit. B3)	9.3 - 70	(0.013^e)	26.1	24.2 (0.050, 0.140)	22.9 (0.002^e , 0.017^e)	23.7 (0.018^e , 0.067)	22.9 (0.002^e , 0.016^e)
Ácido fólico	0.15 - 683	(0.881)	0.594	0.588 (0.779, 0.890)	0.574 (0.403, 0.592)	0.592 (0.931, 0.970)	0.597 (0.916, 0.970)

^a Intervalo combinado.^b Efecto del tratamiento global estimado utilizando una prueba F.5 ^c Comparación de los tratamientos transgénicos con el control utilizando pruebas t.^d Valores P ajustados utilizando un procedimiento de tasa de descubrimiento falso (FDR).^e Diferencia estadística indicada por el valor P < 0,05.^f NR = no reportado.^g NA = no se realizó análisis estadístico ya que la mayoría de los datos fueron < LOQ.

Ejemplo 6.6.7. Análisis de los metabolitos secundarios y de los anti-nutrientes del grano

Se determinaron los niveles de metabolitos secundarios (ácido cumárico, ácido ferúlico, furfural e inositol) y antinutrientes (ácido fítico, rafinosa e inhibidor de tripsina) en muestras de granos de maíz del control, entradas de maíz de *aad-1* no rociado, *aad-1* + quizalofop, *aad-1* + 2,4-D y *aad-1* + ambos. En las Tablas 22 y 23 se muestra un resumen de los resultados en todas las localizaciones. Para el análisis a través del sitio, todos los valores estaban dentro de los intervalos de la literatura. No se observaron diferencias significativas entre las entradas *aad-1* y los resultados de la entrada de control en el análisis a través de sitio para el inositol y el inhibidor de la tripsina. Los resultados para el furfural y la rafinosa estuvieron por debajo del límite de cuantificación del método. Se observaron pruebas t pareadas significativas para el ácido cumárico (*aad-1* no rociado, *aad-1* + 2,4-D y *aad-1* + ambos), y para el ácido ferúlico (*aad-1* + quizalofop y *aad-1* + ambos). Estas diferencias no fueron acompañadas de efectos del tratamiento globales significativos o de valores p ajustados por FDR y fueron similares al control (diferencia <10%). Se encontró un efecto del tratamiento global significativo, una prueba t pareada y un valor p ajustado por FDR para el ácido fítico (*aad-1* no rociado). Dado que todos los resultados estaban dentro de los intervalos de la literatura y eran similares al control (<11% de diferencia), estas diferencias no se consideran biológicamente significativas.

Tabla 22. Resumen del análisis de metabolitos secundarios del grano de maíz de todos los sitios.

Metabolito secundario (% de peso seco)	Valores de la literatura ^a	Efecto del tratamiento global (Pr>F) ^b	Control	No rociado (Valor P, ^c Adj. P) ^d	Rociado con Quizalofop (Valor P, Adj. P)	Rociado con 2,4-D (Valor P, Adj. P)	Rociado con ambos (Valor P, Adj. P)
Ácido cumárico	0.003-0.058	(0.119)	0.021	0.020 (0.038 ^e , 0.113)	0.020 (0.090, 0.211)	0.019 (0.022 ^e , 0.074)	0.020 (0.029 ^e , 0.091)
Ácido Ferúlico	0.02-0.389	(0.077)	0.208	0.199 (0.051, 0.141)	0.196 (0.010 ^e , 0.051)	0.200 (0.080, 0.196)	0.197 (0.019 ^e , 0.069)
Furfural	0.0003-0.0006	NA ^f	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Inositol	0.0089-0.377	(0.734)	0.218	0.224 (0.548, 0.708)	0.218 (0.973, 0.984)	0.213 (0.612, 0.763)	0.211 (0.526, 0.708)

^a Intervalo combinado.^b Efecto del tratamiento global estimado utilizando una prueba F.^c Comparación de los tratamientos transgénicos con el control utilizando pruebas t.^d Valores P ajustados utilizando un procedimiento de tasa de descubrimiento falso (FDR).^e Diferencia estadística indicada por el valor P <0,05.^f NA = no se realizó análisis estadístico ya que la mayoría de los datos fueron < LOQ.

Tabla 23. Resumen del análisis de anti-nutrientes del grano de maíz de todos los sitios.

Anti-Nutrientes (% de peso seco)	Valores de la literatura ^a	Efecto del tratamiento global (Pr>F) ^b	Control	No rociado (Valor P, ^c Adj. P) ^d	Rociado con Quisalofof (Valor P, Adj. P)	Rociado con 2,4-D (Valor P, Adj. P)	Rociado con ambos (Valor P, Adj. P)
Ácido fítico	0.11-1.57	(0.046 ^e)	0.727	0.806 (0.003 ^e , 0.020 ^e)	0.767 (0.099, 0.224)	0.755 (0.245, 0.402)	0.761 (0.158, 0.304)
Rafinosa	0.02-0.32	NA ^f	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Inhibidor de tripsina (TIU/mg)	1.09-7.18	(0.742)	5.08	5.10 (0.954, 0.977)	4.87 (0.631, 0.770)	5.45 (0.387, 0.582)	5.18 (0.813, 0.911)

^a Intervalo combinado.^b Efecto del tratamiento global estimado utilizando una prueba F.5 ^c Comparación de los tratamientos transgénicos con el control utilizando pruebas t.^d Valores P ajustados utilizando un procedimiento de tasa de descubrimiento falso (FDR).^e Diferencia estadística indicada por el valor P <0,05.^f NA = no se realizó análisis estadístico ya que la mayoría de los datos fueron < LOQ.

10 Ejemplo 7 - Ensayos agronómicos adicionales

Las características agronómicas de la línea de maíz 40278 comparada con una línea de maíz casi isolínea fueron evaluadas en diversos ambientes. Los tratamientos incluyeron 4 híbridos genéticamente distintos y sus correspondientes híbridos control casi isolínea sometidos a ensayo en un total de 21 localizaciones.

15 Los cuatro híbridos de ensayo eran híbridos de madurez media a tardía que oscilaban entre 99 y 113 días de madurez relativa. El experimento A sometió a ensayo el evento DAS-40278-9 en el origen genético consanguíneo C x conversión BC3S1. Este híbrido tiene una madurez relativa de 109 días y se sometió a ensayo en 16 localizaciones (Tabla 24). El Experimento B sometió a ensayo el híbrido con origen consanguíneo E x conversión BC3S1, un híbrido de madurez relativa de 113 días. Este híbrido se sometió a ensayo en 14 localizaciones, utilizando un conjunto de localizaciones ligeramente diferentes al del Experimento A (Tabla 24). Los experimentos C y D sometieron a ensayo los orígenes de híbridos conversión BC2S1 x consanguíneo D y conversión BC2S1 x consanguíneo F, respectivamente. Ambos híbridos tienen una madurez relativa de 99 días y fueron sometidos a ensayo en las mismas 10 ubicaciones.

Tabla 24. Ubicación de los ensayos agronómicos

Ubicación	Experimento			
	2A	2B	2C	2D
Atlantic, IA	X	X		
Fort Dodge, IA	X	X	X	X
Huxley, IA	X	X	X	X
Nora Springs, IA	X			
Wyman, IA	X	X		
Lincoln, IL		X		

Ubicación	Experimento			
	2A	2B	2C	2D
Pontiac, IL	X	X	X	X
Princeton, IL	X	X		
Seymour, IL	X			
Shannon, IL	X		X	X
Viola, IL	X	X		
Bremen, IN	X	X	X	X
Evansville, IN		X		
Fowler, IN	X	X	X	X
Mt. Vernon, IN		X		
Olivia, MN			X	X
Wayne, NE	X	X		
York, NE	X	X		
Arlington, WI	X		X	X
Patteville, WI	X		X	X
Watertown, WI			X	X

Para cada ensayo, se utilizó un diseño de bloques completos al azar con dos repeticiones por localización y parcelas de dos líneas. La longitud de la línea fue de 6.1 m (20 pies) y cada fila se sembró con 34 semillas por fila. Se utilizaron prácticas agronómicas regionales estándar en el manejo de los ensayos.

Se recogieron y analizaron los datos de ocho características agronómicas: altura de la planta, altura de las espigas, encamado del tallo, encamado de la raíz, población final, humedad del grano, peso de la muestra y rendimiento. Los parámetros altura de la planta y altura de la espiga proporcionan información sobre la apariencia de los híbridos. Las características agronómicas del porcentaje de encamado del tallo y de la raíz determinan la capacidad de cosecha de un híbrido. El recuento de la población final mide la calidad de las semillas y las condiciones de crecimiento estacional que afectan el rendimiento. El porcentaje de humedad del grano en la cosecha define la madurez del híbrido, y el rendimiento (kg/ha (fanegas/acre) ajustado para la humedad) y el peso de la muestra (peso en kg (libras)) de un m³ (fanega) de maíz ajustado a 15.5% de humedad) describen la capacidad reproductiva del híbrido.

El análisis de la varianza se llevó a cabo en todos los sitios de campo utilizando un modelo lineal. La entrada y la localización se incluyeron en el modelo como efectos fijos. Se exploraron modelos mixtos que incluían la localización y la localización por entrada como efectos aleatorios, pero la localización por entrada explicaba sólo una pequeña parte de la varianza y su componente de varianza a menudo no era significativamente diferente de cero. Para el encamado de tallos y raíces se utilizó una transformación logarítmica para estabilizar la varianza, sin embargo, las medias e intervalos se dieron a conocer en la escala original. Se declararon diferencias significativas en el nivel de confianza de 95%. La importancia de un efecto del tratamiento global se estimó mediante una prueba t.

Los resultados de estos ensayos de caracterización agronómica se pueden encontrar en la Tabla 2. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los cuatro híbridos 40278 en comparación con los controles de la isolínea (a $p < 0.05$) para los parámetros de altura de la espiga, encamado del tallo, encamado de la raíz, humedad del grano, peso de la muestra y rendimiento. El recuento de la poblacional final y la altura de la planta fueron estadísticamente diferentes en los Experimentos A y B, respectivamente, pero no se observaron diferencias similares en las comparaciones con los otros híbridos 40278 sometidos a ensayo. Algunas de las variaciones observadas se pueden deber a los bajos niveles de variabilidad genética que quedan desde el retrocruzamiento del evento DAS-

40278-9 hacia las líneas consanguíneas elite. El intervalo total de valores para los parámetros medidos está dentro del intervalo de valores obtenidos para los híbridos de maíz tradicionales y no conduciría a una conclusión de aumento de malezas. En resumen, los datos de caracterización agronómica indican que el maíz 40278 es biológicamente equivalente al maíz convencional.

