

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 789**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/10 (2008.01)

A01H 5/00 (2008.01)

C07K 14/325 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.10.2004 E 14198791 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2019 EP 2862934**

54 Título: **Líneas de algodón transgénico Cry1F y Cry1Ac y su identificación específica de evento**

30 Prioridad:

26.03.2004 US 556586 P

27.09.2004 US 613851 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.02.2020

73 Titular/es:

DOW AGROSCIENCES, LLC (100.0%)
9330 Zionsville Road Indianapolis
Indiana 46268-1054, US

72 Inventor/es:

SONG, PING;
TAGLIANI, LAURA y
PELLOW, JOHN W.

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 743 789 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

Líneas de algodón transgénico *Cry1F* y *Cry1Ac* y su identificación específica de evento

Antecedentes de la invención

El algodón es un importante cultivo para la obtención de fibras. Se ha aplicado el cruzamiento y la biotecnología al algodón para mejorar sus rasgos agronómicos y la calidad del producto. Uno de estos rasgos agronómicos es la resistencia a insectos, cuyas ventajas son claramente evidentes. Se han introducido genes que codifican proteínas insecticidas en plantas de algodón. Para mitigar la inquietud de que un tipo concreto de insecto pueda desarrollar resistencia a un único tipo de proteína insecticida, a menudo se desarrollan plantas que producen dos tipos diferentes de proteínas insecticidas. Así, la probabilidad de que un insecto sea capaz hipotéticamente de desarrollar resistencia a dos proteínas insecticidas diferentes es extremadamente baja.

En la técnica se conocen los genes y las proteínas insecticidas *Cry1Ac*. Véanse, por ejemplo, las patentes de EEUU núms. 6.114.138; 5.710.020; 6.251.656; y 6.229.004. En la técnica también se conocen los genes y las proteínas insecticidas *Cry1F*. Véanse, por ejemplo, las patentes de EEUU núms. 5.188.960; 5.691.308; 6.096.708; y 6.573.240.

La expresión de genes extraños en plantas se ve influida por el lugar en que se inserta el gen extraño en el cromosoma. Esto puede ser debido a la estructura de la cromatina (por ejemplo, heterocromatina) o a la proximidad de elementos de regulación transcripcional (por ejemplo, potenciadores) cercanos al 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 mostrar una amplia variación en el nivel de expresión entre diferentes eventos. También pueden existir diferencias en los patrones de expresión espacial o temporal. Por ejemplo, las diferencias en la expresión relativa de un transgén en diversos tejidos vegetales pueden no corresponderse con los patrones esperados a partir de los elementos reguladores transcripcionales presentes en la construcción del gen introducido.

Así, es necesario crear y seleccionar un gran número de eventos para identificar un evento que exprese óptimamente un gen de interés introducido. Para fines comerciales, es habitual producir de cientos a miles de eventos diferentes y seleccionar los eventos para un único evento que tenga los patrones y niveles de expresión del transgén deseados. Un evento que tenga los patrones y niveles de expresión del transgén deseados es útil para introgresar el transgén en otros entornos genéticos mediante cruzamiento exogámico sexual empleando métodos de cruzamiento convencionales. La progenie de estos cruzamientos mantiene las características de expresión del transgén del transformante original. Esta estrategia se emplea para asegurar la expresión fiable de genes en una serie de variedades que están bien adaptadas a las condiciones de crecimiento locales.

Sería ventajoso poder detectar la presencia de un evento concreto para determinar si la progenie de un cruzamiento sexual contiene un transgén de interés. Además, un método para detectar un evento concreto sería útil para cumplir con las normas que requieren de una aprobación antes de la comercialización y el etiquetado de alimentos derivados de plantas de cultivos recombinantes, por ejemplo. Es posible detectar la presencia de un transgén mediante cualquier método de detección de ácidos nucleicos conocido, tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o la hibridación de ADN empleando sondas de ácidos nucleicos. Estos métodos de detección general se centran en elementos genéticos empleados con frecuencia, tales como promotores, terminadores, genes marcadores y similares. Como resultado, estos métodos pueden no ser útiles para discriminar entre diferentes eventos, en particular los producidos empleando la misma construcción de ADN, a menos que se conozca la secuencia del ADN cromosómico adyacente al ADN insertado ("ADN flanqueante"). Un ensayo de PCR específico de evento se analiza, por ejemplo, en Windels *et al.* (Med. Fac. Landbouww, Univ. Gent., 64/5b:459462, 1999). Esto se relaciona con la identificación del evento de soja tolerante al glifosato 40-3-2 mediante PCR empleando un conjunto de cebadores que abarca la unión entre el inserto y el ADN flanqueante, más concretamente, un cebador incluye una secuencia del inserto y un segundo cebador incluye una secuencia del ADN flanqueante.

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

Sin embargo, hasta la fecha no se conocen específicamente procedimientos y materiales que puedan utilizarse para identificar específicamente el algodón apilado *Cry1F* y/o *Cry1Ac*, según se analiza a continuación.

Breve resumen de la invención

Esta invención proporciona ensayos para detectar la presencia de uno o más de los presentes eventos en una muestra. La presente invención proporciona ADN y ensayos relacionados para detectar la presencia de ciertos eventos de resistencia a insectos en el algodón. Los ensayos se basan en las secuencias de ADN de construcciones recombinantes insertadas en el genoma del algodón y de las secuencias genómicas que flanquean los sitios de inserción. También se proporcionan kits y condiciones útiles para realizar los ensayos.

Así, la presente invención se refiere, en parte, al análisis de las secuencias de ADN de un inserto *cry1F* completo, y opcionalmente insertos *cry1Ac* completos, y sus regiones limítrofes (en líneas de algodón transgénico). Estas secuencias son exclusivas. Basándose en estas secuencias de insertos y limítrofes, se generaron cebadores específicos de evento. Un análisis de PCR demuestra que estos eventos pueden identificarse mediante el análisis de los amplicones de PCR generados con estos conjuntos de cebadores específicos de evento. Así, pueden emplearse estos y otros procedimientos relacionados para identificar con exclusividad líneas de algodón que comprenden uno o más eventos de la presente invención.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 ilustra el transgén *cry1F* insertado y las secuencias flanqueantes para el evento del algodón 281-24-236. Esta figura también muestra los amplicones y los cebadores descritos en la presente.

La figura 2 ilustra el transgén *cry1Ac* insertado y las secuencias flanqueantes para el evento del algodón 3006-210-23. Esta figura también muestra los amplicones y los cebadores descritos en la presente.

Breve descripción de las secuencias

SEQ ID NO:1 es la secuencia de ADN para el inserto del evento *cry1F* de 281-24-236 y sus secuencias limítrofes.

SEQ ID NO:2 es la secuencia de ADN para el inserto del evento *cry1Ac* de 3006-210-23 y sus secuencias limítrofes.

SEQ ID NO:3 es la secuencia del cebador directo "281-14" empleado con el cebador inverso "281-15" para amplificar un amplicón de 603 pb que abarca la unión 5' entre las regiones flanqueantes y del inserto del evento *cry1F* de 281-24-236.

SEQ ID NO:4 es la secuencia del cebador inverso "281-15" empleado con el cebador directo "281-14" para amplificar un amplicón de 603 pb que abarca la unión 5' entre las regiones flanqueantes y del inserto del evento *cry1F* de 281-24-236.

SEQ ID NO:5 es la secuencia de 603 pb del amplicón producido empleando los cebadores de SEQ ID NO:3 y 4.

SEQ ID NO:6 es la secuencia del cebador directo "281-9" empleado con el cebador inverso "281-10" para amplificar un amplicón de 562 pb que abarca la unión 3' entre las regiones flanqueantes y del inserto del evento *cry1F* de 281-24-236.

SEQ ID NO:7 es la secuencia del cebador inverso "281-10" empleado con el cebador directo "281-9" para amplificar un amplicón de 562 pb que abarca la unión 3' entre las regiones flanqueantes y del inserto del evento *cry1F* de 281-24-236.

SEQ ID NO:8 es la secuencia de 562 pb del amplicón producido empleando los cebadores de SEQ ID NO:6 y 7.

SEQ ID NO:9 es la secuencia del cebador directo "3006-20" empleado con el cebador inverso "3006-22" para amplificar un amplicón de 614 pb que abarca la unión 5' entre las regiones flanqueantes y del inserto del evento *cry1Ac* de 3006-210-23.

SEQ ID NO:10 es la secuencia del cebador inverso "3006-22" empleado con el cebador directo "3006-20" para amplificar un amplicón de 614 pb que abarca la unión 5' entre las regiones flanqueantes y del inserto del evento *cry1Ac* de 3006-210-23.

SEQ ID NO:11 es la secuencia de 614 pb del amplicón producido empleando los cebadores de SEQ ID NO:9 y 10.

SEQ ID NO:12 es la secuencia del cebador directo "3006-9" empleado con el cebador inverso "3006-12" para amplificar un amplicón de 662 pb que abarca la unión 3' entre las regiones flanqueantes y del inserto del evento *cry1Ac* de 3006-210-23.

SEQ ID NO:13 es la secuencia del cebador inverso "3006-12" empleado con el cebador directo "3006-9" para amplificar un amplicón de 662 pb que abarca la unión 3' entre las regiones flanqueantes y del inserto del evento *cry1Ac* de 3006-210-23.

SEQ ID NO:14 es la secuencia de 662 pb del amplicón producido empleando los cebadores de SEQ ID NO:12 y 13.

SEQ ID NO:15 es un segmento de ADN genómico del algodón para el evento de 281-24-236 (faltan 53 bases).

SEQ ID NO:16 es un segmento de ADN genómico del algodón para el evento de 3006-210-23 (faltan 16 bases).

Descripción detallada de la invención

Se describen aquí el cruzamiento de plantas y la protección de plantas frente a insectos. Más concretamente, nuevos eventos de transformación en plantas de algodón (por ejemplo, *Gossypium hirsutum* y *Gossypium*

barbadense), que comprenden una o más secuencias polinucleotídicas, según se describen en la presente, insertadas en un sitio o sitios específicos dentro del genoma de una célula de algodón. Dichas secuencias polinucleotídicas pueden codificar las proteínas inhibidoras de insectos lepidópteros Cry1F y Cry1Ac “apiladas”. Sin embargo, también se describen aquí plantas que presentan únicos eventos Cry1F o Cry1Ac.

- 5 La presente invención proporciona ensayos para detectar la presencia de uno o más de los presentes eventos en una muestra. Los aspectos de la presente invención incluyen métodos para diseñar y/o producir cualquiera de las moléculas de ácidos nucleicos de diagnóstico ejemplificadas o sugeridas en la presente, en particular las que se basan, total o parcialmente, en las presentes secuencias flanqueantes.

- 10 De modo más específico, la presente invención se refiere, en parte, a un método para detectar dos eventos del algodón transgénico (*cry1F* de 281-24-236 y *cry1Ac* de 3006-210-23), este inserto *cry1F*, y opcionalmente estos insertos de *cry1Ac*, y/o sus regiones limítrofes. Las líneas de plantas pueden detectarse empleando las secuencias descritas y sugeridas en la presente.

- 15 En realizaciones preferidas, el método se refiere a líneas de algodón resistentes a insectos y a su identificación, que produce dos proteínas insecticidas “apiladas” conocidas como *Cry1F* y *Cry1Ac* (el evento *cry1F* de 281-24-236 y el evento *cry1Ac* de 3006-210-23). Sin embargo, las plantas pueden comprender el evento *Cry1F* o, preferiblemente, ambos eventos analizados en la presente.

- 20 Tal como se aludió anteriormente en la sección de antecedentes, la introducción y la integración de un transgén en el genoma de una planta implica algunos eventos aleatorios (de ahí el nombre “evento” para una inserción concreta que se expresa). Es decir, con muchas técnicas de transformación, tales como la transformación con *Agrobacterium*, la “pistola de genes”, y WHISKERS, es imposible predecir dónde se va a insertar el transgén en el genoma. Así, la identificación del ADN genómico vegetal flanqueante en ambos lados del inserto puede ser importante para identificar una planta que presenta un evento de inserción concreto. Por ejemplo, pueden diseñarse cebadores de PCR que generen un amplicón de PCR que abarque la región de unión del inserto y el genoma del hospedante. Este amplicón de PCR puede emplearse para identificar un tipo exclusivo o diferenciado de evento de inserción.

- 25 Puesto que los “eventos” son eventos aleatorios y, en general, no pueden duplicarse, como parte de esta descripción se han depositado al menos 2500 semillas de una línea de algodón, que comprende el evento *cry1F* de 281-24-236 y el evento *cry1Ac* de 3006-210-23, y están disponibles al público sin restricciones (pero sometidas a derechos de patente), en the American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Md. 20852. El depósito se ha denominado ATCC n.º de depósito PTA-6233. El depósito se mantendrá sin restricciones en el depósito del ATCC, que es un depósito público, durante un periodo de 30 años, o cinco años después de la petición más reciente, o durante la vida efectiva de la patente, lo que abarque más tiempo, y será reemplazado si se convierte en no viable durante ese periodo.

- 35 Evidentemente, pueden cultivarse plantas de algodón a partir de estas semillas. La presente invención también se refiere a secuencias de ADN contenidas en estas plantas de algodón que son útiles para detectar estas plantas y su progenie. Los métodos de detección y kits de la presente invención pueden estar dirigidos a identificar uno, dos o incluso los tres eventos, dependiendo del objetivo final del ensayo.

- 40 En la presente se proporcionan definiciones y ejemplos 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 y las expresiones deben entenderse según su utilización convencional por los expertos en la técnica pertinente. Se emplea la nomenclatura para las bases de ADN indicada en 37 CFR §1.822.

- 45 Un “evento” transgénico se produce por medio de la 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 que resultan de la inserción del transgén en el genoma de la planta, y la selección de una planta concreta que se caracteriza por la inserción en una localización genómica concreta. El término “evento” se refiere al transformante original y a la progenie del transformante que incluyen el ADN heterólogo. El término “evento” también se refiere a la progenie producida por el cruzamiento exogámico sexual entre el transformante y otra variedad que incluya el ADN genómico/del transgén. Incluso después de retrocruzamientos repetidos hasta un progenitor recurrente, el ADN del transgén insertado y el ADN genómico flanqueante (ADN genómico/del transgén) del progenitor transformado sigue estando presente en la progenie del cruzamiento en la misma localización cromosómica. El término “evento” también se refiere a ADN del transformante original y su progenie que comprende el ADN insertado y la secuencia genómica flanqueante inmediatamente adyacente al ADN insertado que se espera que va a transferirse a una progenie que recibe el ADN insertado que incluye el transgén de interés como resultado de un cruzamiento sexual de una línea parental que incluye el ADN insertado (por ejemplo, el transformante original y la progenie que resulta de la autofertilización) y una línea parental que no contiene el ADN insertado.