5

Tabla 25. Análisis de las características agronómicas

Experimento A

Parámetro (unidades)	Tratamiento	Media	Intervalo		Valor p
			Min	Max	
Altura de la planta (metros)	AAD-1	2.45 (96.31 pulgadas)	2.39 (94.00 pulgadas)	2.51 (99.00 pulgadas)	0.6174
	Control	2.42 (95.41 pulgadas)	2.41 (95.00 pulgadas)	2.49 (98.00 pulgadas)	
Altura de la espiga (metros)	AAD-1	1.04 (41.08 pulgadas)	0.76 (30.00 pulgadas)	1.22 (48.00 pulgadas)	0.4538
	Control	1.13 (44.42 pulgadas)	1.02 (40.00 pulgadas)	1.19 (47.00 pulgadas)	
Encamado del tallo (%)	AAD-1	3.64	0.00	27.70	0.2020
	Control	2.49	0.00	28.57	
Encamado de la raíz (%)	AAD-1	1.00	0.00	7.81	0.7658
	Control	0.89	0.00	28.33	
Población final (plantas/hectárea en 1000)	AAD-1	76.75 (31.06 plantas/acre en 1000)	66.72 (27.00 plantas/acre en 1000)	88.96 (36.00 plantas/acre en 1000)	0.0230
	Control	79.49 (32.17 plantas/acre en 1000)	66.72 (27.00 plantas/acre en 1000)	88.96 (36.00 plantas/acre en 1000)	
Humedad del grano (%)	AAD-1	22.10	14.32	27.80	0.5132
	Control	21.84	14.52	31.00	
Peso de la muestra (kg/m ³)	AAD-1	70.71 (54.94 lb/fanega)	65.78 (51.10 lb/fanega)	73.11 (56.80 lb/fanega)	0.4123
	Control	70.36 (54.66 lb/fanega)	65.65 (51.00 lb/fanega)	73.11 (56.80 lb/fanega)	
Rendimiento (kg/ha)	AAD-1	13013.08 (193.50 fanegas/acre)	9337.81 (138.85 fanegas/acre)	15426.05(229.38 fanegas/acre)	0.9712
	Control	12579.31 (187.05 fanegas/acre)	6716.36 (99.87 fanegas/acre)	17264.69 (256.72 fanegas/acre)	

Experimento B

Parámetro (unidades)	Tratamiento	Promedio	Intervalo		Valor p
			Min	Max	
Altura de la planta (metros)	AAD-1	2.72 (106.92 pulgadas)	2.64 (104.00 pulgadas)	2.74 (108.00 pulgadas)	0.0178
	Control	2.56 (100.79 pulgadas)	2.41 (95.00 pulgadas)	2.64 (104.00 pulgadas)	
Altura de la espiga (metros)	AAD-1	1.31 (51.75 pulgadas)	1.24 (49.00 pulgadas)	1.27 (50.00 pulgadas)	0.1552
	Control	1.16 (45.63 pulgadas)	0.97 (38.00 pulgadas)	1.27 (50.00 pulgadas)	
Encamado del tallo (%)	AAD-1	1.24	0.00	15.07	0.1513
	Control	0.72	0.00	22.22	
Encamado de la raíz (%)	AAD-1	0.64	0.00	6.15	0.2498
	Control	0.40	0.00	9.09	
Población final (plantas/ha en 1000)	AAD-1	77.34 (31.30 plantas/acre en 1000)	64.25 (26.00 plantas/acre en 1000)	91.43 (37.00 plantas/acre en 1000)	0.4001
	Control	76.55 (30.98 plantas/acre en 1000)	61.78 (25.00 plantas/acre en 1000)	86.49 (35.00 plantas/acre en 1000)	
Humedad del grano (%)	AAD-1	23.71	14.34	28.70	0.9869
	Control	23.72	13.39	31.10	
Peso de la muestra (kg/m ³)	AAD-1	73.32 (56.96 lb/fanega)	65.52 (50.90 lb/fanega)	76.58 (59.50 lb/fanega)	0.2796
	Control	72.94 (56.67 lb/fanega)	66.93 (52.00 lb/fanega)	77.36 (60.10 lb/fanega)	
Rendimiento (kg/ha)	AAD-1	13455.59 (200.08 fanegas/acre)	6881.13 (102.32 fanegas/acre)	17374.99 (258.36 fanegas/acre)	0.2031
	Control	13814.04 (205.41 fanegas/acre)	6412.38 (95.35 fanegas/acre)	17420.04 (259.03 fanegas/acre)	

Experimento C

Parámetro (unidades)	Tratamiento	Promedio	Intervalo		Valor p
			Min	Max	
Altura de la planta (metros)	AAD-1	2.44 (95.92 pulgadas)	2.39 (94.00 pulgadas)	2.44 (96.00 pulgadas)	0.1262
	Control	2.31 (90.92 pulgadas)	2.29 (90.00 pulgadas)	2.29 (90.00 pulgadas)	
Altura de la espiga (metros)	AAD-1	1.21 (47.75 pulgadas)	1.04 (41.00 pulgadas)	1.27 (50.00 pulgadas)	0.4630
	Control	1.11 (43.75 pulgadas)	0.94 (37.00 pulgadas)	1.17 (46.00 pulgadas)	
Encamado del tallo (%)	AAD-1	6.74	0.00	27.47	0.4964
	Control	5.46	0.00	28.12	
Encamado de la raíz (%)	AAD-1	0.3512	0.00	7.58	0.8783
	Control	0.3077	0.00	33.33	
Población final (plantas/ha en 1000)	AAD-1	81.00 (32.78 plantas/acre en 1000)	71.66 (29.00 plantas/acre en 1000)	88.96 (36.00 plantas/acre en 1000)	0.0543
	Control	78.28 (31.68 plantas/acre en 1000)	59.31 (24.00 plantas/acre en 1000)	86.49 (35.00 plantas/acre en 1000)	
Humedad del grano (%)	AAD-1	19.09	13.33	25.90	0.5706
	Control	19.36	13.66	26.50	
Peso de la muestra (kg/m ³)	AAD-1	70.31 (54.62 lb/fanega)	54.19 (42.10 lb/fanega)	76.69 (58.80 lb/fanega)	0.1715
	Control	70.98 (55.14 lb/fanega)	67.96 (52.80 lb/fanega)	75.17 (58.40 lb/fanega)	
Rendimiento (kg/ha)	AAD-1	12944.49 (192.48 fanegas/acre)	9143.46 (135.96 fanegas/acre)	16401.86 (243.89 fanegas/acre)	0.2218
	Control	13473.75 (200.35 fanegas/acre)	8676.73 (129.02 fanegas/acre)	19205.56 (285.58 fanegas/acre)	

Experimento D

Parámetro (unidades)	Tratamiento	Promedio	Intervalo		Valor p
			Min	Max	
Encamado del tallo (%)	AAD-1	7.29	0.00	9.26	0.4364
	Control	4.17	0.00	39.06	
Población final (plantas/ha en 1000)	AAD-1	73.93 (29.93 plantas/acre en 1000)	66.72 (27.00 plantas/acre en 1000)	84.02 (34.00 plantas/acre en 1000)	0.0571
	Control	78.73 (31.86 plantas/acre en 1000)	71.66 (29.00 plantas/acre en 1000)	86.49 (35.00 plantas/acre en 1000)	
Humedad del grano (%)	AAD-1	18.74	19.40	24.40	0.4716
	Control	19.32	13.35	25.70	
Peso de la muestra (kg/m ³)	AAD-1	72.84 (56.59 lb/fanega)	70.54 (54.80 lb/fanega)	75.04 (58.30 lb/fanega)	0.0992
	Control	71.44 (55.50 lb/fanega)	67.83 (52.70 lb/fanega)	73.88 (57.40 lb/fanega)	
Rendimiento (kg/ha)	AAD-1	13688.96 (203.55 fanegas/acre)	13215.51 (196.51 fanegas/acre)	16151.69 (240.17 fanegas/acre)	0.7370
	Control	13.438.11 (199.82 fanegas/acre)	7973.29 (118.56 fanegas/acre)	17761.68 (264.11 fanegas/acre)	

Ejemplo 8 - Uso del sitio de inserción del evento de maíz DAS-40278-9 para una integración dirigida

- 5 El rendimiento agronómico consistente del transgén del evento de maíz DAS-40278-9 a lo largo de varias generaciones bajo las condiciones de campo sugiere que estas regiones identificadas alrededor del sitio de inserción del evento de maíz DAS-40278-9 proporcionan buenas localizaciones genómicas para la integración dirigida de otros genes transgénicos de interés. Tal integración dirigida supera los problemas con el llamado "efecto de posición" y el riesgo de crear una mutación en el genoma tras la integración del transgén en el hospedador. Otras ventajas de esta
- 10 integración dirigida incluyen, pero no se limitan a, reducir el gran número de eventos de transformación que deben ser examinados y sometidos a ensayo antes de obtener una planta transgénica que exhiba el nivel deseado de expresión del transgén sin exhibir también anomalías resultantes de la inserción involuntaria del transgén en un locus importante del genoma hospedador. Además, esta integración dirigida permite apilar transgenes que hacen más eficiente el mejoramiento genético de líneas de plantas elite con ambos genes.
- 15 Utilizando la enseñanza descrita, una persona experta es capaz de dirigir los ácidos polinucleicos de interés al mismo sitio de inserción en el cromosoma 2 que en el evento de maíz DAS-40278-9 o a un sitio muy cercano al sitio de inserción en el evento de maíz DAS-40278-9. Uno de tales métodos se describe en la solicitud de patente internacional nº WO2008/021207.
- 20 En resumen, se utilizan hasta 20 Kb de la secuencia genómica flanqueante 5' al sitio de inserción y hasta 20 Kb de la secuencia genómica flanqueante 3' al sitio de inserción (partes de las cuales se identifican con referencia a la SEQ NO:29) para flanquear el gen o los genes de interés que se pretenden insertar en una localización genómica del cromosoma 2 mediante recombinación homóloga. El gen o genes de interés pueden ser colocados exactamente como en el sitio de inserción del evento de maíz DAS-40278-9 o pueden ser colocados en cualquier lugar dentro de las regiones de 20 Kb alrededor de los sitios de inserción del evento de maíz DAS-40278-9 para conferir un nivel
- 25 consistente de expresión de transgenes sin efectos perjudiciales para la planta. Los vectores de ADN que contienen el gen o genes de interés y las secuencias flanqueantes pueden ser distribuidos a las células vegetales a través de uno de los diversos métodos conocidos por los expertos en la técnica, que incluyen pero no se limitan a la

transformación mediada por *Agrobacterium*. La inserción del vector de ADN donador en el sitio diana del evento de maíz DAS-40278-9 se puede mejorar aún más mediante uno de los diversos métodos, que incluye pero no se limita a la coexpresión o la regulación al alza de los genes que mejoran la recombinación o la regulación a la baja de los genes de supresión de la recombinación endógena. Además, se conoce en la técnica que la escisión de doble cadena de secuencias específicas en el genoma se puede utilizar para aumentar la frecuencia de recombinación homóloga, por lo tanto la inserción en el sitio de inserción del evento de maíz DAS-40278-9 y sus regiones flanqueantes se puede mejorar mediante la expresión de endonucleasas naturales o específicas de secuencia diseñadas para escindir estas secuencias. Por lo tanto, utilizando la enseñanza proporcionada en la presente memoria, cualquier ácido nucleico heterólogo se puede insertar en el cromosoma 2 del maíz en un sitio diana localizado entre un marcador molecular 5' discutido en el Ejemplo 4 y un marcador molecular 3' discutido en el Ejemplo 4, preferiblemente dentro de la SEQ ID NO:29, y/o regiones de la misma como se discutió en otra parte en la presente memoria.

Ejemplo 9 - Escisión del casete de expresión del gen *pat* del evento de maíz DAS-40278-9

La extracción de un casete de expresión del gen marcador seleccionable es ventajosa para la inserción dirigida en los loci genómicos del evento de maíz DAS-40278-9. La extracción del marcador seleccionable *pat* del evento de maíz DAS-40278-9 permite la reutilización del marcador seleccionable *pat* en la integración dirigida de ácidos polinucleicos en el cromosoma 4 en generaciones subsiguientes de maíz.

Utilizando la enseñanza descrita, una persona experta es capaz de escindir ácidos polinucleicos de interés del evento de maíz DAS-40278-9. Uno de tales métodos se describe en la solicitud de patente provisional de EE.UU. nº 61/297,628.

Brevemente, se diseñan endonucleasas de secuencias específicas, tales como las nucleasas de dedos de zinc, que reconocen, unen y escinden secuencias específicas de ADN que flanquean un casete de expresión génica. Las nucleasas de los dedos de zinc se introducen en la célula de la planta por cruzamiento de una planta parental que contiene casetes de expresión de nucleasas de dedos de zinc transgénico con una segunda planta parental que contiene el evento de maíz DAS-40278-9. La progenie resultante se cultiva hasta la madurez y se analiza para detectar la pérdida del casete de expresión de *pat* mediante la pintura de la hoja con un herbicida que contiene glufosinato. Las plantas de la progenie que no son resistentes al herbicida son confirmadas molecularmente y presentadas para la autofecundación. La escisión y eliminación del casete de expresión de *pat* se confirma molecularmente en la progenie obtenida de la autofecundación. Utilizando la enseñanza proporcionada en la presente memoria, cualquier ácido nucleico heterólogo se puede escindir del cromosoma 2 del maíz en un sitio diana localizado entre un marcador molecular de 5' y un marcador molecular de 3' como se discutió en el Ejemplo 4, preferiblemente dentro de la SEQ ID NO:29 o las regiones indicadas de la misma.

Ejemplo 10 - Resistencia a la rotura por fragilidad

Rotura por fragilidad se refiere a la rotura de los tallos de maíz por fuertes vientos después de la aplicación de herbicidas reguladores del crecimiento, generalmente durante períodos de crecimiento rápido. Los ensayos mecánicos de "empuje", que utilizan una barra para empujar físicamente el maíz para simular daños debidos a fuertes vientos, se realizaron en maíz híbrido que contenía el evento DAS-40278-9 y en plantas control que no contenían el evento DAS-40278-9. Los tratamientos se completaron en cuatro ubicaciones geográficas diferentes y se repitieron cuatro veces (hubo una excepción para un ensayo que sólo se repitió tres veces). Las parcelas consistían en ocho filas: cuatro filas de cada uno de los dos híbridos, con dos filas que contenían el evento DAS-40278-9 y dos filas sin el evento. Cada fila tenía 6.10 m (20 pies) de longitud. Las plantas de maíz se cultivaron hasta la etapa de desarrollo V4, y se aplicó un herbicida comercial que contenía 2,4-D (Weedar 64, Nufarm Inc., Burr Ridge, IL) en dosis de 1120 g ae/ha, 2240 g ae/ha y 4480 g ae/ha. Siete días después de la aplicación del herbicida, se realizó un ensayo de empuje mecánico. El ensayo de empuje mecánico para la rotura por fragilidad consistió en empujar una barra de 1.22 m (4 pies) por las dos filas de maíz para simular el daño causado por el viento. La altura de la barra y la velocidad de desplazamiento se ajustaron para proporcionar un bajo nivel de rotura del tallo (10% o menos) con plantas no tratadas para asegurar un ensayo lo suficientemente severo como para demostrar una diferencia entre los tratamientos. La direccionalidad del tratamiento de rotura por fragilidad se aplicó contra el maíz inclinado.

Dos de los lugares del ensayo experimentaron fuertes vientos y tormentas eléctricas entre 2 y 3 días después de la aplicación del herbicida 2,4-D. En dos días consecutivos, una tormenta comenzó en Huxley IA. Se reportaron velocidades de viento de 2 a 17 m s⁻¹ con velocidades altas de 33 m s⁻¹ en el sitio de la parcela de campo. La dirección del viento era variable. Un día, se reportó una tormenta eléctrica en Lanesboro MN. Se reportaron vientos de alta velocidad en el sitio de esta parcela de campo. Además, ambas tormentas produjeron lluvias. La combinación de lluvia y viento se atribuyó a los daños reportados por rotura por fragilidad.

Las evaluaciones del daño de rotura por fragilidad que resultaron del ensayo de empuje mecánico (y las inclemencias del tiempo) se realizaron clasificando visualmente el porcentaje de daños. Antes del tratamiento mecánico con barra de rotura por fragilidad, se hicieron recuentos de los rodales de las plantas para el maíz híbrido que contenía el evento DAS-40278-9 y los controles. Varios días después del tratamiento con barra de rotura por fragilidad, se volvieron a evaluar los recuentos de los rodales de las parcelas. Se determinó el porcentaje de inclinación y el porcentaje de rodal reducido dentro de la parcela (Tabla 26). Los datos de los ensayos demostraron que el maíz híbrido que contiene el

evento DAS-40278-9 tiene una menor propensión a la rotura por fragilidad en comparación con las plantas nulas después de una aplicación de 2,4-D.

5 Tabla 26: Tolerancia a la rotura por fragilidad del maíz DAS-40278-9 a V4 con la aplicación de amina 2,4-D. El porcentaje de rotura por fragilidad se calculó para las plantas de maíz híbridas que contienen el evento DAS-40278-9 y se comparó con plantas control que no contienen el evento.

Antes de la rotura mecánica				
% promedio de inclinación 7-8 días después de la aplicación¹				
Tratamiento	278 (SLB01-278//4XP811XTR)	Nulo (SLB01//4XP811XTR)	278 (SLB01VX-278//BE9515XT)	Nulo (SLB01VX//BE9515XT)
Weedar 64 1120 g ae/ha	0%	38%	0%	33%
Weedar 64 2240 g ae/ha	1%	42%	0%	33%
Weedar 64 4480 g ae/ha	2%	55%	1%	46%
No tratado	0%	0%	0%	0%
Después de la rotura mecánica				
% promedio³ de inclinación 11-14 días después de la aplicación				
Tratamiento	278 (SLB01-278//4XP811XTR)	Nulo (SLB01//4XP811XTR)	278 (SLB01VX-278//BE9515XT)	Nulo (SLB01VX//BE9515XT)
Weedar 64 1120 g ae/ha	0%	19%	1%	24%
Weedar 64 2240 g ae/ha	4%	20%	7%	27%
Weedar 64 4480 g ae/ha	4%	26%	6%	28%
No tratado	0%	0%	0%	0%
Después de la rotura mecánica				
% promedio³ de inclinación 11-14 días después de la aplicación				
Tratamiento	278 (SLB01-278//4XP811XTR)	Nulo (SLB01//4XP811XTR)	278 (SLB01VX-278//BE9515XT)	Nulo (SLB01VX//BE9515XT)
Weedar 64 1120 g ae/ha g	3%	38%	6%	42%
Weedar 64 2240 g ae/ha	9%	35%	12%	41%
Weedar 64 4480 g ae/ha	9%	40%	16%	40%
No tratado	0%	0%	0%	0%

¹ Tormenta eléctrica y fuertes vientos ocurrieron 2-3 días después de la aplicación en dos ensayos

² Tratamientos repetidos cuatro veces en un diseño de bloques completos al azar (un ensayo sólo se completó para tres repeticiones)

³ Promedios corregidos por incidencias en no tratados (medios no tratados forzados a cero)

5

Ejemplo 11 - Análisis de proteína del grano

El grano con contenido de proteína total aumentado se produjo a partir de maíz híbrido que contenía el evento DAS-40278-9 en comparación con las plantas control que no contenían el evento. Se llevaron a cabo dos ensayos de campo consecutivos en varios sitios que incluyeron tratamientos no rociados y con herbicidas con tres combinaciones diferentes de herbicidas. En 7 de las 8 comparaciones estadísticas, el evento DAS-40278-9 produjo granos con un contenido total de proteína significativamente mayor (Tabla 27). Estos datos son corroborados por análisis de aminoácidos individuales.

10

Tabla 27: Contenido en proteínas del grano proveniente de ensayos de campo en múltiples sitios

Temporada de campo 2008	Casi isolínea no transgénica	Evento DAS-40278-9 no rociado	Evento DAS-40278-9 con quizalofop	Evento DAS-40278-9 con 2,4-D	Evento DAS-40278-9 con quizalofop y 2,4-D
Media	9.97	10.9	11.1	10.5	10.9
% de incremento sobre la isolínea	0	9.3	11.3	5.3	9.3
Prueba t pareada	NA	0.002	0.0004	0.061	0.002
Temporada de campo 2008	Casi isolínea no transgénica	Evento DAS-40278-9 no rociado	Evento DAS-40278-9 con quizalofop	Evento DAS-40278-9 con 2,4-D	Evento DAS-40278-9 con quizalofop y 2,4-D
Media	10.9	11.6	11.7	11.7	11.5
% de incremento sobre la isolínea	0	6.4	7.3	7.2	5.5
Prueba t pareada	NA	0.0048	0.001	0.0012	0.0079

15 Ejemplo 12 - Ensayos agronómicos adicionales

Las características agronómicas del maíz híbrido que contiene el evento DAS-40278-9 en comparación con el maíz casi isolínea se recopilaron de múltiples ensayos de campo en diversos entornos geográficos para una temporada de crecimiento. Los datos fueron recogidos y analizados para las características agronómicas como se describe en el Ejemplo 7. Los resultados de las líneas híbridas de maíz que contienen el evento DAS-40278-9 en comparación con las plantas nulas se enumeran en la Tabla 28. Adicionalmente, en la Tabla 29 se describen las características agronómicas de las líneas de maíz híbrido que contienen el evento DAS-40278-9 y plantas nulas rociadas con los herbicidas quizalofop (280 g ae/ha) en la etapa V3 del desarrollo y 2,4-D (2,240 g ae/ha) en la etapa V6 del desarrollo.