- 55 Una “secuencia de unión” abarca el punto en que el ADN insertado en el genoma está unido al ADN del genoma nativo del algodón que flanquea el sitio de inserción, siendo suficiente la identificación o la detección de una u otra de las secuencias de unión en el material genético de una planta para diagnosticar el evento. Se incluyen las secuencias de ADN que abarcan las inserciones en los eventos del algodón descritos en la presente y longitudes

similares del ADN flanqueante. En la presente se proporcionan ejemplos específicos de estas 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 pueden utilizarse según la presente invención.

- La presente invención se refiere a la identificación de estas secuencias flanqueantes, de unión y del inserto. Los amplicones y cebadores PCR relacionados están incluidos en la presente invención. Según la presente invención, pueden emplearse métodos de análisis de PCR que emplean amplicones que abarcan el ADN insertado y sus límites (de *cry1F* de 281-24-236 y opcionalmente *cry1Ac* de 3006-210-23) para detectar o identificar líneas o variedades de algodón transgénico comercializadas derivadas de las presentes líneas de algodón transgénico patentadas.
- 10 Las secuencias completas de cada uno de estos insertos, junto con las respectivas secuencias flanqueantes, se proporcionan en la presente como SEQ ID NO:1 (*cry1F* de 281-24-236) y SEQ ID NO:2 (*cry1Ac* de 3006-210-23). La tabla I proporciona las coordenadas de las secuencias del inserto y flanqueantes para estos eventos.

Tabla I

Evento	Para la SEQ ID NO: indicada, localización del resto de:		
	5' flanqueante	Inserto	3' flanqueante
<i>cry1F</i> de 281-24-236 (SEQ ID NO:1)	1-2074	2.075-12.748	12.749-15.490
<i>cry1Ac</i> de 3006-210-23 (SEQ ID NO:2)	1-527	528-8.900	8.901-9.382

- 15 Estos eventos de inserción, y otros componentes de estos, se ilustran más a fondo en las figuras 1 y 2. Estas secuencias (en particular, las secuencias flanqueantes) son exclusivas. Basándose en estas secuencias del inserto y limitrofes, se generaron cebadores específicos de evento. Un análisis de PCR demostró que estas líneas de algodón pueden identificarse en diferentes genotipos de algodón mediante el análisis de los amplicones de PCR generados con estos conjuntos de cebadores específicos de evento. Por tanto, estos y otros procedimientos relacionados pueden utilizarse para identificar estas líneas de algodón. Las secuencias identificadas en la presente son exclusivas. Por ejemplo, las selecciones con BLAST en las bases de datos de GENBANK no revelaron ninguna homología significativa entre las secuencias limitrofes clonadas y las secuencias en la base de datos.

- 20 Las técnicas de detección de la presente invención son especialmente útiles junto con el cruzamiento de plantas, para determinar cuáles son las plantas de la progenie que comprenden un evento concreto, después de que una planta progenitora que comprende un evento de interés se cruce con otra línea de plantas para intentar impartir uno o más rasgos de interés adicionales a la progenie. Estos métodos de análisis de PCR aprovechan los programas de cruzamiento del algodón, así como el control de calidad, en especial para semillas de algodón transgénicas comercializadas. Ahora también se pueden fabricar y utilizar kits de detección de PCR para estas líneas de algodón transgénico. Esto también puede beneficiar el registro del producto y la gestión ambiental del producto.

- 25 Además, las secuencias de algodón flanqueantes pueden utilizarse para identificar específicamente la localización genómica de cada inserto. Esta información puede emplearse para fabricar sistemas de marcadores moleculares específicos para cada evento. Estos pueden utilizarse para acelerar estrategias de cruzamiento y para establecer datos de vinculaciones.

- 30 Además, la información de las secuencias flanqueantes puede emplearse para estudiar y caracterizar procesos de integración de transgenes, características del sitio de integración genómico, clasificaciones de eventos, estabilidad de los transgenes y sus secuencias flanqueantes, y expresión de genes (en especial relacionados con el silenciamiento de genes, patrones de metilación de transgenes, efectos de posición, y elementos relacionados con la expresión potenciales, tales como MARS (regiones de unión a la matriz) y similares).

- 35 Tal como se emplea en la presente, el término "algodón" significa *Gossypium hirsutum*, e incluye todas las variedades de plantas que pueden cruzarse con el algodón, que incluyen *Gossypium barbadense*.

- 40 Las moléculas de ADN de la presente invención pueden emplearse como marcadores moleculares en un método de cruzamiento asistido por marcadores (MAB). Las moléculas de ADN de la presente invención pueden utilizarse en métodos (tales como marcadores AFLP, marcadores RFLP, marcadores RAPD, SNP, y SSR) que identifican rasgos útiles desde el punto de vista agronómico que estén genéticamente conectados, tal como se conoce en la técnica. El rasgo de resistencia a insectos puede ser rastreado en la progenie de un cruzamiento con una planta de algodón de la presente invención (o su progenie y cualquier otra variedad o cultivar de algodón) empleando los métodos MAB. Las moléculas de ADN son marcadores para este rasgo, y pueden emplearse los métodos MAB, que son muy conocidos en la técnica, para rastrear el rasgo o rasgos de resistencia a insectos en plantas de algodón, para las cuales al menos una línea de algodón de la presente invención, o su progenie, ha sido un progenitor o ancestro. Los

métodos de la presente invención pueden emplearse para identificar cualquier variedad de algodón que presente el evento de resistencia a insectos de la línea de algodón 281-24-236 (*cry1F*) y opcionalmente 3006-210-23 (*cry1Ac*).

Una planta preferida, o una semilla, relacionada con la presente invención comprende en su genoma al menos una de las secuencias del inserto, según se identifica en la tabla I, junto con al menos 20-500 o más nucleótidos flanqueantes contiguos en ambos lados del inserto, según se identifica en la tabla I. A menos que se indique lo contrario, “el evento *cry1Ac* del algodón 3006-210-23” se refiere a un ADN de SEQ ID NO:1 que incluye el ADN heterólogo insertado en el transformante original (nucleótidos 2075-12.748 de SEQ ID NO:1) y todas o parte de ambas secuencias genómicas flanqueantes de SEQ ID NO:1 (restos nucleótidos 1-2074 y 12.749-15.490) inmediatamente adyacentes al ADN insertado que se espera que se transfiera a la progenie, que recibe el ADN insertado como resultado de un cruzamiento sexual de una línea parental que incluye el evento. De modo similar, a menos que se indique lo contrario, “el evento *cry1Ac* del algodón 3006-210-23” se refiere a un ADN de SEQ ID NO:2 que incluye el ADN heterólogo insertado en el transformante original (nucleótidos 528-8900 de SEQ ID NO:2) y todas o parte de ambas secuencias genómicas flanqueantes de SEQ ID NO:2 (restos nucleótidos 1-527 y 8901-93821) inmediatamente adyacentes al ADN insertado que se espera que se transfiera a la progenie, que recibe el ADN insertado como resultado de un cruzamiento sexual de una línea parental que incluye el evento.

Las manipulaciones (tales como mutaciones, transfecciones posteriores, y cruzamientos posteriores) de plantas o semillas, o sus partes, pueden conducir a la creación de lo que se puede denominar variedades “fundamentalmente derivadas”. The International Union for the Protection of New Varieties of Plants (UPOV) ha proporcionado las siguientes directrices para determinar si una variedad se ha derivado fundamentalmente de una variedad protegida:

[A] Se considera que una variedad se deriva fundamentalmente de otra variedad (“la variedad inicial”) cuando:

(i) se deriva predominantemente de la variedad inicial, o de una variedad que, en sí misma, se deriva predominantemente de la variedad inicial, pero mantiene la expresión de las características esenciales que surgen del genotipo o combinación de genotipos de la variedad inicial;

(ii) es claramente distinguible de la variedad inicial; y

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

UPOV, 6ª reunión con organizaciones internacionales, Ginebra, 30 de octubre, 1992, documento preparado por la Oficina de la Unión.

Tal como se emplea en la presente, una “línea” es un grupo de plantas que muestran poca o ninguna variación genética entre individuos para al menos un rasgo. Estas líneas pueden crearse mediante varias generaciones de autopolinización y selección, o mediante propagación vegetativa a partir de un único progenitor empleando técnicas de cultivos de tejidos o células.

Tal como se emplea en la presente, los términos “cultivar” y “variedad” son sinónimos y se refieren a una línea que se emplea para la producción comercial.

“Estabilidad” o “estable” significa que, con respecto a un componente dado, el componente se mantiene de generación en generación y, preferiblemente, al menos tres generaciones sustancialmente al mismo nivel, por ejemplo, preferiblemente $\pm 15\%$, más preferiblemente $\pm 10\%$, lo más preferiblemente $\pm 5\%$. La estabilidad puede verse afectada por la temperatura, la localización, el estrés y el momento de la plantación. La comparación de las posteriores generaciones en condiciones de campo debería producir el componente de una manera similar.

La “utilidad comercial” se define como que la planta tiene buen vigor y alta fertilidad, de modo que el cultivo puede ser producido por agricultores empleando un equipo agrícola convencional, y el aceite puede extraerse de las semillas con los compuestos descritos empleando un equipo de prensado y extracción convencional. Para que sea comercialmente útil, el rendimiento, según se mide mediante el peso de la semilla, el contenido en aceite, y el aceite total producido por hacer, estará dentro del 15% del rendimiento medio de una variedad de canola comercial comparable sin los rasgos de valor de calidad superior, que se cultive en la misma región.

“Agronómicamente elitaria” significa que una línea tiene características agronómicas deseables, tales como rendimiento, madurez, resistencia a enfermedades, y similares, además de la resistencia a insectos debida al evento o eventos de la presente.

Tal como reconocerán los expertos en la técnica a la luz de esta descripción, los kits de detección incluyen sondas y/o cebadores dirigidos a y/o que comprenden “secuencias de unión” o “secuencias de transición” (en las que la secuencia flanqueante genómica del algodón se une con la secuencia del inserto). Por ejemplo, esto incluye una sonda, un cebador o un amplicón polinucleotídico que comprende una secuencia que incluye los restos 2074-2075 o 12.748-12.749 de SEQ ID NO:1, y opcionalmente los restos 527-528 o 8.900-8.901 de SEQ ID NO:2, según se indica en la tabla I. Para que sean diagnósticos para estos eventos concretos, los “cebadores de unión” preferidos

deben incluir al menos aproximadamente 15 restos e la secuencia flanqueante adyacente y al menos aproximadamente 15 restos de la secuencia del inserto adyacente. Con esta disposición, puede emplearse otro cebador en la región flanqueante o en la región del inserto para generar un amplicón detectable que indique la presencia de un evento de la presente invención. Sin embargo, en realizaciones preferidas, un cebador se une a la región flanqueante y otro se une en el inserto, y estos cebadores pueden emplearse para generar un amplicón que abarque (e incluya) una secuencia de unión, según se indicó anteriormente.

Los expertos en la técnica también reconocerán que pueden diseñarse cebadores y sondas para hibridarse, bajo una serie de condiciones de hibridación y/o PCR convencionales, con un segmento de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 y sus complementos, en los que el cebador y la sonda no son perfectamente complementarios con la secuencia ejemplificada. Es decir, puede tolerarse algún grado de desapareamiento. Para un cebador de aproximadamente 20 nucleótidos, por ejemplo, generalmente no es necesario que uno o dos o unos cuantos nucleótidos se unan a la hebra opuesta si la base desapareada es interna o está en el extremo del cebador opuesto al amplicón. A continuación se proporcionan diversas condiciones de hibridación apropiadas. También pueden utilizarse análogos de nucleótidos sintéticos, tales como inosina, en las sondas. También pueden emplearse sondas de ácidos nucleicos peptídicos (PNA), así como sondas de ADN y ARN. Lo importante es que dichas sondas y cebadores sean diagnósticas (sean capaces de identificar y distinguir de forma exclusiva) de la presencia de un evento de la presente invención.

También debe advertirse que pueden producirse errores en la amplificación con PCR que pueden producir pequeños errores de secuenciación, por ejemplo. Es decir, a menos que se indique lo contrario, las secuencias listadas en la presente se determinaron generando amplicones largos a partir de ADN genómicos de algodón, y después clonando y secuenciando los amplicones. No es raro encontrar ligeras diferencias y pequeñas discrepancias en las secuencias generadas y determinadas de esta manera, debido a las muchas rondas de amplificación que son necesarias para generar los amplicones suficientes para la secuenciación a partir de ADN genómico. Por ejemplo, se indican las siguientes diferencias entre las secuencias determinadas de los ADN flanqueantes del evento y los correspondientes ADN conocidos/de tipo salvaje/genómicos. En el flanco 50 para el presente evento cry1F, se determinó que el resto 2037 de SEQ ID NO: 1 se lista como "G", mientras que el correspondiente resto del locus de 281-24-236 de la secuencia genómica conocida es "A" (R puede emplearse en una secuencia consenso, según las convenciones de la IUPAC-IUB convencionales). En el flanco 3' de este evento, el resto 12.781 de SEQ ID NO:1 se lista en la presente como T, mientras que en la secuencia genómica publicada se proporciona C en la correspondiente localización (Y es el código consenso). La posición 12.811 de SEQ ID NO:1 es C, mientras que se proporciona T para el genoma (Y sería el consenso). La posición 12.866 se lista como C en SEQ ID NO:1, mientras que aparece T en el genoma (Y es el consenso). La posición 12.882 se lista como G en SEQ ID NO:1, mientras que aparece A en el genoma (R es el consenso). La posición 12.918 se lista como A en SEQ ID NO:1, mientras que aparece G en el genoma (R es el consenso). El resto 13.129 se lista como G en SEQ ID NO:1, mientras que aparece A en el genoma (R es el consenso). El resto 13.222 se lista como C en SEQ ID NO:1, mientras que aparece T en la secuencia genómica (Y es el consenso). En la posición 13.441 en SEQ ID NO:1 aparece T, mientras que no existe un resto correspondiente en el listado genómico. Así, esta aparente inserción desplazaría cadena abajo la numeración de SEQ ID NO:1 en consecuencia, comparado con la secuencia genómica. Los expertos en la técnica deberían reconocer y advertir que cualquier ajuste necesario debido a este tipo de errores de secuenciación o discrepancias comunes está dentro del alcance de la presente invención.

También aparecen diferencias similares en el flanco 5' para el presente evento cry1A. En las posiciones 149, 153, 159, 165 y 244 de SEQ ID NO:2 se listan los siguientes restos, respectivamente: C, G, C, C, y C. En la secuencia genómica en el locus de 3006-210-23 aparecen los siguientes restos, respectivamente, en las correspondientes localizaciones: A, A, A, A, y A. Los códigos consenso para estas sustituciones son, respectivamente: M, R, M, M, y M. Pueden realizarse ajustes en consecuencia en las sondas y los cebadores, y las correspondientes diferencias pueden notarse en los amplicones que abarcan o incluyen cualquiera de los restos anteriores.