20

Tabla 28: Rendimiento, porcentaje de humedad y resultados poblacionales finales para el maíz híbrido que contiene el evento DAS-40278-9 en comparación con el control casi aislado.

Nombre	Rendimiento	Humedad del grano (%)	Población final (plantas/acre reportadas en 1000's)
Maíz híbrido que contiene DAS-40278-9	218.1	21.59	31.69
Control de maíz híbrido	217.4	21.91	30.42

- 5 Tabla 29: rendimiento, porcentaje de humedad, porcentaje de alojamiento del ganado, porcentaje de alojamiento de la raíz y población total de líneas de maíz híbridas que contienen el evento DAS-40278-9 en comparación con el control de la casi isolina.

Ensayo	Rendimiento	Humedad del grano (%)	Encamado del tallo (%)	Encamado de la raíz (%)	Población final (plantas/acre reportadas en 1000's)
Ensayo rociado					
Maíz híbrido #1 que contiene DAS-40278-9	214.9	23.4	0.61	2.19	30
Maíz híbrido control #1	177.9	23.46	0.97	36.32	28.36
LSD (0.5)	13.3	1.107	0.89	10.7	1.1
No rociado					
Maíz híbrido #1 que contiene DAS-40278-9	219.6	22.3	0.95	1.78	30.8
Maíz híbrido control #1	220.3	22.51	0.54	1.52	30.55
LSD (0.5)	6.9	0.358	0.98	1.65	0.7
Ensayo rociado					
Maíz híbrido #2 que contiene DAS-40278-9	198.6	26.76	0.38	2.08	29.29
Maíz híbrido control #2	172.3	23.76	1.5	39.16	28.86
LSD (0.5)	13.3	1.107	0.89	10.7	1.1
No rociado					
Maíz híbrido #2 que contiene DAS-40278-9	207.8	24.34	0.22	0.59	31
Maíz híbrido control #2	206.2	24.88	0.35	0.12	30.94
LSD (0.5)	8.0	0.645	0.55	1.79	0.9

Listado de secuencias

	<110> Dow AgroSciences, LLC	
5	<120> AAD-1 Evento DAS-40278-9, líneas de maíz transgénicas relacionadas y su identificación específica de evento	
	<130> DAS-P0167-01	
	<160> 33	
	<170> Versión de patente 3.5	
10	<210> 1	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
15	<400> 1	
	gtcactgcag gtcgactcta gaggat	26
	<210> 2	
	<211> 23	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 2	
	gcgggtggcca ctatttcag aag	23
25	<210> 3	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
30	<223> Cebador	
	<400> 3	
	ttgttacggc atatatcaa tagcgg	26
	<210> 4	
	<211> 26	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 4	
40	ccgtggccta tttcagaag aagtc	26
	<210> 5	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 5	
	acaaccatat tggctttggc tga	23
	<210> 6	
50	<211> 28	

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 5 <223> Cebador
 <400> 6
 cctgttgca aaatactcaa ttgtcctt 28
 <210> 7
 <211> 23
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 7
 15 ctccattcag gagacctgc ttg 23
 <210> 8
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> Cebador
 <400> 8
 gtacaggctg catccgtga cga 23
 <210> 9
 25 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 30 <400> 9
 cccccctct ctacctctc tagat 25
 <210> 10
 <211> 23
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 10
 gtcatgccct caattctctg aca 23
 40 <210> 11
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Cebador
 <400> 11
 gtcgcttcag caacacctca gtc 23
 <210> 12
 <211> 23
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador

 <400> 12
 5 agctcagatc aaagacacac ccc 23

 <210> 13
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 10 <220>
 <223> Cebador

 <400> 13
 tcgtttgact aattttcgt tgatgtac 28

 <210> 14
 15 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 20 <400> 14
 tctcacttgc gtgtcatcgg tcg 23

 <210> 15
 <211> 17
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 15
 ccagcacgaa ccattga 17

 30 <210> 16
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 35 <223> Cebador

 <400> 16
 cgtgtatata aggtccagag ggta 24

 <210> 17
 <211> 17
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 17
 45 ttgggagaga gggctga 17

 <210> 18
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 50 <220>
 <223> Cebador

<400> 18
 tggttaagtgt ggaaggcac 20
 <210> 19
 5 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 10 <400> 19
 gaggtacaac cggagcggtt 20
 <210> 20
 <211> 19
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 20
 ccgacgcttt tctggagta 19
 20 <210> 21
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> Cebador
 <400> 21
 tgtgccacat aatcacgtaa ca 22
 <210> 22
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 22
 35 gagacgtatg cgaaaattcg 20
 <210> 23
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> Cebador
 <400> 23
 ttgcttcagt tcctctatga gc 22
 <210> 24
 45 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 50 <400> 24
 tccgtgtcca ctctttgt 19

<210> 25
 <211> 22
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 25
 gcaaaggaaa actgccattc tt 22
 10 <210> 26
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 15 <223> Cebador

 <400> 26
 tctctaagcg gcccaaactt 20

 <210> 27
 <211> 23
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 27
 25 attctggctt tgctgtaaatt cgt 23

 <210> 28
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> Cebador

 <400> 28
 ttacaatcaa cagcaccgta cctt 24

 <210> 29
 35 <211> 8557
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Insertar y flanquear secuencias para el evento DAS-40278-9
 40 <400> 29

ES 2 719 599 T3

actggtat	ttt	aataact	ttt	aataaat	tatt	attagatt	cc	tcgtcaa	aaga	acttttt	taca	60
atatatc	tat	ttagaat	cat	atatgtc	ata	gttttttt	ttc	taagagt	tcta	gtttact	tagt	120
aaaatcc	gac	tcacatt	tttt	cgaactt	ggg	atgcaac	act	taaatag	tac	aaaacct	tgg	180
tatgcag	tat	tttacatt	gt	aagattc	aaa	atttcta	aag	cagtata	tata	atgtttc	cag	240
aaacttat	ag	atatagaaa		aacagag	aga	cgtatgc	gaa	aattcgata	aa	aggtgtac	at	300
tggattc	gca	aggctaa	ata	catattt	atc	gtggatc	cat	gcagagt	ttg	ggtaata	aaaa	360
ttagata	actt	ccaatcat	gt	gccacata	at	cacgtaac	at	tagtaatt	ta	aatgacat	ta	420
ccatgtc	caa	ctgattt	aaa	acacaaact	c	ttcttga	acc	atatagt	ttg	acaaacca	aaa	480
tatatata	aac	tggagct	act	agttatg	aat	caattaaaa		ttacttt	gaa	gattcaac	gt	540
agtgccag	tt	tggctct	agc	acatcta	acc	agaaggg	cta	aggctgg	cct	caacagga	ac	600
agccaaat	cc	gagatcg	agc	catttgcc	at	ttttggg	tag	ttagttta	aac	ttcatata	t	660
cttcccat	cc	ttttttg	cct	agcctaa	atg	gctttgat	gt	tgaagacc	at	attaatt	tgc	720
ttcagtgg	ca	ctaggaca	ac	catattgg	cct	ttggctg	acc	cgttagag	tt	agccta	atgg	780
gtggaagg	ggg	agggaagg	ggg	aggatcg	atg	gtggcat	gag	agagggg	ttg	acgatcac	ga	840
tgatgat	gcg	agtgagg	agg	agaggg	tggc	gacgacac	ag	gggagaa	agg	agaggg	acgc	900
taggagc	gtc	aagggcg	tgg	gggagggg	gag	ggtcggag	ggg	atgaagg	atg	acctaa	atat	960

ES 2 719 599 T3

tattgttgag tgatagaggg ttattcaact atccgacccg tcgattttga tggatatgta	1020
aatttgtgtg tcatttgttt gatggattta gttaaaggta tgggtctaga ggtgattttt	1080
gttgggtggg ttttacagag tttaaactag cggattatat agtggtatag aagatatagt	1140
tttattagaa catctccaaa atgtgactcg aaataatacc cccaaaattt aaaatactac	1200
atcattttga taaaaaagggt aaagtagagc actggttgaa cagtttttaa aagttgtgcc	1260
ctatatttta aaatagggta ctgattttaa atattgttgt gggggataga tatccccggg	1320
tocactagaa ggcgagaagg cctcgcgtgt ggccacgggc cagttacccc gcaaggccat	1380
cccttcgtgg gtcgagctag aattactggt agaatgggct gaccgaagaa ggcaacagac	1440
tcgagcccaa acaatccatc ggctcgtgcg ctatccacag aaactacccg actttccggc	1500
gcatggcatc ctagaatata ggggcgtatt agggatgagt cagcgagatt ttcggaagat	1560
tagttcagtt tgttcgctat tatttaggag acatatgatc ctcatgtacg tatggagtgc	1620
cccacggctg tgtatataag gtccagaggg taccocatca tttctatcga ccatctacct	1680
atctcatcag cttttctcca ttcaggagac ctgcgttgta acccaccaca tatagatcca	1740
tcccaagaag tagtgtatta cgcctctcta agcggcccaa acttgcagaa aaccgcctat	1800
ccctctctcg tgcgtccagc acgaaccatt gagttacaat caacagcacc gtacctgaa	1860
gcggaataca atgaaggta gctacgattt acagcaaagc cagaatacaa tgaaccataa	1920
agtgattgaa gctcgaaata tacgaaggaa caaatatttt taaaaaata cgcaatgact	1980
tggaaacaaa gaaagtgata tattttttgt tcttaaacia gcatcccctc taaagaatgg	2040
cagttttcct ttgcatgtaa ctattatgct cccttcgtta caaaaatttt ggactactat	2100
tgggaacttc ttctgaaaat agtggccacc gcttaattaa ggcgcgccat gcccgggcaa	2160
ggggcgcgtt aattaaattt aaatgtttta actaggaaat ccaagcttgc atgcctgcag	2220
atccccgggg atcctctaga gtcgacctgc agtgcagcgt gaccgggtcg tgccccctctc	2280
tagagataat gagcattgca tgtctaagtt ataaaaaatt accacatatt ttttttgtca	2340
caattgtttg aagtgcagtt tatctatctt tatacatata tttaaacttt actctacgaa	2400
taatataatc tatagtacta caataatata agtgtttttag agaatcatat aaatgaacag	2460
ttagacatgg tctaaaggac aattgagtat ttgacaaca ggactctaca gttttatctt	2520
tttagtgtgc atgtgttctc cttttttttt gcaaatagct tcacctatat aatacttcat	2580
ccattttatt agtacatcca tttagggttt aggggttaatg gtttttatag actaattttt	2640
ttagtacatc tattttattc tatttttagcc tctaaattaa gaaaactaaa actctatttt	2700
agttttttta tttaatagtt tagatataaa atagaataaa ataaagtgc taaaaattaa	2760
acaaataccc tttaagaaat taaaaaaact aaggaaacat ttttcttgtt tcgagtagat	2820
aatgccagcc tgttaaacgc cgtcgacgag tctaacggac accaaccagc gaaccagcag	2880
cgtcgcgtcg ggccaagcga agcagacggc acggcatctc tgtcgctgcc tctggacccc	2940

tctcgagagt tccgctccac cgttggactt gctccgctgt cggcatccag aaattgcgtg	3000
gcggagcggc agacgtgagc cggcacggca ggcggcctcc tccctcctctc acggcaccgg	3060
cagctacggg ggattccttt cccaccgctc cttogetttc ccttcctcgc ccgccgtaat	3120
aaatagacac cccctccaca cctcttttcc ccaacctcgt gttgttcgga gcgcacacac	3180
acacaaccag atctccccc aatccaccgc tgggcacctc cgcttcaagg tacgccgctc	3240
gtcctccccc ccccccccc tctctacctt ctctagatcg gcgttcgggt ccatgcatgg	3300
ttagggcccg gtagttctac ttctgttcat gtttgtgtta gatccgtgtt tgtgttagat	3360
ccgtgctgct agcgttcgta cacggatgcg acctgtacgt cagacacgtt ctgattgcta	3420
acttgccagt gtttctcttt ggggaatcct gggatggctc tagccgttcc gcagacggga	3480
tcgatttcat gatttttttt gtttcgttgc atagggtttg gtttgccctt ttcctttatt	3540
tcaatatatg ccgtgcactt gtttgcggg tcatcttttc atgctttttt ttgtcttgggt	3600
tgtgatgatg tggctcgggt ggcggctcgt tctagatcgg agtagaattc tgtttcaaac	3660
tacctggtgg atttattaat tttggatctg tatgtgtgtg ccatacatat tcatagttag	3720
gaattgaaga tgatggatgg aaatatcgat ctaggatagg tatacatgtt gatgcgggtt	3780
ttactgatgc atatacagag atgctttttg ttcgcttgggt tgtgatgatg tgggtgtgggt	3840
ggggggctcgt tcattcgttc tagatcggag tagaatactg tttcaaacta cctggtgtat	3900
ttattaattt tggaactgta tgtgtgtgtc atacatcttc atagttacga gtttaagatg	3960
gatggaaata tcgatctagg ataggtatac atggtgatgt gggttttact gatgcatata	4020
catgatggca tatgcagcat ctattcatat gctctaacct tgagtaccta tctattataa	4080
taaacaagta tgttttataa ttatttcgat cttgatatac ttggatgatg gcatatgcag	4140
cagctatatg tggatttttt tagccctgcc ttcatacgtt atttatttgc ttggtactgt	4200
ttcttttgtc gatgctcacc ctgttgtttg gtgttacttc tgcagggtag ccccggggtc	4260
gacctgggt catgctgccc tcagccctct ccccaacgc tttgagagaa tagctgtcca	4320
gccactcact ggtgtccttg gtgctgagat cactggagtg gacttgaggg aaccacttga	4380
tgacagcacc tggaatgaga tattggatgc ctccacact taccaagtca tctactttcc	4440
tggccaagca atcaccaatg agcagcacat tgcattctca agaaggtttg gaccagttga	4500
tccagtgcct cttctcaaga gcattgaagg ctatccagag gttcagatga tccgcagaga	4560
agccaatgag tctggaaggg tgattggtga tgactggcac acagactcca ctttccttga	4620
tgcacctcca gctgctgttg tgatgagggc catagatgtt cctgagcatg gcggagacac	4680
tgggttccct tcaatgtaca cagcttggga gacctgtct ccaaccatgc aagccaccat	4740
cgaagggctc aacgttgtgc actctgccac acgtgtgttc ggttccctct accaagcaca	4800
gaaccgtcgc ttcagcaaca cctcagtcaa ggtgatggat gttgatgctg gtgacagaga	4860

gacagtccat cccttggttg tgactcatcc tggctctgga aggaaagcc tttatgtgaa	4920
tcaagtctac tgtcagagaa ttgagggcat gacagatgca gaatcaaagc cattgcttca	4980
gttcctctat gagcatgcc aacagatttga cttcacttgc cgtgtgaggt ggaagaaaga	5040
ccaagtcctt gtctgggaca acttgtgcac catgcaccgt gctgttcctg actatgctgg	5100
caagttcaga tacttgactc gcaccacagt tgggtggagt aggccctgcc gctgagtagt	5160
tagcttaatc acctagagct cgtttaaact gagggcactg aagtcgcttg acgtgctgaa	5220
ttgtttgtga tgttgggtggc gtattttgtt taaataagta agcatggctg tgattttatc	5280
atatgatcga tctttgggggt tttatttaac acattgtaaa atgtgtatct attaataact	5340
caatgtataa gatgtgttca ttcttcgggt gccatagatc tgcttatttg acctgtgatg	5400
ttttgactcc aaaaaccaa atcacaaactc aataaaactca tggaatatgt ccacctgttt	5460
cttgaagagt tcatctacca ttccagttgg catttatcag tgttgacgag gcgctgtgct	5520
ttgtaacata acaattgtta cggcatatat ccaatagcgg ccggcctcct gcagggttta	5580
aacttgccgt ggcctatttt cagaagaagt tccaatagt agtccaaaat ttttgtaacg	5640
aagggagcat aatagttaca tgcaaaggaa aactgccatt ctttagaggg gatgcttgtt	5700
taagaacaaa aaatatatca ctttcttttg ttccaagtca ttgcgtattt ttttaaaaat	5760
atttgttcct tcgtatattt cgagcttcaa tcactttatg gttctttgta ttctggcttt	5820
gctgtaaadc gtagctaacc ttcttcctag cagaaattat taatacttgg gatatttttt	5880
tagaatcaag taaattacat attaccacca catcgagctg cttttaaaatt catattacag	5940
ccatatagga ttgattcatt ttgcaaaatt tccaggatat tgacaacgtt aacttaataa	6000
tatcttgaag tattaaagct attatgatta ggggtgcaaa tggaccgagt tggttcgggt	6060
tatatcaaaa tcaaaccaaa ccaactatat cggtttggtg tggttcgggt ttgccgggtt	6120
ttcagcattt tctgggtttt tttttgtag atgaatatta ttttaattctt actttgtcaa	6180
atttttgata agtaaatata tgtgttagta aaaattaatt ttttttaca acatatgatc	6240
tattaaaata ttcttatagg agaattttct taataacaca tgatatttat ttattttagt	6300
cgtttgacta atttttcgtt gatgtacact ttcaaagtta accaaattta gtaattaagt	6360
ataaaaatca atatgatacc taaataatga tatgttctat ttaattttta attatcgaaa	6420
tttcacttca aattcgaaaa agatatataa gaattttgat agattttgac atatgaatat	6480
ggaagaacaa agagattgac gcattttagt aacacttgat aagaaagtga tcgtacaacc	6540
aattatttaa agttaataaa aatggagcac ttcatattta acgaaatatt acatgccaga	6600
agagtcgcaa atattttctag atatttttta aagaaaattc tataaaaagt cttaaaggca	6660
tatatataaa aactatatat ttatattttt tacccaaaag caccgcaagg ggtagccctg	6720
ggtgtgcgga cggactctaa acaccgacag ctggcgcgcc aggtaggggg tgtgtctttg	6780
atctgagcta gctcaatgac cattacctcc aaatgcaaga tcgcccttcg ccccgggact	6840

atgtttttgct ttggaaccat ctcatccata gcagatgaag agggaaactct gcaccgcata	6900
gcagatctat tggagaagaa gcttttctca gaaatctcga ggggagccag ggcagaacag	6960
cgggtggcac catcacccgc acctcaagcg aagatgacct cttacaaacc gaaagtcggg	7020
agctcaccta cccgaaaaac tccgctgtcc acttcgcca caaaggagtg gacacggatt	7080
actcgaaaga aggaagcgag tgtcccgagt caggggacgg gaacacgcca agccatcttt	7140
ccgacgcctt cgcctcaaa tgaggatgga aagaagagcg ccatcgcgct ggctcctttc	7200
taccccgacg tcctcttcat cagggggaga ttggagttag caccgtctt caacgatgag	7260
ccaaccatgc aaggggaaga gcctccccag cgtgaggcgc gacgacggag gaatagaagc	7320
cagaacgtgc ggcgacatca cgaggctggg gaacgggatc cggcgcaacc cgtatcccg	7380
gacgaagctt tagaagtagg aaaaactccc gacgagtggtg tacaccgaga aaggcggaac	7440
tctcgccgcc gtgatcgccg acaagcttag gaccgagaac gagagcaagc cgagcaaggt	7500
gcaaggctgc gccgagagaa tgctctcttt gctcggaacc tgtaccccg cttcgctcgt	7560
gcaatgaaca cgccgagtga agtcggaggg gtactggccc agatagctga cggcctcccg	7620
cgaaccctag acacggaagg ctaccggcgg ctgcttactc gagcagttaa tcaccttota	7680
cccatacta atcctccaag cgacctacgc catgccatca acagccggcg agacacgcgg	7740
agctccatca acgcttcgcg cgaccgatga cacgaaagtg agataggga ccgagaggag	7800
tatgtccgag atcatgccat cctggcatga agtcatgcc cccgagctga gtcggttgcg	7860
gcctcgacca gtgtcccggt ccagggacga tcaagatgac acacaactgg ctccccctct	7920
tgggaccgac ctacacgaac cgcacatgaa gacacgtgcg gagtcttcgc acttactccg	7980
tgtctccggg ccatccagtg gcccctaact tcaaggtctc caacgtcagc aagtatgagc	8040
gcaagcagga cctgggtggc tggttagcca tctacacgat tgtcacatgg gccgcccggag	8100
cgacggagga cgtgatgaca gtgtattttc ccattgtcct agggcaagac gcaatgcagt	8160
ggctccgaca tctaccccaa cattgcatag acaattggag cgacttcagt tgggtgcttca	8220
tcgccaaactt ccagtccctc tttgacaagc cggcgagcc atgggacctt aaatccattg	8280
ggcatcaggg cgatgaaacg ctccggttgt acctcaagag gtttttagacc atgaggaacc	8340
acacccccga agtcgcccag ggggggtgga ttgaagactt ctaccgagga tccaatgact	8400
cggctttcgt ccgagccata ctccagaaaa gcgtcggcca cctccgaaca cttgttccgg	8460
gaggcagacc tctacatcac cacggattaa cgggcccagg acctcatcgg aggcacgaaa	8520
gccgcccac acgcgccacg gtgtgacacg aaccagc	8557

<210> 30
 <211> 23
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador para el Marcador de Flanqueo