También debe advertirse que no es raro que una parte de la secuencia genómica se delecione cuando una secuencia se inserta durante la creación de un evento. Este es el caso para ambos eventos de la presente invención. Es decir, SEQ ID NO:1 proporciona un segmento de 53 bases de ADN genómico del algodón para el evento de 281-24-236 que se delecciona durante la inserción. Este "segmento interior" aparece entre los restos 2074 y 12.749 de SEQ ID NO:1 en el genoma del algodón no transformado. De modo similar, SEQ ID NO:2 proporciona un segmento de 16 bases del ADN genómico del algodón para el evento de 3006-210-23 que se delecciona durante la inserción. Este "segmento interior" aparece entre los restos 527 y 8.901 de SEQ ID NO:2 en el genoma del algodón no transformado.

Tal como se ilustra en las figuras 1 y 2, los componentes de cada uno de los "insertos" son los siguientes. Las moléculas de ADN del elemento genético del transgén contenidas en el presente evento Cry1F de 281-24-236 consisten en el promotor 1 de ubiquitina de maíz, conectado operablemente con fosfinotricina N-acetiltransferasa (PAT) de *Streptomyces viridochromogenes*, conectado operablemente con las secuencias de poliadenilación ORF25 (Baker *et al.*, *Plant Molecular Biology*, 2:335-350, 1983); el promotor quimérico [(4OCS)δMAS] que contiene un promotor de manopinas sintasa parcialmente deleccionado con 4 elementos potenciadores del promotor de octopina sintasa, conectado operablemente con el Cry1F(synpro) de *Bacillus thuringiensis* var. aizawai, conectado operablemente con las secuencias de poliadenilación ORF25 (Baker *et al.*, *Plant Molecular Biology*, 2:335-350,

1983); y el promotor 1 de ubiquitina de maíz no conectado operablemente con una secuencia *pat* parcial. Las secuencias polinucleotídicas del ADN, o fragmentos de estos componentes, pueden emplearse como cebadores o sondas de ADN en los métodos de la presente invención.

5 Las moléculas de ADN del elemento genético del transgén contenidas en el presente evento *Cry1Ac* de 3006-210-23 consisten en el promotor (4OCS)δMAS conectado operablemente con PAT (según se describió anteriormente), conectado operablemente con ORF25; y el promotor 1 de ubiquitina de maíz conectado operablemente con *Cry1Ac* (synpro) de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, conectado operablemente con las secuencias de poliadenilación ORF25. Las secuencias polinucleotídicas del ADN de estos componentes, o sus fragmentos, pueden emplearse como cebadores o sondas de ADN en los métodos de la presente invención.

10 En algunas realizaciones de la invención, se proporcionan composiciones y métodos para detectar la presencia de la región de inserción del transgén/genómica en plantas y semillas y similares, en una planta de algodón diseñada con WIDESTRIKE que comprende el evento *Cry1F* del algodón 281-24-236 y el evento *Cry1Ac* del algodón 3006-210-23. Se proporcionan secuencias de ADN que comprenden al menos una secuencia de unión de la región de inserción del transgén/genómica proporcionada en la presente en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, sus segmentos y
15 complementos de las secuencias ejemplificadas y cualquiera de sus segmentos. 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 algodón que flanquea el sitio de inserción. Esta secuencia es diagnóstica para uno o más de los eventos indicados.

Basándose en estas secuencias del inserto y limítrofes, se generaron cebadores específicos de evento. Un análisis de PCR demostró que estas líneas de algodón (*Cry1F* de 281-24-236 y *Cry1Ac* de 3006-210-23) pueden
20 identificarse en diferentes genotipos de algodón mediante el análisis de los amplicones de PCR generados con estos conjuntos de cebadores específicos de evento. Estos y otros procedimientos relacionados pueden emplearse para identificar exclusivamente estas líneas de algodón. Por tanto, los amplicones de PCR derivados de estas parejas de cebadores son exclusivos y pueden emplearse para identificar estas líneas de algodón.

En algunas realizaciones, las secuencias de ADN que comprenden al menos una de las nuevas regiones de inserción genómica/del transgén son un aspecto de esta invención. Se incluyen secuencias de ADN que comprenden una longitud suficiente de polinucleótidos de la secuencia del inserto del transgén y una longitud suficiente de polinucleótidos de la secuencia genómica del algodón procedente de una o más de las tres plantas de algodón mencionadas anteriormente y/o secuencias que son útiles como secuencias de cebadores para la
25 producción de un producto de amplicón diagnóstico para una o más de estas plantas de algodón.

Realizaciones relacionadas se refieren 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 del transgén de una secuencia de ADN seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2, o sus complementos, y una longitud similar de una secuencia de ADN de algodón flanqueante de estas secuencias, o sus complementos. Estas secuencias son útiles como cebadores de ADN en métodos de amplificación del ADN. Los amplicones
30 producidos empleando estos cebadores son diagnósticos para cualquiera de los eventos del algodón indicados en la presente.

A continuación aparece una tabla que resume algunas realizaciones específicas de la presente invención.

Tabla II. Lista de cebadores y sus secuencias empleados en la amplificación por PCR específica de evento

Evento	Secuencia directa (5'-3')	Secuencia inversa (5'-3')	Tamaño del amplicón (pb)	Región diana
281-24-236	tgtcggctgaaggtaggagg (281-14) (SEQ ID NO:3)	ccggacatgaagccatttac (281-15) (SEQ ID NO:4)	603 (SEQ ID NO:5)	unión del inserto 5'
	tctctagagaggggcacgacc (281-9) (SEQ ID NO:6)	cgagctggagagaccggtgac (281-10) (SEQ ID NO:7)	562 (SEQ ID NO:8)	unión del inserto 3'
3006-210-23	ttccaaccttaactattatcctgc (3006-20) (SEQ ID NO:9)	gctgcggacatctacatttt (3006-22) (SEQ ID NO:10)	614 (SEQ ID NO:11)	unión del inserto 5'
	gacatgcaatgctcattatctcta (3006-9) (SEQ ID NO:12)	aagtctctgccttctaccctgg (3006-12) (SEQ ID NO:13)	662 (SEQ ID NO:14)	unión del inserto 3'

40 Esta invención detecta la presencia de ADN en una muestra, que se corresponde con al menos los eventos *Cry1F* del algodón indicados en la presente. Estos métodos pueden comprender: (a) poner en contacto la muestra que comprende ADN con un conjunto de cebadores que, cuando se emplea en una reacción de amplificación de ácidos nucleicos con un ADN procedente de al menos uno de estos eventos del algodón, produce un amplicón que es diagnóstico para dicho evento o eventos; (b) realizar una reacción de amplificación de ácidos nucleicos,

produciendo con ello el amplicón; y (c) detectar el amplicón.

Otros métodos de detección incluyen detectar la presencia de un ADN en una muestra, que se corresponde con al menos los eventos Cry1F, en el que dicho método comprende: (a) poner en contacto la muestra que comprende ADN con una sonda que se hibrida bajo condiciones de hibridación rigurosas con el ADN procedente de al menos uno de dichos eventos del algodón, y que no se hibrida bajo condiciones de hibridación rigurosas con una planta de algodón control (ADN sin el 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.

También se consideran métodos para determinar la cigosidad de la progenie de un cruzamiento con uno cualquiera (o más) de dichos tres eventos. Dichos métodos pueden comprender poner en contacto una muestra, que comprende ADN de algodón, con un conjunto de cebadores de la presente invención. Dichos cebadores, cuando se emplean en una reacción de amplificación de ácidos nucleicos con el ADN genómico procedente de al menos uno de dichos eventos del algodón, produce un primer amplicón que es diagnóstico para al menos uno de dichos eventos del algodón. Estos métodos comprenden también realizar una reacción de amplificación de ácidos nucleicos, produciendo con ello el primer amplicón; detectar el primer amplicón; y poner en contacto la muestra que comprende ADN de algodón con dicho conjunto de cebadores (dicho conjunto de cebadores, cuando se emplea en una reacción de amplificación de ácidos nucleicos con ADN genómico procedente de plantas de algodón, produce un segundo amplicón que comprende el ADN genómico del algodón nativo homólogo con la región genómica del algodón de una inserción del transgén identificada como uno de dichos eventos del algodón); y realizar una reacción de amplificación de ácidos nucleicos, produciendo con ello el segundo amplicón. Los métodos comprenden también detectar el segundo amplicón, y comparar el primer y el segundo amplicón en una muestra, en la que la presencia de ambos amplicones indica que la muestra es heterocigótica para la inserción del transgén.

Pueden desarrollarse kits de detección de ADN empleando las composiciones descritas en la presente y métodos bien conocidos en la técnica de la detección de ADN. Los kits son útiles para la identificación del ADN del presente evento del algodón en una muestra, y pueden aplicarse a métodos para el cruzamiento de plantas de algodón que contienen este ADN. Los kits contienen secuencias de ADN homólogas o complementarias con los amplicones, por ejemplo, los descritos en la presente, o con secuencias de ADN homólogas o complementarias con el ADN contenido en los elementos genéticos del transgén de los presentes eventos. Estas secuencias de ADN pueden utilizarse en reacciones de amplificación de ADN o como sondas en un método de hibridación de ADN. Los kits también pueden contener los reactivos y los materiales necesarios para realizar el método de detección.

Una "sonda" es una molécula de ácido nucleico aislada a la cual está unido un marcador detectable o una molécula indicadora convencional (tal como un isótopo radiactivo, ligando, agente quimioluminiscente, o enzima). Esta sonda es complementaria con una hebra de un ácido nucleico diana, en el caso de la presente invención con una hebra del ADN genómico procedente de uno de dichos eventos del algodón, tanto de una planta de algodón como de una muestra que incluye ADN del evento. Las sondas de acuerdo con 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 que pueden utilizarse para detectar la presencia de esa secuencia de ADN diana.

Los "cebadores" son ácidos nucleicos aislados que se asocian a una hebra del ADN diana complementaria mediante hibridación de ácidos nucleicos para formar un híbrido entre el cebador y la hebra de ADN diana, y después se extienden a lo largo de la hebra del ADN diana por medio de una polimerasa, por ejemplo, una ADN polimerasa. Las parejas de cebadores de la presente invención se remiten a su uso para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico diana, por ejemplo, mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otros métodos de amplificación de ácidos nucleicos convencionales.

Las sondas y los cebadores generalmente tienen 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, o 500 polinucleótidos o más. Estas sondas y cebadores se hibridan específicamente con una secuencia diana bajo 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 pueden diseñarse sondas que se diferencian de la secuencia diana y que conservan la capacidad para hibridarse con las secuencias diana mediante métodos convencionales.

Los métodos para preparar y emplear sondas y cebadores se describen, por ejemplo, en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., vol. 1-3, ed. Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989. Las parejas de PCR-cebador pueden derivarse de una secuencia conocida, por ejemplo, empleando programas informáticos previstos para este fin.

Los cebadores y las sondas basadas en las secuencias del inserto y el ADN flanquente descritas en la presente pueden emplearse para confirmar (y si es necesario, para corregir) las secuencias descritas mediante métodos convencionales, por ejemplo, mediante reclonación y secuenciación de dichas secuencias.

Las sondas y los cebadores de ácidos nucleicos de la presente invención se hibridan bajo condiciones rigurosas con una secuencia de ADN diana. Puede emplearse cualquier método de amplificación o hibridación de ácidos nucleicos convencional para identificar la presencia de ADN de un evento transgénico en una muestra. Las moléculas de ácidos nucleicos, o sus fragmentos, son capaces de hibridarse específicamente con otras moléculas de ácidos nucleicos bajo ciertas circunstancias. Tal como se emplea en la presente, se dice que dos moléculas de ácidos nucleicos son capaces de hibridarse específicamente entre sí si las dos moléculas son capaces de formar una estructura de ácido nucleico bicatenario antiparalela. Se dice que una molécula de ácido nucleico es el "complemento" de otra molécula de ácido nucleico si muestra una complementariedad completa. Tal como se emplea en la presente, se dice que las moléculas muestran "complementariedad completa" cuando cada nucleótido de una de las moléculas es complementario con un nucleótido de la otra. Se dice que dos moléculas son "mínimamente complementarias" si pueden hibridarse entre sí con una estabilidad suficiente como para que puedan permanecer asociadas entre sí al menos bajo condiciones de "baja rigurosidad" convencionales. De modo similar, se dice que las moléculas son "complementarias" si pueden hibridarse entre sí con una estabilidad suficiente como para que puedan seguir asociadas entre sí bajo condiciones de "alta rigurosidad" convencionales. Las condiciones de rigurosidad convencionales se describen en Sambrook *et al.*, 1989. Por tanto, son lícitas las desviaciones de la complementariedad completa, con la condición de que dichas desviaciones no impidan completamente la capacidad de las moléculas para formar una estructura bicatenaria. Para que una molécula de ácido nucleico actúe como cebador o sonda, solo debe ser suficientemente complementaria en su secuencia para ser capaz de formar una estructura bicatenaria estable con el disolvente y las concentraciones salinas concretos empleados.

Tal como se emplea en la presente, una secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia de un ácido nucleico que se hibridará específicamente con el complemento de la secuencia del ácido nucleico con el cual se está comparando bajo condiciones de alta rigurosidad. La expresión "condiciones rigurosas" se define desde el punto de vista funcional con respecto a la hibridación de una sonda de ácido nucleico con un ácido nucleico diana (es decir, con una secuencia de ácido nucleico concreta de interés) mediante el procedimiento de hibridación específico analizado 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 pueden emplearse por su capacidad para formar selectivamente moléculas dúplex con tramos complementarios de fragmentos de ADN.

Dependiendo de la aplicación prevista, se pueden emplear diversas condiciones de hibridación para lograr diversos grados de selectividad de la sonda hacia la secuencia diana. Para aplicaciones que requieren una alta selectividad, se emplearán generalmente condiciones relativamente rigurosas para formar los híbridos, por ejemplo, se seleccionarán unas condiciones de concentraciones salinas relativamente bajas y/o temperatura relativamente alta, tales como las proporcionadas por NaCl de aproximadamente 0,02 M a aproximadamente 0,15 M a unas temperaturas de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 70 °C. Las condiciones rigurosas implican, por ejemplo, lavar el filtro de hibridación al menos dos veces con tampón de lavado de alta rigurosidad (0,2x SSC, SDS al 0,1%, 65 °C). Las condiciones de rigurosidad apropiadas que favorecen la hibridación del ADN, por ejemplo, 6,0x cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45 °C, seguido de un lavado con 2,0x SSC a 50 °C, son conocidas por los expertos en la técnica, 6.3.1-6.3.6. Por ejemplo, la concentración salina en la etapa de lavado puede seleccionarse desde una baja rigurosidad de aproximadamente 2,0x SSC a 50 °C, hasta una alta rigurosidad de aproximadamente 0,2x SSC a 50 °C. Además, la temperatura en la etapa de lavado puede aumentar desde unas condiciones de baja rigurosidad a la temperatura ambiente, aproximadamente 22 °C, hasta unas condiciones de alta rigurosidad a aproximadamente 65 °C. La temperatura y las sales pueden variar, o la temperatura o la concentración salina puede mantenerse constante mientras que se cambia la otra variable. Estas condiciones selectivas toleran poco o ningún desapeamiento entre la sonda y el molde o hebra diana. La detección de las secuencias de ADN mediante hibridación es muy conocida por los expertos en la técnica, y las indicaciones de las patentes de EEUU núms. 4.965.188 y 5.176.995 son ejemplos de los métodos de análisis de hibridación.