5 <400> 30
gcctagtcgc ctaccctacc aat 23

 <210> 31
 <211> 24
 <212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

 <220>

 <223> Cebador para el Marcador de Flanqueo

 <400> 31
tgtgttcttg attgggtgag acat 24

15 <210> 32
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>

 <223> Cebador para el Marcador de Flanqueo

 <400> 32
tactggggat tagagcagaa g 21

25 <210> 33
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>

 <223> Cebador para el Marcador de Flanqueo

30 <400> 33
aatctatgtg tgaacagcag c 21

REIVINDICACIONES

1. Una planta de maíz transgénico que comprende un genoma, comprendiendo dicho genoma la SEQ ID NO:29.
- 5 2. Una semilla de maíz que comprende un genoma que comprende la SEQ ID NO:29.
3. Una planta de maíz producida cultivando la semilla de la reivindicación 2, comprendiendo dicha planta la SEQ ID NO:29.
- 10 4. Una planta de progenie de la planta de maíz de la reivindicación 3, comprendiendo dicha planta de progenie la SEQ ID NO:29.
5. Una planta de progenie tolerante a herbicidas de la planta de maíz de la reivindicación 1, comprendiendo dicha planta de progenie la SEQ ID NO:29.
- 15 6. Una parte de la planta de la reivindicación 3 en donde dicha parte se selecciona del grupo que consiste en polen, óvulo, flores, brotes, raíces y hojas, comprendiendo dicha parte la SEQ ID NO:29.
7. Uso de un polinucleótido aislado para detectar el evento de maíz DAS-40278-9 que incorpora AAD-1 en una muestra que comprende ADN de maíz, en donde dicho polinucleótido:
 - a. comprende al menos 15 nucleótidos y mantiene la hibridación en condiciones de lavado rigurosas en 0,2X SSC a una temperatura de 50°C con una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en los restos 1-1873 de la SEQ ID NO:29, restos 6690-8557 de la SEQ ID NO:29 y sus complementos;
 - 25 b. comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO:1-28 y 31-33; o
 - c. se hibrida en condiciones de lavado rigurosas en 0.2X SSC a una temperatura de 50°C con una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en los restos 1863 a 1875 de la SEQ ID NO:29, restos 6679 a 6700 de la SEQ ID NO:29, y sus complementos,
 - 30 en donde dicho polinucleótido tiene hasta 110 nucleótidos de longitud y en donde dicho polinucleótido es una sonda que está unida a un marcador detectable o una molécula informadora o en donde dicho polinucleótido es un cebador.
8. Un método para detectar el evento de maíz DAS-40278-9 que incorpora AAD-1 en una muestra que comprende ADN de maíz en donde dicho método comprende poner en contacto dicha muestra con
 - 35 a. un primer cebador que se une a una secuencia flanqueante seleccionada del grupo que consiste en los restos 1-1873 de la SEQ ID NO:29, los restos 6690-8557 de la SEQ ID NO:29 y sus complementos; y
 - b. un segundo cebador que se une a una secuencia de inserto que comprende los restos 1874-6689 de la SEQ ID NO:29 o su complemento;
 - 40 someter dicha muestra a reacción en cadena de la polimerasa; y someter a ensayo un amplicón generado entre dichos cebadores.
9. Un método de detección del evento de maíz DAS-40278-9 que incorpora AAD-1 en una muestra que comprende ADN de maíz en donde dicho método comprende poner en contacto dicha muestra con al menos un polinucleótido que sea adecuado para identificar y distinguir exclusivamente una secuencia de polinucleótidos según la SEQ ID NO: 29, en donde dicho polinucleótido comprende al menos 30 nucleótidos y se hibrida en condiciones rigurosas en 6X cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a una temperatura de 45°C, seguido de un lavado en 0.2 X SSC a una temperatura de 50°C, con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en los restos 1863 a 1875 de la SEQ ID NO:29, restos de 6679 a 6700 de la SEQ ID NO:29, y sus complementos; en donde dicho método comprende además someter dicha muestra y dicho polinucleótido a dichas condiciones de hibridación rigurosas; y someter a ensayo dicha muestra para la hibridación de dicho polinucleótido con dicho ADN.
- 50 10. Un kit de detección de ADN:
 - a. que comprende un primer cebador y un segundo cebador según la reivindicación 8;
 - b. para realizar el método de la reivindicación 9; o
 - c. que comprende un polinucleótido como se define en la reivindicación 7, alterativo c),
 - 55 que comprende reactivos y materiales necesarios para llevar a cabo la detección.

11. Un polinucleótido que comprende la SEQ ID NO:29.
12. Un método para producir el polinucleótido de la reivindicación 11.

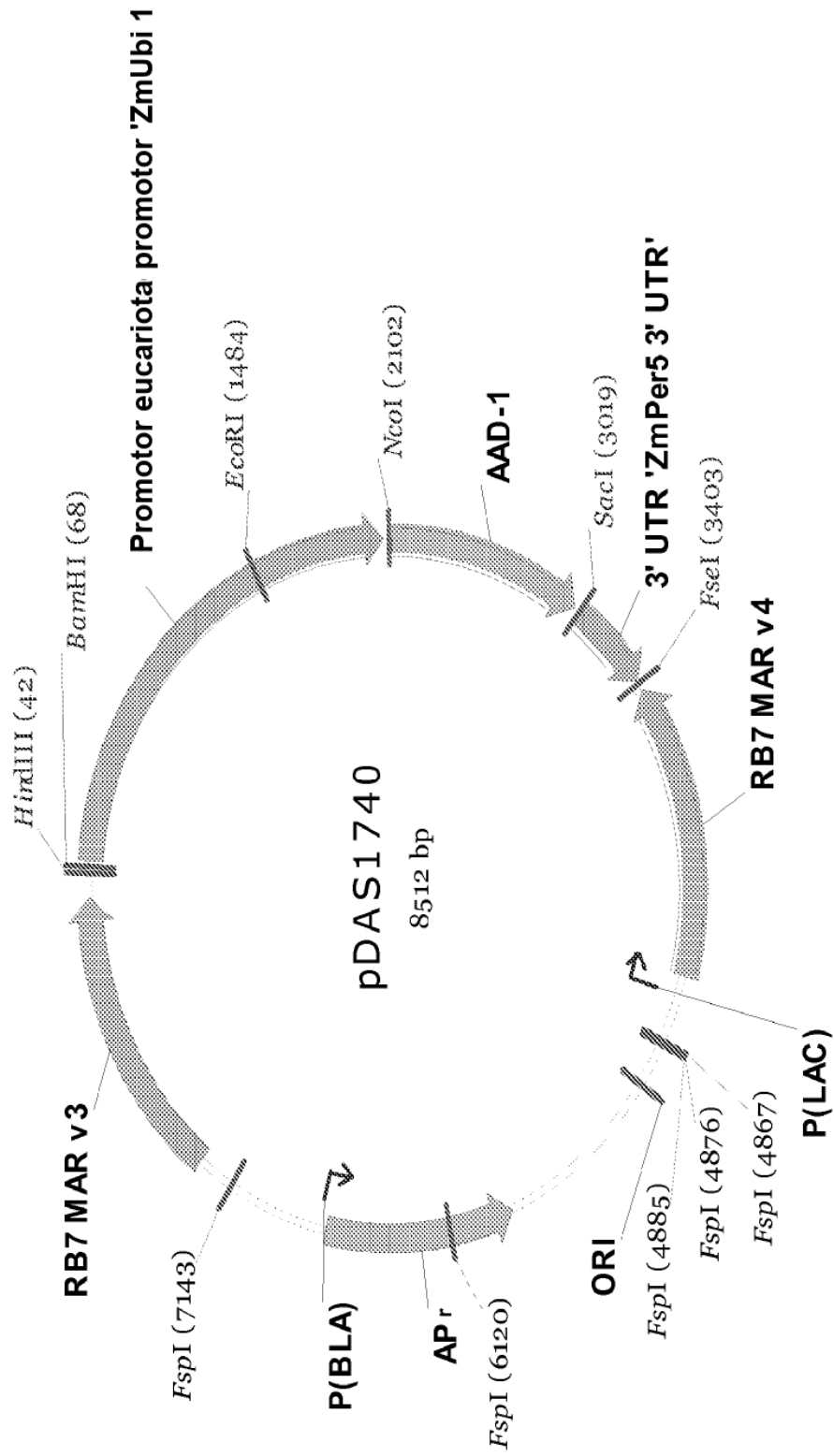


Figura 1. Mapa plasmídico de pDAS1740 (pDAB3812) con sitios de enzimas de restricción

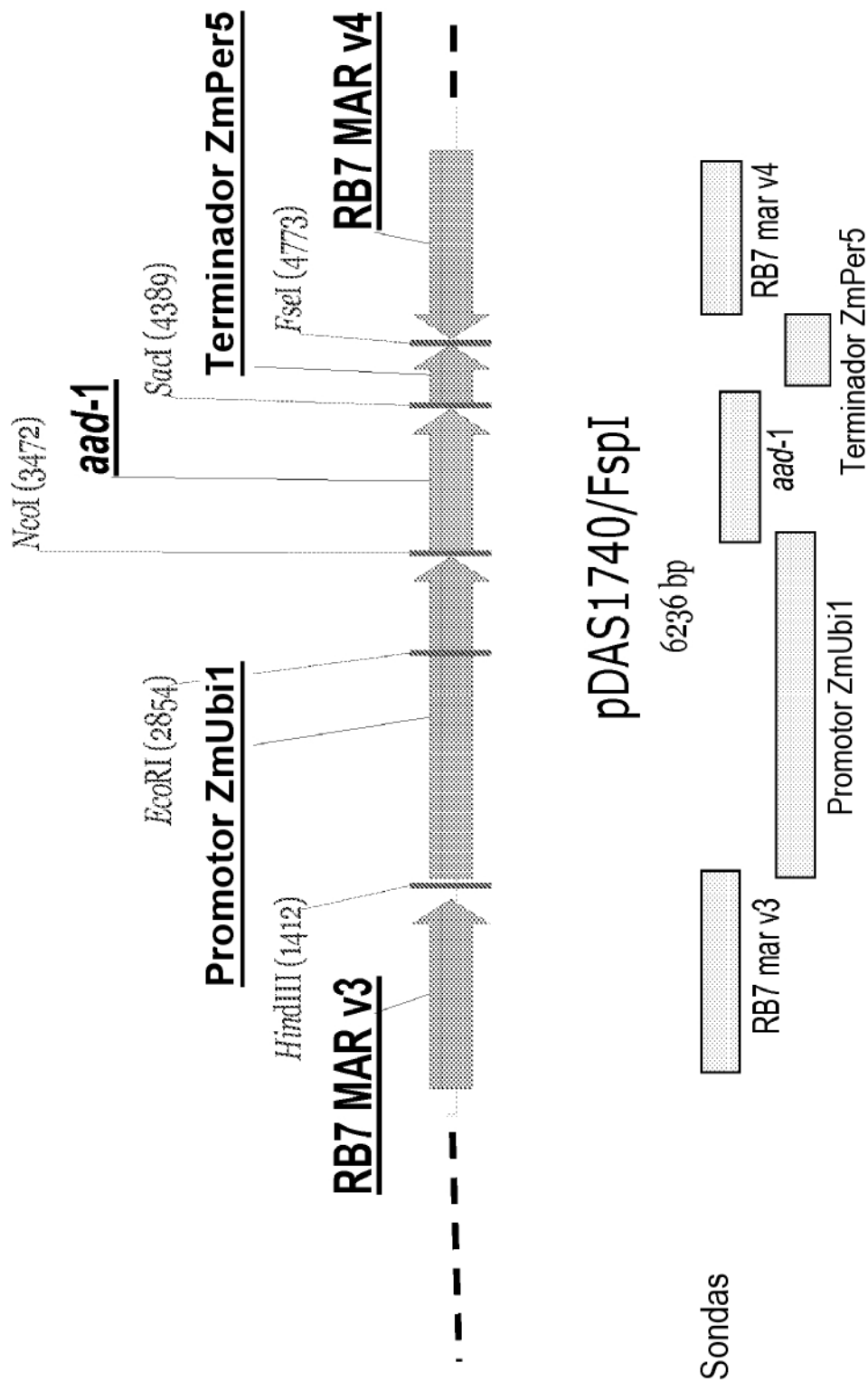


Figura 2. Mapa de restricción del sitio de inserción único presente en el genoma del maíz DAS-40278-9 (pDAS1740-278).