En una realización particularmente preferida, un ácido nucleico de la presente invención se hibridará

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

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 dichas secuencias de ácidos nucleicos. En otro aspecto de la presente invención, una molécula de ácido nucleico marcadora comparte entre 95% y 100% de identidad de secuencia con dicha secuencia. Estas secuencias pueden utilizarse como marcadores en métodos de cruzamiento de plantas para identificar la progenie de los cruzamientos genéticos. La hibridación de la sonda con la molécula de ADN diana puede detectarse mediante cualquiera de una serie de métodos conocidos por los expertos en la técnica, y estos incluyen, pero no se limitan a marcadores fluorescentes, marcadores radiactivos, marcadores basados en anticuerpos, y marcadores quimioluminiscentes.

Con respecto a la amplificación de una secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, mediante PCR) empleando una pareja de cebadores de la amplificación concreta, las "condiciones rigurosas" son condiciones que permiten que la pareja de cebadores se hibride solo con la secuencia del ácido nucleico diana con la que un cebador que tenga la correspondiente secuencia de tipo salvaje (o sus complementos) se uniría, y preferiblemente se produce un producto de la amplificación exclusivo, el amplicón.

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

Tal como se emplea en la presente, "ADN amplificado" o "amplicón" se refiere al producto de la amplificación de un ácido nucleico de una secuencia de ácido nucleico diana que es parte de un molde de ácido nucleico. Por ejemplo, para determinar si la planta de algodón resultante de un cruzamiento sexual contiene ADN genómico del evento transgénico procedente de la planta de algodón de la presente invención, el ADN extraído de una muestra de tejido de una planta de algodón puede someterse a un método de amplificación de ácidos nucleicos empleando una pareja de cebadores que incluye un cebador derivados de la secuencia flanqueante en el genoma de la planta, adyacente al sitio de inserción del ADN heterólogo insertado, y un segundo cebador derivado del ADN heterólogo insertado, para producir un amplicón que es diagnóstico de la presencia del ADN del evento. El amplicón tiene una longitud y una secuencia que también son diagnósticas para el evento. El amplicón puede variar en longitud de la longitud combinada de las parejas de cebadores más un par de bases nucleotídicas y/o la longitud combinada de las parejas 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, o 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750, 2000 o más pares de bases nucleotídicas (más o menos cualquiera de los incrementos listados anteriormente). Como alternativa, una pareja de cebadores puede derivarse de la secuencia flanqueante en ambos lados del ADN insertado para producir un amplicón que incluya la secuencia de nucleótidos del inserto completa. Un miembro de una pareja de cebadores derivada de la secuencia genómica de la planta puede localizarse a una distancia de la secuencia de ADN insertada. Esta distancia puede variar desde un par de bases nucleotídicas hasta aproximadamente 20.000 pares de bases nucleotídicas. El uso del término "amplicón" excluye específicamente los dímeros de cebadores que pueden formarse en la reacción de amplificación térmica del ADN.

La amplificación de ácidos nucleicos puede acompañarse de cualquiera de los diversos métodos de amplificación de ácidos nucleicos conocidos en la técnica, que incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En la técnica se conoce una diversidad de métodos de amplificación y se describen, entre otros, en la patente de EEUU n.º 4.683.195 y la patente de EEUU n.º 4.683.202. Los métodos de amplificación mediante PCR se han desarrollado para amplificar hasta 22 kb de ADN genómico. Estos métodos, así como otros métodos conocidos en la técnica de la

amplificación del ADN, pueden utilizarse en la práctica de la presente invención. La secuencia del inserto de ADN del transgén heterólogo o la secuencia genómica flanqueante de un evento del algodón de la presente pueden verificarse (y corregirse si es necesario) amplificando dichas secuencias a partir del evento empleando cebadores derivados de las secuencias proporcionadas en la presente, seguido por una secuenciación de ADN convencional del amplicón de PCR o del ADN clonado.

El amplicón producido mediante estos métodos puede detectarse mediante una pluralidad de técnicas. La electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio es un método muy conocido y habitual para detectar amplicones de ADN. Otro de estos métodos en el análisis de bits genéticos, en el que se diseña un oligonucleótido de ADN que se solapa con la secuencia de ADN genómico flanqueante adyacente y con la secuencia de ADN insertada. El oligonucleótido se inmoviliza en pocillos de una placa de micropocillos. Después de una PCR de la región de interés (empleando un cebador en la secuencia insertada y otro en la secuencia genómica flanqueante adyacente), un producto de la PCR monocatenario puede hibridarse con el oligonucleótido inmovilizado y actuar como molde para una reacción de extensión de una sola base empleando una ADN polimerasa y ddNTP marcados específicos para la siguiente base esperada. La lectura puede ser fluorescente o estar basada en ELISA. Una señal indica la presencia de la secuencia del inserto/flanqueante debido a una amplificación, hibridación y extensión de una sola base exitosas.

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 se solapa con la unión entre el ADN genómico adyacente y el ADN insertado. El oligonucleótido se hibrida con un producto de la PCR monocatenario procedente 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, sulfúrida, luciferasa, apirasa, adenosina-5'-fosfosulfato y luciferina. Se añaden dNTP individualmente y la incorporación produce una señal luminosa que se mide. Una señal luminosa indica la presencia de la secuencia flanqueante/del inserto del transgén debido a una amplificación, hibridación y extensión de una sola base o de múltiples bases exitosas.

La polarización fluorescente es otro método que puede utilizarse para detectar un amplicón de la presente invención. Según este método, se diseña un oligonucleótido que se solapa con la unión del ADN insertado y flanqueante genómico. El oligonucleótido se hibrida con un producto de la PCR monocatenario procedente 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 de modo fluorescente. La extensión de una sola base provoca la incorporación del ddNTP. La incorporación puede medirse como un cambio en la polarización empleando un fluorómetro. Un cambio en la polarización indica la presencia de la secuencia flanqueante/del inserto del transgén debido a una amplificación, hibridación y extensión de una sola base exitosas.

TAQMAN (PE Applied Biosystems, Foster City, Calif.) es un método para detectar y cuantificar la presencia de una secuencia de ADN. Brevemente, se diseña una sonda oligonucleotídica FRET que se solapa con la unión del ADN insertado y flanqueante genómico. La sonda FRET y los cebadores de la PCR (un cebador en la secuencia del ADN insertado y otro en la secuencia genómica flanqueante) se ciclan en presencia de una polimerasa termoestable y dNTP. La hibridación de la sonda FRET provoca la ruptura y la liberación del resto fluorescente, alejándolo del resto extintor sobre la sonda FRET. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia flanqueante/del inserto del transgén debido a una amplificación y una hibridación exitosas.

Se han descrito balizas moleculares para su uso en la detección de secuencias. Brevemente, se diseña una sonda oligonucleotídica FRET que se solapa con la unión del ADN insertado y flanqueante genómico. La estructura exclusiva de la sonda FRET hace que contenga una estructura secundaria que mantiene los restos fluorescentes y extintores en proximidad cercana. La sonda FRET y los cebadores de la PCR (un cebador en la secuencia del ADN insertado y otro en la secuencia genómica flanqueante) se ciclan en presencia de una polimerasa termoestable y dNTP. Tras haber realizado con éxito una amplificación con PCR, la hibridación de la sonda FRET con la secuencia diana provoca la eliminación de la estructura secundaria de la sonda y la separación espacial de los restos fluorescente y extintor. Se produce una señal fluorescente. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia flanqueante/del inserto del transgén debido a una amplificación y una hibridación exitosas.

Los siguientes ejemplos se incluyen para ilustrar procedimientos para practicar la invención y para demostrar ciertas realizaciones preferidas de la invención. A menos que se indique lo contrario, todos los porcentajes son en peso y todas las proporciones de mezcla de los disolventes son en volumen.

Ejemplo 1: Producción de la semilla depositada

La resistencia a insectos de marca WideStrike™ para el algodón es un rasgo transgénico desarrollado por Dow AgroSciences que proporciona una resistencia a insectos en la planta contra lepidópteros. Contiene dos genes de tolerancia a los insectos, *cry1Ac* y *cry1F*, que se derivan de *Bacillus thuringiensis* subespecie *kurstaki* y *Bacillus thuringiensis* subespecie *aizawai*, respectivamente. *Bacillus thuringiensis* (B.t.) es una bacteria del suelo gram-positiva común. En su estadio de formación de esporas produce varios cristales de proteínas insecticidas (conocidas como delta-endotoxinas) que incluyen *Cry1Ac* y *Cry1F*. Estas proteínas son tóxicas para ciertos insectos lepidópteros. En insectos susceptibles, se unen a receptores específicos presentes sobre las células epiteliales del

intestino medio, formando poros que alteran el equilibrio osmótico y finalmente provocan la lisis y muerte celular. Se ha demostrado que *Cry1Ac* y *Cry1F* no son tóxicos para seres humanos, ganado o insectos beneficiosos, que no tienen sitios de unión para la delta-endotoxina. Empleando dos delta-endotoxinas, en lugar de una, se proporciona mayor resistencia a insectos, porque las dos proteínas *Cry* proporcionan un mayor espectro de control que cualquiera de ellas por sí sola y presentan actividad diferenciada contra las plagas de lepidópteros contra las que son eficaces. De modo más importante, pueden ayudar a retrasar el desarrollo de insectos resistentes.

Los genes *cry1Ac* y *cry1F* en WideStrike se introducen empleando una transformación mediada por *Agrobacterium* en plantas de algodón GC-510 (*Gossypium hirsutum* L.) en dos eventos de transformación distintos, 3006-210-23 y 281-24-236. Después del cruzamiento en una variedad de algodón elitaria, estos eventos se combinan mediante cruzamiento convencional para producir un algodón que porta el rasgo de resistencia a los insectos WideStrike. WideStrike también contiene el gen *pat* de *Streptomyces viridochromogenes*, una bacteria del suelo aerobia común. El gen *pat* codifica la enzima fosfotricina acetil transferasa (PAT), que desintoxica el gufosinato amonio en un compuesto inactivo mediante acetilación. El gen *pat* se incluye para permitir la selección de las plantas de algodón transformadas.

Ejemplo 2: Ensayo de diagnóstico para el evento *Cry1F* del algodón 281-24-236

El ADN del evento *Cry1F* de 281-24-236 y del evento *Cry1Ac* de 3006-210-23 y el algodón no transgénico PCS355 se extrajeron de hojas de algodón empleando el kit Plant DNeasy de QIAGEN (n.º de catálogo 69181, Qiagen, Valencia, CA, EEUU). Se siguió el protocolo sugerido por el fabricante. Brevemente, se rompieron discos de hojas en un tampón precalentado suplementado con ARNasa empleando una esfera de carburo de wolframio (diámetro de 0,125 mm) y un molino mezclador Retsch MM3000. La mezcla se centrifugó a temperatura ambiente, y después el sobrenadante se capturó haciéndolo pasar a través de una placa DNeasy 96. El ADN se eluyó en un tampón de elución y se conservó congelado hasta su utilización.

El ADN extraído del tejido de hoja de algodón se empleó en una amplificación de ADN mediante PCR de las secuencias del inserto del transgén/genómica 5' en el evento *Cry1F* de 281-24-236 empleando el cebador 281-14 (SEQ ID NO:3, 5'TGTCGGCTGAAGGTAGGGAGG3') y el cebador 281-15 (SEQ ID NO:4, 5'CCGGACATGAAGCCATTTAC3'), y las secuencias del inserto del transgén/genómicas 3' flanqueantes empleando el cebador 281-9 (SEQ ID NO:6, 5'TCTCTAGAGAGGGGACGACC3') y el cebador 281-10 (SEQ ID NO:7, 5'CGAGCTGGAGAGACCGGTGAC3'). Se realizaron análisis de amplificación del ADN de la PCR empleando ADN genómico extraído del evento *Cry1F* del algodón 281-24-236 y la línea de algodón no transgénica PCS355. La reacción de amplificación para la secuencia genómica flanqueante 5' se realizó empleando el kit de PCR QIAGEN HotStarTaq (n.º de catálogo 203203 o 203205, QIAGEN, Valencia, Calif., EEUU) con una concentración final de 0,4 µM para el cebador 281-14 y el cebador 281-15 en un volumen de reacción de 50 µl. Las reacciones se realizaron empleando un GenAmp PCR System 9600 (Applied Biosystem, Foster City, CA) bajo las siguientes condiciones de ciclación: 1 ciclo a 95 °C durante 15 minutos; 35 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 57 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 60 segundos; 1 ciclo a 72 °C durante 10 minutos. La PCR para la secuencia genómica flanqueante 3' se realizó empleando el kit de PCR Takara ExTaq (n.º de catálogo RR001A, Panvera, Madison, WI) en un volumen de reacción de 50 µl que contiene una concentración final de 0,4 µM del cebador 281-9 y el cebador 281-10. Las reacciones se realizaron empleando un GenAmp PCR System 9600 (Applied Biosystem, Foster City, CA) bajo las siguientes condiciones de ciclación: 1 ciclo a 95 °C durante 5 minutos; 35 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 60 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 60 segundos; 1 ciclo a 72 °C durante 10 minutos. Los productos de la PCR se separaron utilizando una electroforesis en gel de agarosa al 1,0% a 100 V durante aproximadamente 1 hora y se visualizaron con tinción con bromuro de etidio.

Se determinó la secuencia de ADN producto de la PCR 5' y resultó una secuencia de 603 pares de bases nucleotídicas que representa la secuencia del inserto del transgén/genómica 5' del evento *Cry1F* del algodón 281-24-236, y se identificó como SEQ ID NO:5. Se determinó la secuencia de ADN producto de la PCR 3' y resultó una secuencia de 562 pares de bases nucleotídicas que representa la secuencia del inserto del transgén/genómica 3' del evento *Cry1F* del algodón 281-24-236, y se identificó como SEQ ID NO:8.

Las secuencias de unión del transgén/genómica, SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:8, son nuevas secuencias de ADN en el evento *Cry1F* de 281-24-236 que son diagnósticas para el evento *Cry1F* de la planta de algodón 281-24-236 y su progenie.

Ejemplo 3: Ensayo de diagnóstico para el evento *Cry1Ac* del algodón 3006-210-23

El ADN extraído del tejido de hoja de algodón se empleó en una amplificación de ADN mediante PCR de las secuencias del inserto del transgén/genómica 5' en el evento *Cry1Ac* de 3006-210-23 empleando el cebador 3006-20 (SEQ ID NO:9, 5'TTCCAACCTTTAACTATTATCCTGC3') y el cebador 3006-22 (SEQ ID NO:10, 5'GCTGCGGACATCTACATTTT3'), y las secuencias del inserto del transgén/genómicas 3' flanqueantes empleando el cebador 3006-9 (SEQ ID NO:12, 5'GACATGCAATGCTCATTATCTCTA3') y el cebador 3006-12 (SEQ ID NO:13, 5'AAGTCTCTGCCTTCTACCCTGG3'). Se realizaron análisis de amplificación del ADN de la PCR empleando ADN genómico extraído del evento *Cry1Ac* del algodón 3006-210-23 y la línea de algodón no transgénico PCS355. La reacción de amplificación para la secuencia genómica flanqueante 5' se realizó empleando el kit de PCR QIAGEN

HotStarTaq (n.º de catálogo 203203 o 203205, QIAGEN, Valencia, Calif., EEUU) con una concentración final de 0,4 µM para el cebador 3006-20 y el cebador 3006-22 en un volumen de reacción de 50 µl. Las reacciones se realizaron empleando un GenAmp PCR System 9600 (Applied Biosystem, Foster City, CA) bajo las siguientes condiciones de ciclación: 1 ciclo a 95 °C durante 15 minutos; 35 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 53 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 60 segundos; 1 ciclo a 72 °C durante 10 minutos. La PCR para la secuencia genómica flanqueante 3' se realizó empleando el kit de PCR QIAGEN HotStarTaq (n.º de catálogo 203203 o 203205, QIAGEN, Valencia, Calif., EEUU) en un volumen de reacción de 50 µl que contiene una concentración final de 0,4 µM del cebador 3006-9 y el cebador 3006-12. Las reacciones se realizaron empleando un GenAmp PCR System 9600 (Applied Biosystem, Foster City, CA) bajo las siguientes condiciones de ciclación: 1 ciclo a 95 °C durante 5 minutos; 30 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 56 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 60 segundos; 1 ciclo a 72 °C durante 10 minutos. Los productos de la PCR se separaron utilizando una electroforesis en gel de agarosa al 1,0% a 100 V durante aproximadamente 1 hora y se visualizaron con tinción con bromuro de etidio.

Se determinó la secuencia de ADN producto de la PCR5' y resultó una secuencia de 614 pares de bases nucleotídicas que representa la secuencia del inserto del transgén/genómica 5' del evento *Cry1Ac* del algodón 3006-210-23 (identificada en la presente como SEQ ID NO:11). Se determinó la secuencia de ADN producto de la PCR 3' y resultó una secuencia de 662 pares de bases nucleotídicas que representa la secuencia del inserto del transgén/genómica 3' del evento *Cry1Ac* del algodón 3006-210-23 (identificada en la presente como SEQ ID NO:14).

Las secuencias de unión del transgén/genómica, SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:14, son nuevas secuencias de ADN en el evento *Cry1Ac* de 3006-210-23 que son diagnósticas para el evento *Cry1Ac* de la planta de algodón 3006-210-23 y su progenie.

Ejemplo 4: Otros ensayos de diagnóstico

Se emplean parejas de cebadores para un evento de ADN para producir un amplicón diagnóstico para el evento *Cry1F* de 281-24-236 y el evento *Cry1Ac* de 3006-210-23. Estas parejas de cebadores para un evento incluyen, pero no se limitan a SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12 y SEQ ID NO:13. Cuando se emplean en un método de amplificación del ADN (PCR), estos cebadores producen un amplicón diagnóstico para el evento *Cry1F* de 281-24-236 y el evento *Cry1Ac* de 3006-210-23, y sus progenies. Además de estas parejas de cebadores, otros aspectos de la presente invención incluyen cualquier pareja de cebadores derivada del producto de amplicón de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11 y/o SEQ ID NO:14, que, en una reacción de amplificación de ADN, producen un amplicón diagnóstico para el evento *Cry1F* de 281-24-236, el evento *Cry1Ac* de 3006-210-23 y sus progenies. Cualquier modificación que implique el uso de cebadores de ADN para producir un amplicón diagnóstico para el evento *Cry1F* de 281-24-236, el evento *Cry1Ac* de 3006-210-23 y sus progenies está dentro del técnica normal, dadas las ventajas de la presente invención. El análisis de una muestra de tejido vegetal procedente del evento *Cry1F* de 281-24-236, el evento *Cry1Ac* de 3006-210-23 y sus progenies debería incluir un control de tejido positivo procedente de estos eventos, un control negativo procedente de una planta de algodón que no presente ninguno de estos eventos, y un control negativo que no contenga el molde de ADN de algodón. Los expertos en la técnica de los métodos de amplificación del ADN pueden obtener otras secuencias de cebadores de SEQ ID NO:1 y/o SEQ ID NO:2. Las condiciones optimizadas para la producción de un amplicón pueden diferir de los métodos descritos en los anteriores ejemplos. El uso de estas secuencias de cebadores de ADN con modificaciones en los métodos descritos en estos ejemplos está dentro del alcance de la invención. Los amplicones y cebadores derivados de SEQ ID NO:1 y/o SEQ ID NO:2 que son diagnósticos para el evento *Cry1F* de 281-24-236 y/o el evento *Cry1Ac* de 3006-210-23, y sus progenies, son aspectos de la invención. El ensayo para amplicones del evento *Cry1F* de 281-24-236, el evento *Cry1Ac* de 3006-210-23 y de sus progenies puede realizarse empleando un Stratagene Robocycler, MJ, Engine, o un termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient, o mediante métodos y aparatos conocidos por los expertos en la técnica.

Listado de secuencias

<110> Dow AgroSciences LLC

<120> Líneas de algodón transgénico *Cry1F* y *Cry1Ac* y su identificación específica de evento

<130> 502-7 T2

<140> 10 015 576.1

<141> 2004-10-13

<150> US 60/556,586

<151> 2004-03-26

<150> US 60/613,851

<151> 2004-09-27

<160> 16

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

5 <211> 15490

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Evento Cry1F inserto 281-24-236 y sus secuencias de borde

<400> 1

```

aagcttgctt aaaagtatca caagccatga tccttataaa aatgatattt gacactatgc      60
ttctttgcac attcttcact atgctttctc atttgagcaa tgggtgggatt tgctctcaaa      120
tttggtggcc ctatgtcagt attcaaaaat ttcataggt caaaggcttg aagataagcc      180
ttcattttta ccacccatat gtagtaaatt tcaccgatga atacaagagg tggagggtgg      240
gagaaactag atgaatacat tcttgcagaa aacgtccctc aaagatcaaa atggctctca      300
ataccaattc ttggtgtttt cagactaaga gagaaagcaa aacgagacaa tgaaccacaa      360
agatgaatta atttcaatac atttttttta atttcatttc aaacggttac aatatatacc      420
ttttgttttc caaacaactc aactgatcca actaacatct tggaaatagg aaaacttaac      480
ttgtacacaa actgattgtg aaatcaacac ctaaacacat caagtcatta ccaacttagt      540
ttattcctag ctaagtattt taacataagg attgaacaaa aggttaaacc aaaactttga      600
tttttttgct ctaggaagac agcttgactc tcatacataa gttcgcttta ttgttaatca      660
actcacactt tggctgtccg ttgatattgt ggcagttaaa atgttcacca atgtgcttag      720
acaatccgcc aagcctatcg tgtaaaaact ctttgcattg cagttcacct attgacagtc      780
cgccagtcct ttaatgtctc gactgtctac catgtgactt agagacggaa ttgtttgcca      840
tatgtgttcg ccaactagat tggtcaccat ttgtgttggt taccatgtgt gttcgctaatt      900
gcatgggttg ccatgtcgca aaacaaattt ttggatgggc caaaattgga attttttcat      960
ttgaccaaatt ataaaaaac gaattgaaca aattactttt agagggatta aaaattaaaa      1020
ttatactatt tatcgagggg agtcaaggct cctatcttct tcgcttcttc tattgttttag      1080

```

15

attaagacta	aaatttttaa	atttatagaa	attaaaattg	atgaaattaa	aatacaaaat	1140
taaatatata	attcagttag	gtttaacat	tttttaattg	tgcttagctt	taatgtttgg	1200
gatttggtta	ctttcagtcg	ttatgcagtt	atgctcagac	aaatttggtc	tctttctgtc	1260
ttatcaacta	ctcaaaatct	cagtatatgt	atgtcattta	atctcttcat	cgtagatgtt	1320
atattggtga	aaatggggcc	aagaaatcca	cattcaatga	ctttgaaaga	atatatattg	1380
ttagttgcac	attcccttat	tcaatcacag	ttgcttggtt	ctgagcttat	agaatcatga	1440
tatttgtaaa	tcttatataa	agtaagagta	tatggctaga	cagtctggcc	ctgtcggctg	1500
aaggtaggga	ggaattaatc	aatcacagtt	gcttggttct	gagtctatag	aatcatgaat	1560
tttaaattta	tggaatgcat	tttttcgaag	atattgtatg	cattaagtgt	aatttttagtt	1620
tcaatatgaa	atttgagatt	tatatatata	cttacataaa	accctccttt	actgaattag	1680
tgccatggat	aaaagaccaa	ttaagcaatc	cttccaacac	gtgcatgcac	tggattttca	1740
tcgcctcgtc	cattgttaaa	ttgatagggt	aataagaaca	attagttggc	tactgattat	1800
atggattctg	gggttaaaagt	atttaggttt	actgttacat	acatggagga	tctacatcta	1860
ttttcacttt	tgtttaatta	atttaagtta	gttttgatga	gtttaaggat	tgtactagcc	1920
aatagtagta	cataaaggag	atagagtacc	aaaacaaaga	aaaagccgaa	aggtgttaat	1980
gctaaattgt	aaaagaaagt	taaaataaga	gactcgaatt	ataatatgat	tctctggcgc	2040
actaattaag	ctactatata	ttgtcaatag	tattgtaaat	ggcttcatgt	ccgggaaatc	2100
tacatggatc	agcaatgagt	atgatggtca	atatggagaa	aaagaaagag	taattaccaa	2160
ttttttttca	attcaaaaat	gtagatgtcc	gcagcggtat	tataaaatga	aagtacattt	2220
tgataaaacg	acaaattacg	atccgtcgta	tttataggcg	aaagcaataa	acaaattatt	2280
ctaattcgga	aatctttatt	tcgacgtgtc	tacattcacg	tccaaatggg	ggccacttgg	2340
ctgcagtgca	gcgtgacccg	gtcgtgcccc	tctctagaga	taatgagcat	tgcattgtcta	2400
agttataaaa	aattaccaca	tatttttttt	gtcacacttg	tttgaagtgc	agttttatcta	2460
tctttataca	tatatttaaa	ctttactcta	cgaataatat	aatctatagt	actacaataa	2520
tatcagtgtt	ttagagaatc	atataaatga	acagttagac	atgggtctaaa	ggacaattga	2580
gtattttgac	aacaggactc	tacagtttta	tcttttttagt	gtgcatgtgt	tctccttttt	2640
tttgcaaata	gcttcaccta	tataataact	catccatttt	attagtacat	ccatttaggg	2700
tttaggggtta	atgggtttta	tagactaatt	tttttagtac	atctattttta	ttctattttta	2760
gcctctaaat	taagaaaact	aaaactctat	tttagttttt	ttatttaata	atttagatat	2820
aaaatagaat	aaaataaagt	gactaaaaat	taaacaaata	ccctttaaga	aattaaaaaa	2880
actaaggaaa	catttttctt	gtttcgagta	gataatgcca	gcctgttaaa	cgccgtcgac	2940
gagtctaacg	gacaccaacc	agcgaaccag	cagcgtcgcg	tcgggccaag	cgaagcagac	3000
ggcacggcat	ctctgtcgct	gcctctggac	ccctctcgag	agttccgctc	caccgttgga	3060
cttgctccgc	tgtcggcatc	cagaaattgc	gtggcggagc	ggcagacgtg	agccggcacg	3120

gcaggcggcc	tcctcctcct	ctcacggcac	cggcagctac	gggggattcc	ttccccaccg	3180
ctccttcgct	ttcccttcct	cgcccgccgt	aataaataga	caccccctcc	acaccctctt	3240
tccccaacct	cgtgttggtc	ggagcgcaca	cacacacaac	cagatctccc	ccaaatccac	3300
ccgtcggcac	ctccgcttca	aggtacgccg	ctcgtcctcc	ccccccccc	cctctctacc	3360
ttctctagat	cggcgttccg	gtccatggtt	agggcccggt	agttctactt	ctgttcatgt	3420
ttgtgttaga	tccgtgtttg	tgtagatcc	gtgctgctag	cgttcgtaga	cggatgagac	3480
ctgtacgtca	gacacgttct	gattgctaac	ttgccagtgt	ttctcttttg	ggaatcctgg	3540
gatggctcta	gccgttccgc	agacgggac	gatttcatga	ttttttttgt	ttcgttgcat	3600
agggtttggt	ttgccctttt	cctttatttc	aatatatgcc	gtgcacttgt	ttgtcgggtc	3660
atcttttcat	gctttttttt	gtcttggttg	tgatgatgtg	gtctggttgg	gcggtcggtc	3720
tagatcggag	tagaattctg	tttcaaacta	cctgggtggat	ttattaattt	tggtatctga	3780
tgtgtgtgcc	atacatattc	atagttacga	attgaagatg	atggatggaa	atatcgatct	3840
aggataggta	tacatgttga	tgcgggtttt	actgatgcat	atacagagat	gctttttgtt	3900
cgcttggttg	tgatgatgtg	gtgtggttgg	gcggtcggtc	attcggtcta	gatcggagta	3960
gaatactgtt	tcaaactacc	tggtgtattt	attaattttg	gaactgtatg	tgtgtgtcat	4020
acatcttcat	agttacgagt	ttaagatgga	tggaatatc	gatctaggat	aggtatacat	4080
gttgatgtgg	gttttactga	tgcataata	tgatggcata	tgcagcatct	attcatatgc	4140
tctaaccctg	agtacctatc	tattataata	aacaagtatg	ttttataatt	attttgatct	4200
tgatatactt	ggatgatggc	atatgcagca	gctatatgtg	gattttttta	gccctgcctt	4260
catacgctat	ttatttgctt	ggtactgttt	cttttgtcga	tgctcaccct	gttgtttggt	4320
gttacttctg	caggctcgaca	tgtctccgga	gaggagacca	gttgagatta	ggccagctac	4380
agcagctgat	atggccgcgg	tttgtgatat	cgtaaacat	tacattgaga	cgtctacagt	4440
gaactttagg	acagagccac	aaacaccaca	agagtggatt	gatgatctag	agaggttgca	4500
agatagatac	ccttggttgg	ttgctgaggt	tgaggggtgt	gtggctggta	ttgcttacgc	4560
tgggccctgg	aaggctagga	acgcttacga	ttggacagtt	gagagtactg	ttacgtgtc	4620
acataggcat	caaagggttg	gcctaggatc	cacattgtac	acacatttgc	ttaagtctat	4680
ggaggcgcaa	ggttttaagt	ctgtggttgc	tgttataggc	cttccaaacg	atccatctgt	4740
taggttgcat	gaggcttttg	gatacacagc	ccggggtaca	ttgcgcgcag	ctggatacaa	4800
gcatggtgga	tggcatgatg	ttggtttttg	gcaaagggat	tttgagtgtc	cagctcctcc	4860
aaggccagtt	aggccagtta	cccagatctg	agtcgacgga	tccccgacat	atgccccggt	4920
ttcgttgcca	ctaactagag	ttcttgagca	aatttgattg	gacctgatga	gatgatccaa	4980
cccaggagata	tagcaaagct	cgttcgtgca	gcaatggaac	ggccaaaccg	tgcttttgtc	5040
ccaagaatg	agggtctatg	catgaaggaa	tctacccgtt	gatgtccaac	agtcctcagg	5100
ttaatgtcta	tgtatcttaa	ataatgttgt	cggtattttg	taatctcata	tagattttca	5160