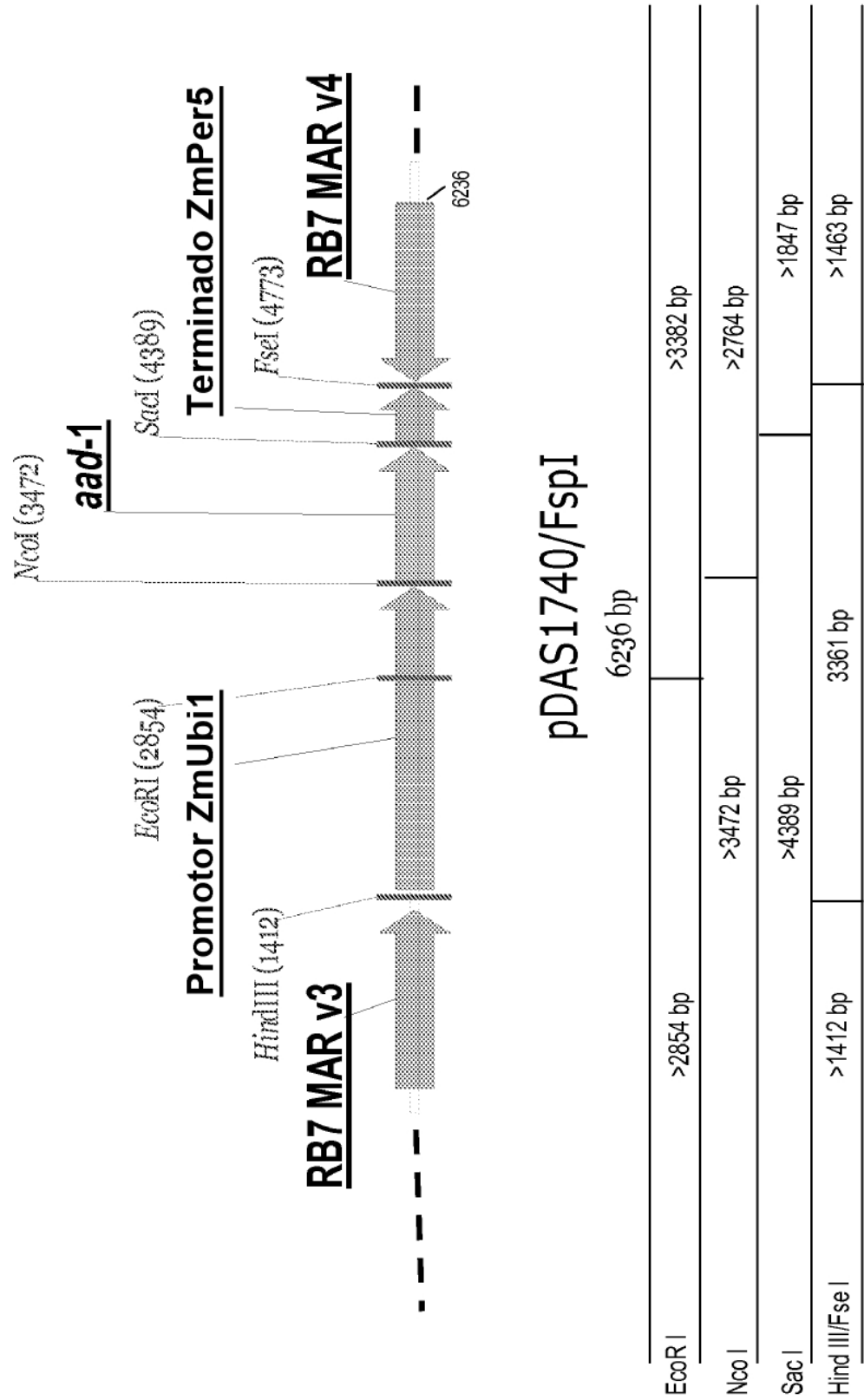


Figura 3. Mapa de restricción del sitio de inserción único presente en el genoma del maíz DAS-40278-9.

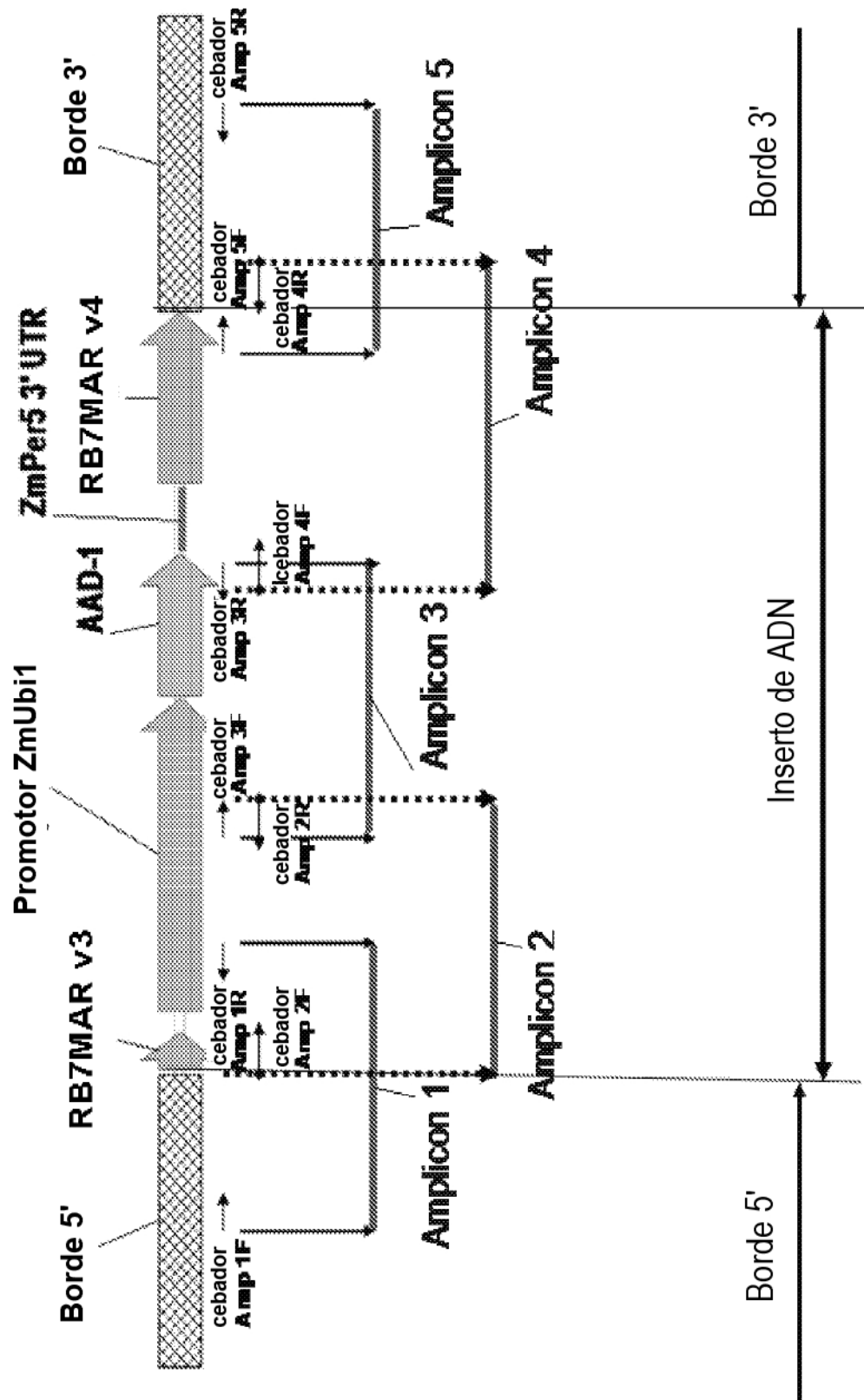


Figura 4. Estrategia de clonación para el inserto de ADN en el evento de maíz DAS-40278-9