ctgtgcgacg	caaaaatatt	aaataaatat	tattattatc	tacgttttga	ttgagatatac	5220
atcaatatta	taataaaaat	atccattaaa	cacgatttga	tacaaatgac	agtcaataat	5280
ctgatttgaa	tattttattaa	ttgtaacgaa	ttacataaag	atcgaataga	aaatactgca	5340
ctgcaaatga	aaattaacac	atactaataa	atgctgcaaa	tatctttgcc	aagatcaagc	5400
ggagtggagg	cctcatatcc	ggtctcagtt	acaagcacgg	tatccccgaa	gcgcgctcca	5460
ccaatgccct	cgacatagat	gccgggctcg	acgctgagga	cattgcctac	cttgagcatg	5520
gtctcagcgc	cggctttaag	ctcaatccca	tcccaatctg	aatatcctat	cccgcgcccc	5580
gtccggtgta	agaacgggct	tgtccatcca	cctctgttgg	gaattctgat	cttggcggta	5640
cccggggatc	ctcattcctc	catcagaagt	aactccacgc	tatcaacaat	gaatgttcct	5700
tccgtttctc	caatctcaat	ccaaaccttg	tcggtttctg	gaaagtactc	taactctttg	5760
gtgacatagc	cggctggtaa	cgggtgtgtag	ttcccatagc	ctctgttaga	ttcgcaagga	5820
ttgtccctac	gtccatcggg	gtaagccttc	tcctcatagg	ctgatgcata	gtcagcgggt	5880
acagaagagt	tgctctcata	ggctccatcg	tatcctcgat	tgcgagaagt	gtaagtaccc	5940
tcatactcct	cttgagtcgc	agtgtagtca	ttgcaagtta	cgggtgtgtt	tgggtagact	6000
tcctcctcga	cgcagttgct	gaacttcagc	tcgtcgggtg	tgttctcaat	ctcgtgtatg	6060
gtgacgcaac	cttctccgta	tccttctttg	tacgcggtaa	cacgaagaat	gtagccacga	6120
ccaggacaga	cacgaacttc	ttgtgaaact	tctgcttccc	actcaggaac	aacaaggaca	6180
gagcgggtgat	tgttctgttc	ttctacatct	acgtgccctt	tcacattcca	gcaggatagg	6240
ccattgttga	agtcaccatt	cttgatgaca	ttcctcgcac	catacaagga	gaatgcagtg	6300
aagatgcgcc	cttctaactc	ttcaaagata	gcagcattga	cacccggaat	cacgctaagt	6360
tcaggaaggt	aagcttcccc	aatgctatga	acgcgtttgt	ctgcagcatg	aatcatagct	6420
atgttggtat	cagcttgagg	cctatcatat	tgagagttca	caaacagagc	gtcaacgctt	6480
tctttggctt	ctttgtacac	aatgtttgtt	ttccattcca	acttctctct	cttgccctc	6540
cacttcttct	cagccctctt	cactctagcg	agggtctctc	caacaagtgg	tttctcttct	6600
agaaactcca	gattgcctag	cctggcatgg	ccatcttgag	tcttgatctt	gaagatcacc	6660
cacacaccga	ggtcttcggt	caggctcggta	cagccaacgt	ctatgtccaa	ggagaagtgg	6720
tgtgagtgat	gggcacactt	gccgatggga	cttggggctg	aaagtggcca	gagtgaaccc	6780
gtcccaggca	cattgactgt	ctcatgtttg	gcgttgatc	tgatgaggta	gatctcaagg	6840
tcttgactgt	cctcgatgta	acctctcaac	tggtatcttg	tgtaggcttt	gagtttcgat	6900
tcattctatct	tctggtacag	gtatgttgga	tagcactcat	caaaggtagc	caagagcgta	6960
acatagtctt	ccttgaacac	atcatcacct	ccttgaatgg	tgatgtccgt	acttcccctc	7020
catccacgat	ctagttgcct	gttgatcccc	cgaaagtggg	gatcttgaag	caagttccgc	7080
tcactactaa	gtcgttagc	atgtttgacc	ttctcggaca	actccttctt	ctcatccaaa	7140
cagaactcat	cagagaggca	ctcaacaagg	ttggaaacgc	gatcgatgtg	atagtcagtc	7200

acatctgtct	tgagcccaat	ctgattggac	gaagtgaaca	gagcattcac	cgccttctgt	7260
gctctttcca	agtcagactc	tgccctgagt	gtggcagtaa	ctggaatcaa	ctcaaacctg	7320
tcaatgtaca	cttcgttgcc	tgaactgaag	gtatcagcac	ctactgtgaa	actgctctgg	7380
ctcattggaa	aggtgaacgc	ggtgttgata	gtggcgtagg	agaaagattg	gaatgtaagt	7440
ggatcaccgg	tatccattgt	cttgttgaac	tgaccagcaa	agatccgttc	acctgcaacc	7500
gtaacgtaga	ttcttagatt	ggtagtagag	gcatagcgta	tcctggcacg	atacctttgg	7560
ggaagttgcc	cattgatgtt	gacaatggtg	tacgcgaatg	gtcctccact	agtgcgtcga	7620
agaatgtctc	ctcccgtgaa	ccccggccct	cttacaactg	tagttcctga	ctgaagtgtg	7680
tgtgccttca	ccaagggaa	ctgagtgatt	ctctctggat	caatggtgtt	tgtgggggta	7740
gcgctacgat	gcgtccaaga	gaacattggt	gctctccatg	agtcggaaac	tgagatctca	7800
cctggccagc	gcacaaaggt	aacatgattc	agcacatggg	agtagtcatt	ccaaggtgcg	7860
ccgctgttgt	cttgagggtg	tatctcatct	agagagtcaa	tggtcccggg	gttcctgaat	7920
gtgcggtgtg	gattcgtacc	agtttgttga	aaggccactc	ccctaagacc	gagtacatag	7980
tgaggattgc	caaagcctcc	tcggacgaag	acaggatctg	acaaggtccg	atagaaagga	8040
cgtggatctt	catctgcaat	ccagatggcg	ccccgggat	tgaagacccc	gtaactagga	8100
aagttgatac	gattgccagc	cgtgttgctg	gagctaacta	agtgtcctcc	ccacacagtt	8160
tgggatctaa	cagtctctgc	agtcacaaac	aaagagttca	tgaagtccat	gagatggggg	8220
ggtctgactc	caaactcagc	cctgttgaaa	ccattgggta	tgttcgcaga	aactggagag	8280
tcttcaatga	ctgaactggt	gtagatctcc	cttgtaagtt	gggatgacgt	ttgaatcgga	8340
taggtacgaa	catcgtagtt	cggaaagaga	gcaactatgt	ctaacacagt	aagtgtgaag	8400
tctctcctga	actgattgaa	cctggcccat	tggcgagtgt	tagtacctct	caggttctcc	8460
aatccctgat	tgtaggtatc	caaacaatgt	ttcgtgtatc	gatgaatcag	attgatgagt	8520
ctgtttagt	gattgttgac	agtagctatg	tccagtcccc	aaccttgccc	aaacgacaca	8580
gcgtcgcgca	gtagtgacaa	gtgcaggtta	gcagcttgaa	catagaccga	gagaagaggg	8640
atctcgaagc	tggtaaaggt	gaagttgttg	atggctgtga	tcaaagcatc	atctgtgtta	8700
gcaaagcgta	tacgcacatc	ttctctcagt	tgggcattgt	taggattggc	ttccactct	8760
cttagtgctt	caatgtagat	ctcatagctg	tctgctaagc	cacgaagggt	agtgatggcc	8820
cgattccttt	ccaagggtctc	aatcctttgt	tcaatcaact	gttcaatctg	gagaagaaag	8880
aggctccaat	cagatggagt	gatgaagccc	cagatgaggt	cgaagaggcc	aaacgcaact	8940
cccacacctg	gaacaaactc	agacaacagg	agacgtgtaa	gggacaggga	gatgtctaac	9000
ggcaatctgc	cagtcgacct	ctttctgttg	agaatctcta	cttcaggatt	gttgaggcag	9060
ttgtagggga	cgcactgatt	ctgtatgttg	ttctccattg	ttggatccgc	gatttggtgt	9120
atcgagattg	gttatgaaat	tcagatgcta	gtgtaatgta	ttggtaattt	gggaagatat	9180
aataggaagc	aaggctattt	atccatttct	gaaaaggcga	aatggcgta	ccgcgagcgt	9240

cacgctctag	tcgaccatgt	acgtaagcgc	ttacgttttt	ggtggacccc	ctcgaccatg	9300
tacgtaagcg	cttacgtttt	tggtggaccc	cctcgaccat	gtacgtaagc	gcttacgttt	9360
ttggtggacc	ccctcgacca	tgtacgtaag	cgcttacgtt	tttgggtggac	cccctcgacg	9420
gatccccct	cgaccctaga	cgtatctatt	caaaagtcgt	taatggctgc	ggatcaagaa	9480
aaagttggaa	tagaaacaga	atacccgcg	aattcaggcc	cggttgccat	gtcctacacg	9540
ccgaaataaa	cgaccaaatt	agtagaaaaa	taaaaactga	ctcggatact	tacgtcacgt	9600
cttgcgcact	gatttgaaaa	atctcaatat	aaacaaagac	ggccacaaga	aaaaaccaa	9660
acaccgatat	tcattaatct	tatctagttt	ctcaaaaaaa	ttcatatctt	ccacaccctc	9720
gagatctaga	tatcgatgaa	ttttggcgcg	ccttaattaa	ggaattcctc	gagtttaaac	9780
ggatccctga	aagcgacgtt	ggatgttaac	atctgcaa	at	at	9840
gtacgtaagc	gcttacgttt	ttggtggacc	cttgaggaaa	ctggttagctg	ttgtgggcct	9900
gtggtctcaa	gatggatcat	taatttccac	cttcacctac	gatggggggc	atcgaccgg	9960
tgagtaatat	tgtacggcta	agagcgaatt	tggcctgtag	acctcaattg	cgagctttct	10020
aatttcaaac	tattcgagct	ttctaattga	atatatccag	ggcccagcgt	aagcaatacc	10080
agccacaaca	ccctcaacct	cagcaaccaa	ccaaggtat	ctatcttgca	acctctctag	10140
atcatcaatc	cactcttggtg	gtgtttgtgg	ctctgtccta	aagttcactg	tagacgtctc	10200
aatgtaatgg	ttaacgatat	cacaaaccgc	ggccatatca	gctgctgtag	ctggccta	10260
ctcaactggt	ctcctctccg	gagacatgtc	gacctgcaga	agtaacacca	aacaacagg	10320
tgagcatcga	caaaagaaac	agtaccaagc	aaataaatag	cgtatgaagg	cagggtctaaa	10380
aaaatccaca	tatagctgct	gcatatgcc	tcatccaagt	atatcaagat	caaaataatt	10440
ataaaacata	cttggtttatt	ataatagata	ggtagtcaag	gttagagcat	atgaatagat	10500
gctgcatatg	ccatcatgta	tatgcatcag	taaaaccac	atcaacatgt	atacctatcc	10560
tagatcgata	tttccatcca	tcttaaaactc	gtaactatga	agatgtatga	cacacacata	10620
cagttccaaa	attaataaat	acaccaggta	gtttgaaaca	gtattctact	ccgatctaga	10680
acgaatgaac	gaccgccc	ccacaccaca	tcatcacaac	caagcgaaca	aaaagcatct	10740
ctgtatatgc	atcagtaaaa	cccgcataca	catgtatacc	tatcctagat	cgatatttcc	10800
atccatcatc	ttcaattcgt	aactatgaat	atgtatggca	cacacataca	gatccaaaat	10860
taataaatcc	accaggtagt	ttgaaacaga	attctactcc	gatctagaac	gaccgccc	10920
ccagaccaca	tcatcacaac	caagacaaaa	aaaagcatga	aaagatgacc	cgacaaacaa	10980
gtgcacggca	tatattgaaa	taaaggaaaa	gggcaaacca	aaccctatgc	aacgaaacaa	11040
aaaaaatcat	gaaatcgatc	ccgtctgcgg	aacggctaga	gccatcccag	gattccccc	11100
agagaaacac	tggcaagtta	gcaatcagaa	cgtgtctgac	gtacagggtcg	catccgtgta	11160
cgaacgctag	cagcacggat	ctaacacaaa	cacggatcta	acacaaacat	gaacagaagt	11220
agaactaccg	ggccctaacc	atggaccgga	acgccgatct	agagaaggta	gagagggggg	11280

gggggggggg aggacgagcg gctgtacctt gaagcggagg tgccgacggg tggatttggg 11340
 ggagatcttg ttgtgtgtgt gtgcgctccg aacaacacga gggtggggaa agaggggtgtg 11400
 gagggggtgt ctatttatta cggcgggcca ggaagggaaa gcgaaggagc ggtgggaaaag 11460
 gaatcccccg tagctgccgg tgccgtgaga ggaggaggag gccgcctgcc gtgccggctc 11520
 acgtctgccg ctccgccacg caatttcttg atgccgacag cggagcaagt ccaacgggtg 11580
 agcggaaactc tcgagagggg tccagaggca gcgacagaga tgccgtgccg tctgcttcgc 11640
 ttggcccgac gcgacgctgc tggttcgctg gttggtgtcc gttagactcg tcgacggcgt 11700
 ttaacagggt ggcattatct actcgaaaca agaaaaatgt ttccttagtt tttttaattt 11760
 cttaaagggt atttgcttaa tttttagtca ctttatttta ttctatttta tatctaaatt 11820
 attaaataaa aaaactaaaa tagagtttta gttttcttaa tttagaggct aaaatagaat 11880
 aaaatagatg tactaaaaaa attagtctat aaaaaccatt aaccctaaac cctaaatgga 11940
 tgtactaata aaatggatga agtattatat aggtgaagct atttgcaaaa aaaaaggaga 12000
 acacatgcac actaaaaaga taaaactgta gagtcctgtt gtcaaaatac tcaattgtcc 12060
 tttagaccat gtctaactgt tcatttatat gattctctaa aacactgata ttattgtagt 12120
 actatagatt atattattcg tagagtaaag tttaaataa tgtataaaga tagataaact 12180
 gcacttcaaa caagtgtgac aaaaaaata tgtggtaatt tttataact tagagatgca 12240
 atgctcatta tctctagaga ggggcacgac cgggtcacgc tgcactgcag ccaagtggcc 12300
 cccatttgga cgtgaatgta gacacgtcga aataaagatt tccgaattag aataatttgc 12360
 ttattgcttt cgcctataaa tacgacggat cgtaatttgt cgctttatca gaatgtactt 12420
 tcattttata ataacgctgc ggacatctac atttttgaat tgaaaaaaaa ttggttaatta 12480
 ctctttcttt ttctccatat tgaccatcat actcattgct gatccatgta gatttccctt 12540
 acttgctccc ctctaactctg actttattaa cccaaagcaa ttgcttattt gttccccacg 12600
 cccacaaagc ccagcattgt ccctaaggta ttaatttgtt gttcgattct tgttcttgaa 12660
 cccatttgga gaatgcaaca agggttttca tgtcagcacg gtaatggttc tgtgtaaatt 12720
 ccagtagtgc tgcccaagta aagtctgggt atttcctcga atttgcgga ttaactaagc 12780
 tagctgctgg tgtcaccggt ctctccagct cgggacatag aaagaatgca agtgattttc 12840
 tcaccgtttc agtattcact actgcccag cagctcttgt agataccgtt tgtcaaagcc 12900
 tgtattcaaa caccacaacc tcattttcgt taaaattttt tgtatatacg tatgcatata 12960
 tgttcagaat gtttattacc atgaatgtat cgcaatgttg acaacgaaag ctcctgggat 13020
 atgagcaacg gagtgccact tttcatcggc aaacacttga aggcctccaa cttgatcctg 13080
 atgaaggatt gtcaaggaag tgggatcggg gtggggaccg gttcccaggg tcaactcagg 13140
 cttttcgcat ggagagtagt gattcagtct caggattgaa tcattttgtt cgaaaaagtc 13200
 tttgaagtag gcttgggtcaa gccctagact tatccctagc agccccatta tctctttgga 13260
 aaccttggtc ctggcttcac aatattcctg gtaaagcctc ctgtcaagta cgaaaagcaa 13320

aatcgagtgtagattccta tcctatggta aaacttgctg caacattcta caaattaaca 13380
taggtataa aagagaaacg caaagtcaaa aaaggccatc cagttataat gtgtattttt 13440
tgtttttagga gaaggggtat ttaagcaatc catgttgaat ggacttaggg ttcggtcaat 13500
gcaaggaatg atgtctattg aatttgctac cccatctctt tcaaacctaa aaaagatgta 13560
tatccaattg tcaactattg tacaaggctt gaaatacaca tgggggttaac aaatacgctg 13620
aaactgcaac atgtattttt tgcatttttg agactaaatc ttgacgtaaa aataagctga 13680
tcatctcgta tattgactga atgcaaatta gcatttctcc tatttaatta ggaatggaag 13740
ggtgagaaga atttatttac ccaaaatctc taaaatcttc agtgccgaaa agacagtgtt 13800
tctttccatg gcaacttgga ggaaaacctg ccaacgaaac tgcttgcata cccatagctt 13860
tctcctactt ttctcttagc cttttgcttc tcagagagtt gcaggctgaa gaagcggctc 13920
atgtactgat gagcttaca ccaaaaaaaa cccatgcttc ttgcatgcct cattcaccgc 13980
ccctgccact ttgatacag caagagagcc cccaagcaag aaagctcca agtcaatggc 14040
ttgaattaca agttccgggt catccaggca tggcttatcg tcgtcaggcc atatgaactg 14100
agaggtata ttggattcag atccaaggat tgatgcatcg aaagctaaag ggcgatgctc 14160
attctttgcg acagcagcag ttggcggaag catcggttc tcttgaatga cagaaactat 14220
tggcagacaa tgtaccattt tctgtttctt gttttaggtg gtcggagagg aaaaagaaga 14280
caagatatag aggagcaaaa ctaagagggt ttaataaga gaagtagaaa accaataata 14340
tttggaaatc aattgtttgt ttgaaactgt tgcctcattt cccctttaat ttgtgttggtg 14400
ttggcagctt aacgcttcct ttgggttcga ttgcaatata gtgcgttgaa atttttacct 14460
tgattttcaa tctactaca ccacagtgc ttgcttggtt gtttggataa tttttacctt 14520
gattttcaat ctactacac cacagtgc ttgcttggtt tttggataat ttttacctg 14580
attttcaatc tcaactacac acagtgc ttgcttggtt ttggatatct tggtttccag 14640
cacagtgaga caagcctgct gcactcgaca accttatctt cactggtgct aaaagctcca 14700
gtcagctcta gctagggcaa taggtatttt tggatgacaa aaatacccat actttaattt 14760
attattttac cattttatcc ttagatgtta aactaatttc tttcccaatc ttatttgttt 14820
tcagatttgg gaataaaaca atagtttctc ccttggttct gctggttctt cccttggtct 14880
tgctggttct tccctctttt ttgctttgt tcttggtgtt gggagcttag gatattcttt 14940
ttcttcaatc agactaaca gttagagata tcttggtttt tttcacttta ttttctcatg 15000
ctcaacattt accctttttc tcaattaaca ggggaagtct acattaatta gtgcactctc 15060
agatagtaat ctgtatagt atgcaatgta tatatatctt ttaaacagt ttttctcga 15120
agttaaattc tttgttaaaa gtaaaaggct ggatgttttt acctaattgg aggtaatgtc 15180
tttgtgtaga ttgtttgcaa cattggatgg ttgattaaaa agtgttggtt ttccttcaag 15240
gtgagatgg ttgctgtcac tcaactattt tattgttgtt attgttattg cttttccatt 15300
gaatagcctg gttctaaatg atatacttac cttatcccat aggcagcaac attttatctt 15360
ttgatctttg gacctatcat ttagcatgct ttacactcta tttagtaata ttattactaa 15420
ctataatttt aagtcataca caatgaaatt acctaaacat ctaaactcaa aaaattataa 15480
cttaaagctt 15490

- 5 <210> 2
<211> 9382
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Evento Cry1Ac inserto 3006-210-23 y sus secuencias de borde

5 <220>
<221> característica_misc
<222> (556)..(556)
<223> n es a, c, g, o t

10 <400> 2

```

accaattatt atcgtctttt ttaattattc caacctttaa ctattatcct gccttaaaat   60
tcgaatacat ttattatcta taaactatcc gaatattatt atctaaatcc taattaaata   120
ctatttttta tcgagtattc gtatccgcca aggaaatcca tctccaaatt ttcaattatt   180
tttcagatat ctaaatctgt aaaatttcaa attcaagtac gttacaattc ttataaata   240
atccaaatta taaatatttt ataactatta attcataaat taaaatttat tattcaaata   300
ttcgaataat ctatttttaa gacgtaaagt attacatcga agggttactt tcaaagggtta   360
gtgtattttc atttcaatta ttcagaacgt tgtcgttttg ttccggtcat agaaaagggc   420
tctggaagag aagaaaatga cttgactttt caatttcacg ctcacccact cgtttcaatt   480
actgtttact aaaaaataa taaaataaaa tattaacaat gcattgagta tgatgtccgg   540
gaaatctaca tggatnagca atgagtatga tggatcaatg ggagaaaaag aaagagtaat   600
taccaatttt ttttcaattc aaaaatgtag atgtccgcag cgttattata aaatgaaagt   660
acattttgat aaaacgacaa attacgatcc gtcgtattta taggcgaaag caataaacia   720
attattctaa ttcggaaatc tttatttcga cgtgtctaca ttcacgtcca aatggggggc   780
acttggtctg agccaagctt tcgagagctc gagatccccg acatatgccc cggtttcggt   840
gcgactaaca tgagttcttg gacaaatttg attggacctg atgagatgat ccaacccgag   900
gatatagcaa agctcggttc tgcagcaatg gaacggccaa accgtgcttt tgccccaaag   960
aatgaggtgc tatgcatgaa ggaatctacc cgttgatgtc caacagtctc agggttaatg  1020
tctatgtatc ttaaataatg ttgtcggtat tttgtaatct catatagatt ttcactgtgc  1080
gacgcaaaaa tattaaataa atattattat tatctacggt ttgattgaga tatctagatc  1140
tcgaggtgtg gaagatatga atttttttga gaaactagat aagattaatg aatatcggtg  1200
ttttggtttt ttcttgtggc cgtctttggt tatattgaga tttttcaaat cagtgcgcaa  1260
gacgtgacgt aagtatccga gtcagttttt atttttctac taatttggtc gtttatttcg  1320
gcgtgtagga catggcaacc gggcctgaat ttcgcgggta ttctgtttct attccaactt  1380

```

tttcttgatc	cgagccatt	aacgactttt	gaatagatac	gtctagggtc	gaggggggat	1440	
ccgtcgaggg	ggtccaccaa	aaacgtaagc	gcttacgtac	atggtcgagg	gggtccacca	1500	
aaaacgtaag	cgcttacgta	catggtcgag	ggggtccacc	aaaaacgtaa	gcgcttacgt	1560	
acatggtcga	gggggtccac	caaaaacgta	agcgcttacg	tacatggtcg	actagagcgt	1620	
gacgctcgcg	gtgacgccat	ttcgcctttt	cagaaatgga	taaatagcct	tgcttcctat	1680	
tatatcttcc	caaattacca	atacattaca	ctagcatctg	aatttcataa	ccaatctcga	1740	
tacaccaa	at	cgcgatccg	tcgacctgca	ggtcgacatg	tctccggaga	ggagaccagt	1800
tgagattagg	ccagctacag	cagctgatat	ggccgcggtt	tgtgatatcg	ttaaccatta	1860	
cattgagacg	tctacagtga	actttaggac	agagccacaa	acaccacaag	agtggattga	1920	
tgatctagag	aggttgcaag	atagataccc	ttggttggtt	gctgaggttg	aggggtgttg	1980	
ggctggtatt	gcttacgctg	ggccctggaa	ggctaggaac	gcttacgatt	ggacagttga	2040	
gagtactggt	tacgtgtcac	atagggcatca	aaggttgggc	ctaggatcca	cattgtacac	2100	
acatttgctt	aagtctatgg	aggcgcaagg	ttttaagtct	gtggttgctg	ttataggcct	2160	
tccaaacgat	ccatctgtta	ggttgcatga	ggctttggga	tacacagccc	gggttacatt	2220	
gcgcgcagct	ggatacaagc	atggtggatg	gcatgatgtt	ggtttttggc	aaagggattt	2280	
tgagttgcca	gctcctcaa	ggccagttag	gccagttacc	cagatctgag	tcgacggatc	2340	
cccgaatat	gccccggtt	cgttgcgact	aacatgagtt	cttggacaaa	tttgattgga	2400	
cctgatgaga	tgatccaacc	cgaggatata	gcaaagctcg	tctgtgcagc	aatggaacgg	2460	
ccaaaccgtg	cttttgtccc	caagaatgag	gtgctatgca	tgaaggaatc	tacccgttga	2520	
tgtccaacag	tctcagggtt	aatgtctatg	tatcttaa	aatgttgctg	gtattttgta	2580	
atctcatata	gattttcact	gtgcgacgca	aaaatattaa	ataaatatta	ttattatcta	2640	
cgttttgatt	gagatatcat	caatattata	ataaaaaat	ccattaaaca	cgatttgata	2700	
caaatgacag	tcaataatct	gatttgata	tttattaatt	gtaacgaatt	acataaagat	2760	
cgaatagaaa	atactgcact	gcaaatgaaa	attaacacat	actaataaat	gcgtcaaata	2820	
tctttgcca	gatcaagcgg	agtgagggcc	tcatatccgg	tctcagttac	aagcacggta	2880	
tccccgaagc	gcgctccacc	aatgccctcg	acatagatgc	cgggctcgac	gctgaggaca	2940	
ttgcctacct	tgagcatggt	ctcagcgccg	gctttaagct	caatcccatc	ccaatctgaa	3000	
tatcctatcc	cgcgcccagt	ccggtgtaag	aacgggtctg	tccatccacc	tctgttgggga	3060	
attctgatct	tggcgcgcat	gcggatcctc	attcctccat	cagaagtaac	tccacgctat	3120	
caacaatgaa	tgttccttcc	gtttctccaa	tctcaatcca	aaccttgctg	gtttctggaa	3180	
agtactctaa	ctctttggtg	acatagccgg	ctggtaacgg	tgtgtagtcc	ccatagcctc	3240	
tgttagattc	gcaaggattg	tccctacgtc	catcggtgta	agccttctcc	tcataggctg	3300	
atgcatagtc	agcgggtaca	gaagagttgc	tctcataggc	tccatcgat	cctcgattgc	3360	
gagaagtgta	agtaccctca	tactcctctt	gagtcgcagt	gtagtcattg	caagttacgg	3420	