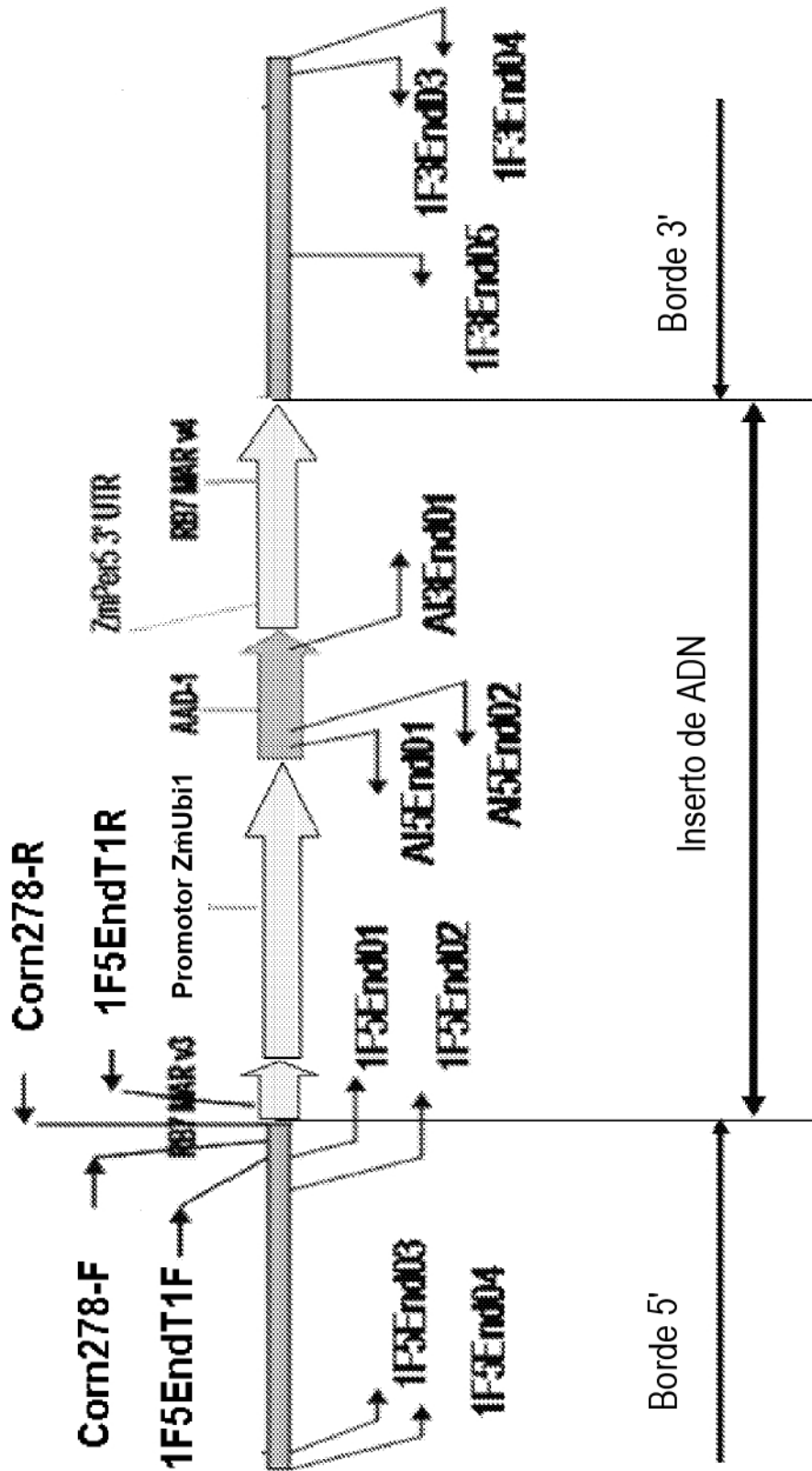


Figura 5. Diagrama de los cebadores utilizados en la amplificación por PCR para la confirmación de regiones de borde flanqueantes del evento de maíz DAS-40278-9. El diagrama esquemático muestra las localizaciones de los cebadores para confirmar la secuenciación de longitud completa del evento de maíz DAS-40278-9 que incorpora AAD-1 desde los bordes 5' a 3'

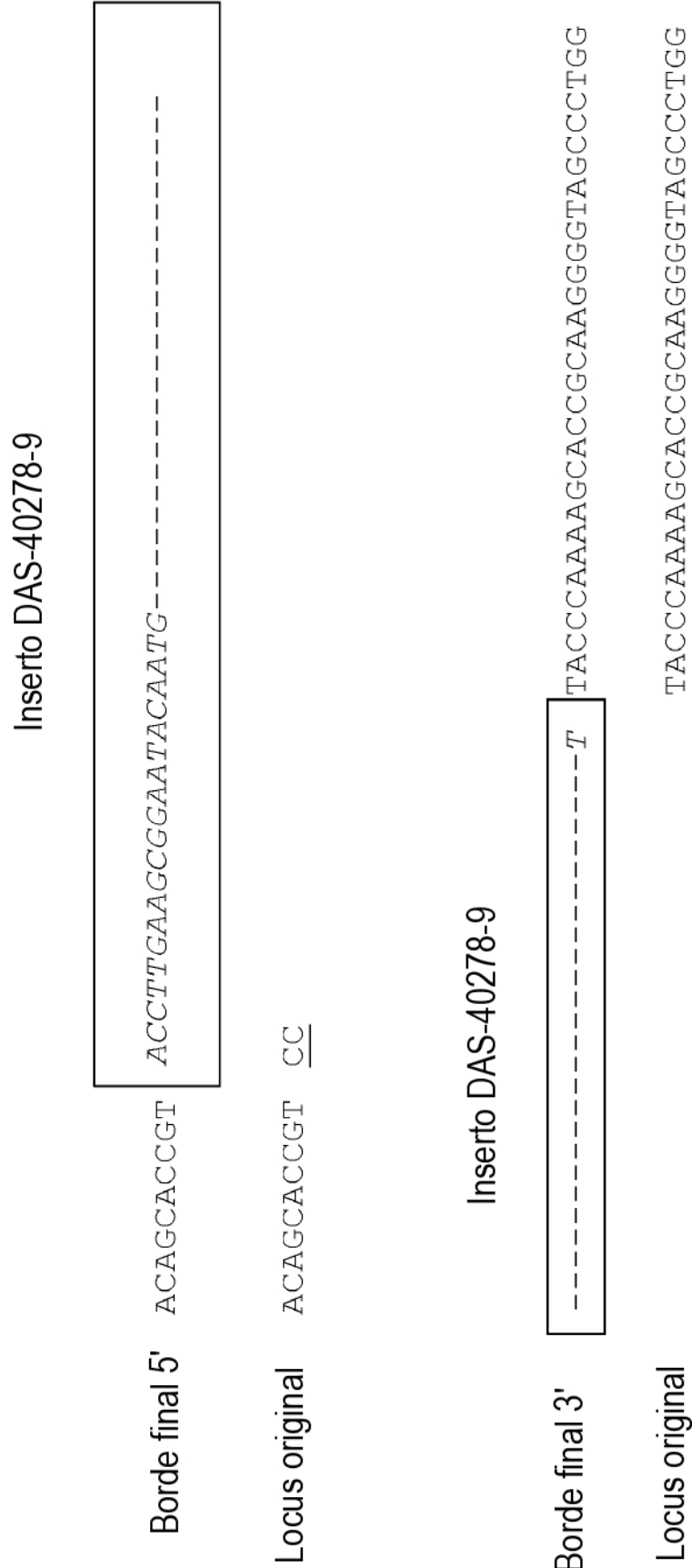
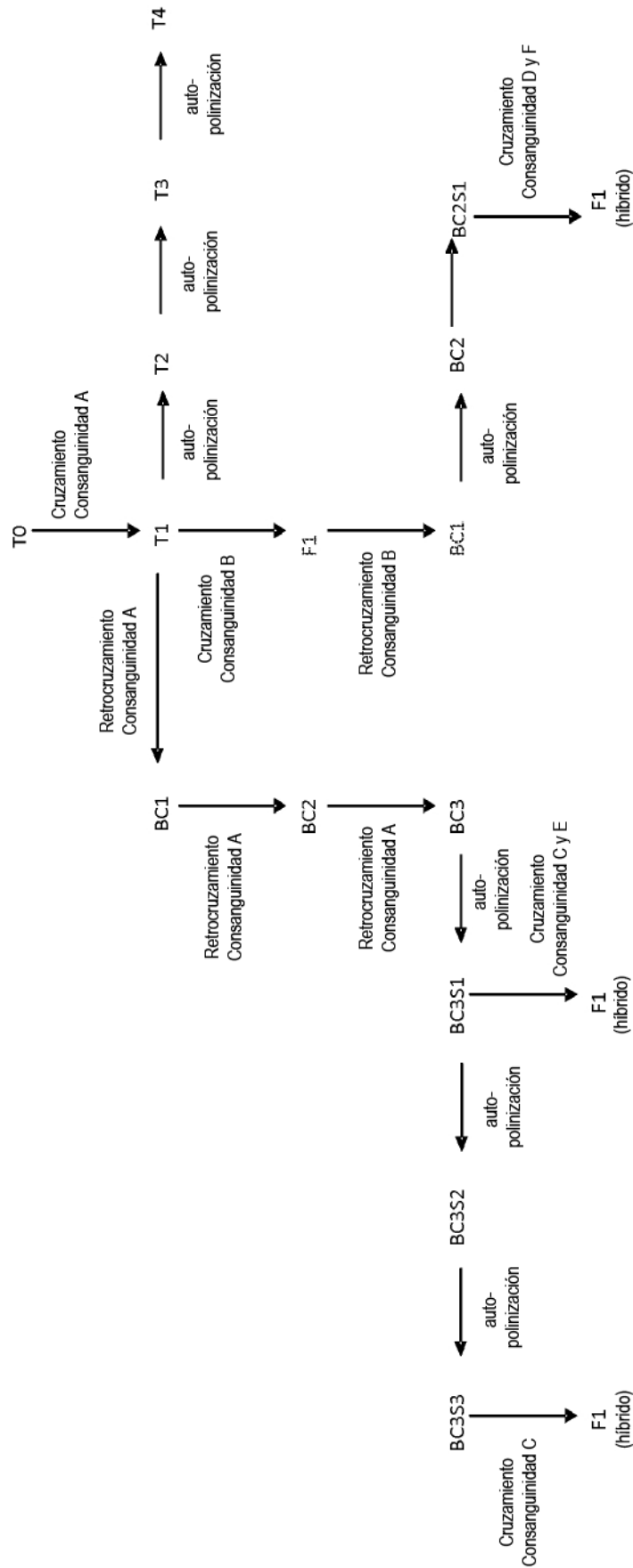


Figura 6. Inserción de la secuencia de ADN en las regiones de unión del evento de maíz DAS-40278-9. Una inserción de 21 pb (cursiva) en la unión de integración 5' provocó una delección de 2 pb (subrayada) del locus del genoma original. También se encontró una inserción de 1 pb (cursiva) en la unión de integración 3'.



Consanguinidad A = consanguinidad elite DAS XHH13 Consanguinidad B = consanguinidad elite DAS SLB01 Consanguinidad C, D, E, F = consanguinidades elite DAS utilizadas para hacer híbridos	BC1 = primer retrocruzamiento con consanguinidad parental elite BC2 = segundo retrocruzamiento con consanguinidad parental elite BC3 = tercer retrocruzamiento con consanguinidad parental elite
T0 = Transformante original T1 = primera generación, obtenida a partir del cruzamiento de T0 con consanguinidad elite T2 (T1S1) = obtenida a partir de la autopolinización de T1 T3 (T1S2) = obtenida a partir de la autopolinización de T2 T4 (T1S3) = obtenida a partir de la autopolinización de T3	BC2S1 = obtenida a partir de la autopolinización de BC2 BC3S1 = obtenida a partir de la autopolinización de BC3 BC3S2 = obtenida a partir de la autopolinización de BC3S1 BC3S3 = obtenida a partir de la autopolinización de BC3S2 F1 (híbrido) = cruzamiento entre dos consanguinidades elite

Figura 7. Diagrama de mejoramiento genético para el maíz 40278 y generaciones utilizado para análisis