tggtgtttgg	gtagacttcc	tcctcgacgc	agttgctgaa	cttcagctcg	tcggtgttgt	3480
tctcaatctc	gtgtatggtg	acgcaacctt	ctccgtatcc	ttctttgtac	gcggtaacac	3540
gaagaatgta	gccacgacca	ggacagacac	gaacttcttg	tgaaacttct	gcttcccact	3600
caggaacaac	aaggacagag	cggtgattgt	tctgttcttc	tacatctacg	tgccctttca	3660
cattccagca	ggataggcca	ttgttgaagt	caccattctt	gatgacattc	ctcgcatcat	3720
acaaggagaa	tgcaagtgaag	atgcgccctt	ctaactcttc	aaagatagca	gcattgacac	3780
ccggaatcac	gctaagttca	ggaaggtaag	cttcccgaat	gctatgaacg	cgtttgtctg	3840
cagcatgaat	catagctatg	ttggtatcag	cttggagcct	atcatactga	gagttcacia	3900
acagagcgtc	aacgctttct	ttggcttctt	tgtacacaat	gtttgtttcc	cattccaact	3960
tctctctctt	gtccctccac	ttcttctcag	ccctcttcac	tctagcgagg	gcttctccaa	4020
caagtggttt	ctcttctaga	aactccagat	tgcttagcct	ggcatggcca	tcttgagtct	4080
tgatcttgaa	gatcaccac	acaccgaggt	cttcgttcag	gtcggtagag	ccaacgtcta	4140
tgtccaagga	gaagtgggtg	gagtgatggg	cacacttgcc	gatgggactt	ggggctgaaa	4200
gtggccagag	tgaacccgtc	ccaggcacat	tgactgtctc	atgtttggcg	ttgtatctga	4260
tgaggtagat	ctcaaggctt	tgactgtcct	cgatgtaacc	tctcaactgg	tatcttgtgt	4320
aggctttgag	tttcgattca	tctatcttct	ggtacaggta	tggttgatag	cactcatcaa	4380
aggtacccaa	gagcgtaaca	tagttctcct	tgaacacatc	atcacctcct	tgaatgggtga	4440
tgtccgtact	tccctcccat	ccacgatcta	gttgccgtgt	gatcccgcca	aagttgggat	4500
cttgaagcaa	gttccgctca	tactaagtc	gcttagcatg	tttgaccttc	tcggacaact	4560
ccttcttctc	atccaacag	aactcatcag	agaggcactc	aacaagggtg	gaaacgcgat	4620
cgatgtgata	gtcagtcaca	tctgtcttga	gccaatctg	attggacgaa	gtgaacagag	4680
cattcaccgc	cttctgtgct	ctttccaagt	cagactctgc	ctcgagcggt	gcagtaacgg	4740
gaatgaattc	gaagcggctg	attatcactc	cggcggttcc	ggagaaattt	ctaacacctta	4800
ctatgttacc	tagggaagag	gtgaaggcat	tggcactttc	gaagtaaccg	aaatcgctag	4860
attggagatt	atccaaggat	gtagctgtcg	ctgggtactgt	attggaaaag	atggaggaat	4920
tacccaatt	gacgttgagg	tgaatagggg	taacagaggc	ataccttaca	cgaacacgat	4980
atctggtaga	tgtcgatggg	aagtgaatgg	gcacttcaat	atacctcta	ttctggatgt	5040
tggtgccgga	agaattcagc	ctaaccaagt	cgcctccagt	gaatcctggg	cctgaaatga	5100
cagaaccatt	aaagagaaa	ttccccttga	cagctgggat	ctgagtaatg	ctatcggatg	5160
caattatggt	gttaaactca	gcactacgat	gtatccaaga	gaacatcgga	gctctgatga	5220
tactaacgct	gctattacta	aagcctgaac	ggaacatgga	cacatggcta	aggcgatggc	5280
taaacccttg	cctaggtgga	acgttgttgt	tctgtggagg	gatctcatcc	aagctatcaa	5340
ctgttccgct	ctttctgtag	acagcgggat	gcagatttga	ggaggttcca	taggcaaatt	5400
ctgtcccgtc	aagcacagac	aattgttgat	tggtgatgcc	gatgttgaaa	ggtctcctat	5460

atagagtgtct	ggacaagggtt	ctatacacgc	cctgaccgag	ttgagcaaca	atacgttggt	5520
gtggagctgc	attgcccata	gtcccgtaaa	gtgggaaagt	gaattctggt	ccagagaacc	5580
caacgggtga	tgccatgac	tgatgccctg	accagtagta	ataaccgcgg	tgcgcatcgg	5640
tgtagatcgt	gatactgttc	aatatgtcca	tcaggtgtgg	agacctgatg	cttctctcta	5700
tgccctgagc	cgagcctcga	aagctaccgt	cgaagttctc	gaggactggg	tttgtgtaga	5760
tttcccgggt	caattgtgac	acagtacgga	ttgggtagcg	cctagagtcg	tagttgggaa	5820
agagagcgac	aatgtctagg	acagtttagt	tcaactctcg	cctgaactgg	ttgtacctga	5880
cccaatctct	agaatccggt	ccccagacac	gttcgagacc	cgtgttgtag	cagcgaacag	5940
cataatcggg	atagttgcca	ataagcctag	tcagatcatt	ataacgacta	ttgatagttg	6000
cggcatcaaa	gccccaccgt	tgtccgaaca	cggagacatc	gcggagcacc	gacaagtgc	6060
ggttggcagc	ctgcacgtac	acggataaaa	gaggaaactg	gtaattctga	acggcgaaga	6120
gcggaattgc	ggtcgtcagc	gcgctgttca	tgtcattgaa	ttgaatgcgc	atctcctctc	6180
ttaaggcagg	attggtcggg	tctgcttccc	actctcgaaa	agattctgcg	taaatctggt	6240
aaaggttgct	gaggccttct	aaccttgaga	tggcttggtt	cctagcgaat	tcttctattc	6300
tttggttaat	taactgtctt	atctgtacaa	gaaaggcgct	ccattgagag	ggaccaaga	6360
ttcccaaat	gatatcgaca	agtccaagca	cgaatccagc	accgggcacg	aactctgaca	6420
aaaggaattg	ggtaaagtgc	aacgagatgt	cgataggtgt	gtaaccagtc	tcaatccggt	6480
ctccaccag	cacctcaacc	tcagggttgc	tcaggcagtt	gtaagggaatg	cactcgttga	6540
tgttgggatt	gttgtccatt	gttggatcct	ctagagtcga	cctgcagaag	taacacaaa	6600
caacaggggtg	agcatcgaca	aaagaaacag	taccaagcaa	ataaatagcg	tatgaaggca	6660
gggctaataa	aatccacata	tagctgtctg	atatgccatc	atccaagtat	atcaagatca	6720
aaataattat	aaaacatact	tgtttattat	aatagatagg	tactcaaggt	tagagcatat	6780
gaatagatgc	tgcatatgcc	atcatgtata	tgcacagta	aaaccacat	caacatgtat	6840
acctatccta	gatcgatatt	tccatccatc	ttaaactcgt	aactatgaag	atgtatgaca	6900
cacacatata	gttccaaaat	taataaatac	accaggtagt	ttgaaacagt	attctactcc	6960
gatctagaac	gaatgaacga	ccgccaacc	acaccacatc	atcacaacca	agcgaacaaa	7020
aagcatctct	gtatatgcat	cagtaaaacc	cgcatcaaca	tgtataccta	tcctagatcg	7080
atatttccat	ccatcatctt	caattcgtaa	ctatgaatat	gtatggcaca	cacatacaga	7140
tccaaaatta	ataaatccac	caggtagttt	gaaacagaat	tctactccga	tctagaacga	7200
ccgccaacc	agaccacatc	atcacaacca	agacaaaaaa	aagcatgaaa	agatgacccg	7260
acaaacaagt	gcacggcata	tattgaaata	aaggaaaagg	gcaaaccaaa	ccctatgcaa	7320
cgaacaaaaa	aaaatcatga	aatcgatccc	gtctgcggaa	cggctagagc	catcccagga	7380
ttcccaaaag	agaaacactg	gcaagttagc	aatcagaacg	tgtctgacgt	acaggctcga	7440
tccgtgtacg	aacgctagca	gcacggatct	aacacaaaac	cggatctaac	acaaacatga	7500

acagaagtag aactaccggg ccctaaccat ggaccggaac gccgatctag agaaggtaga 7560
gagggggggg gggggaggac gagcggcgta ccttgaagcg gaggtgccga cgggtggatt 7620
tgggggagat ctggttgtgt gtgtgtgcgc tccgaacaac acgaggttgg ggaaagaggg 7680
tgtggagggg gtgtctatctt attacggcgg gcgaggaagg gaaagcgaag gagcgggtgg 7740
aaaggaatcc cccgtagctg ccggtgccgt gagaggagga ggaggccgcc tgccgtgccg 7800
gctcacgtct gccgctccgc cacgcaattt ctggatgccg acagcggagc aagtccaacg 7860
gtggagcggg actctcgaga ggggtccaga ggcagcgaca gagatgccgt gccgtctgct 7920
tcgcttgccc cgacgcgacg ctgctggttc gctggttggg gtccgttaga ctcgtcgacg 7980
gcgtttaaca ggctggcatt atctactcga aacaagaaaa atgtttcctt agttttttta 8040
atcttctaaa gggatattgt ttaattttta gtcactttat tttattctat tttatatcta 8100
aattattaaa taaaaaaact aaaatagagt tttagttttc ttaatttaga ggctaaaata 8160
gaataaaata gatgtactaa aaaaattagt ctataaaaac cattaaccct aaaccctaaa 8220
tggatgtact aataaaatgg atgaagtatt atataggtga agctatttgc aaaaaaaaag 8280
gagaacacat gcacactaaa aagataaaac tgtagagtcc tgttgtcaaa atactcaatt 8340
gtcctttaga ccatgtctaa ctgttcattt atatgattct ctaaaacact gatattattg 8400
tagtactata gattatatta ttcgtagagt aaagtttaaa tatatgtata aagatagata 8460
aactgcactt caaacaagtg tgacaaaaaa aatatgtggg aattttttat aacttagaca 8520
tgcaatgctc attatctcta gagaggggca cgaccgggtc acgctgcact gcaggcatgc 8580
gcgccttaat taaggaattc ctcgagttta aacggatccc tgaaagcgac gttggatgtt 8640
aacatctaca aattgccttt tcttatcgac catgtacgta agcgtttacg tttttggtgg 8700
acccttgagg aaactggtag ctgttgtggg cctgtggtct caagatggat cattaatttc 8760
caccttcacc tacgatggg ggcacgcac cggtagtaaa tattgtacgg ctaagagcga 8820
atcttgccctg tagacctcaa ttgcgagctt tctaatttca aactattcgg gcctaacttt 8880
tggtgtgatg atgctgactg gcttacgtgt ggaaaaaatt tgcaatctat gtagtcttta 8940
actaatgttt ttttctttaa aaaaaaagtc attatttttg gtttgattaa tatatttggt 9000
ttaaattaaa taaaatatta aaaagtttag ttaaatcatc tatttaaacy atttgactg 9060
atctgtgatc tattaatttt ttaacttaat ctagaccagg gtactagttg gtccgatccc 9120
atcttgaaaa cactatcttt agcttgctgg taggttccag ggtagaaggc agagactttt 9180
ttggaggggt tttattatta aatttatatt tttataattt ttaaatgatt aaaataaaaa 9240
tttattattt taagaggaga taaagtcaa tttaccata tattaattta aaattttata 9300
aatttaaaaa agaaaaaac taaaatttta attttatagg ttctaaaata ataaatataa 9360
cttactgagt ttttttaagc tt 9382

<210> 3
<211> 21
5 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
10 <223> Cebador directo 281-14

<400> 3

tgctggctga aggtaggag g 21

15 <210> 4

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

5 <220>
 <223> Cebador inverso 281-15

<400> 4

10 ccggacatga agccatttac 20

<210> 5
 <211> 603
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de 603 bp del amplicón producido usando los cebadores de SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:4

20 <400> 5

tgtcggctga aggtagggag gaattaatca atcacagttg cttgtttctg agtctataga	60
atcatgaatt ttaaatttat ggaatgcatt ttttcgaaga tattgtatgc attaagtgtgta	120
attttagttt caatatgaaa tttgagattt atatataac ttacataaaa ccctccttta	180
ctgaattagt gccatggata aaagaccaat taagcaatcc ttccaacacg tgcatgcact	240
ggattttcat cgcctcgtcc attgttaaatt tgataggtta ataagaacaa ttagttggct	300
actgattata tggattctgg gttaaaagta tttaggttta ctgttacata catggaggat	360
ctacatctat tttcactttt gttaaatata ttttaagttag ttttgatgag ttttaaggatt	420
gtactagcca atagtagtac ataaaggaga tagagtacca aaacaaagaa aaagccgaaa	480
ggtgttaattg ctaaattgta aaagaaagtt aaaataagag actcgaatta taatatgatt	540
ctctggcgca ctaattaagc tactatatat tgtcaatagt attgtaaatg gcttcatgtc	600
cgg	603

<210> 6
 25 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 30 <223> Cebador directo 281-9

<400> 6

35 tctctagaga ggggcacgac c 21

<210> 7
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Cebador inverso 281-10

<400> 7

45 cgagctggag agaccggtga c 21

<210> 8
 <211> 562

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Secuencia de 562 bp del amplicón producido usando los cebadores de SEQ ID NO:6 y SEQ ID NO:7

<400> 8

tctctagaga ggggcacgac cgggtcacgc tgcactgcag ccaagtggcc cccatttgga	60
cgtgaatgta gacacgtcga aataaagatt tccgaattag aataatttgc ttattgcttt	120
cgcctataaa tacgacggat cgtaatttgt cgctttatca gaatgtactt tcattttata	180
ataacgctgc ggacatctac atttttgaat tgaaaaaaaa ttggttaatta ctctttcttt	240
ttctccatat tgaccatcat actcattgct gatccatgta gatttccctt acttgtctcc	300
ctctaactctg actttattaa cccaaagcaa ttgcttattt gttccccacg cccacaaagc	360
ccagcattgt ccctaaggta ttaatttgtt gttcgattct tgttcttgaa cccatttgga	420
gaatgcaaca agggttttca tgtcagcacg gtaatggttc tgtgtaaatt ccagtagtgc	480
tgcccaagta aagtctgggt atttcctcga atttgcggca ttaactaagc tagctgctgg	540
tgtcaccggt ctctccagct cg	562

10

<210> 9
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

15

<220>
<223> Cebador directo 3006-20

<400> 9

20

ttccaacctt taactattat cctgc 25

<210> 10
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

25

<220>
<223> Cebador inverso 3006-22

30

<400> 10

gctgcggaca tctacatttt 20

35

<210> 11
<211> 614
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

40

<220>
<223> Secuencia de 614 bp del amplicón producido usando los cebadores de SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10

<400> 11

ES 2 743 789 T3

```

ttccaacctt taactattat cctgccttaa aattcgaata catttattat ctataaacta    60
tccgaatatt attatctaaa tcctaattaa atactatttt ttatcgagta ttcgtatccg    120
ccaagggaat ccatctccaa attttcaatt atttttcaga tatctaaatc tgtaaaattt    180
caaattcaag tacgttaciaa ttctttataa ataatccaaa ttataaatat tttataacta    240
ttaattcata aattaaaatt tattattcaa atattcgaat aatctatttt taagacgtaa    300
agtattacat cgaaggggta ctttcaaagg gtagtgtatt tccatttcaa ttattcagaa    360
cgttgctcgtt ttgttccggt catagaaaag ggctctggaa gagaagaaaa tgacttgact    420
tttcaatttc atgctcatcc actcgtttca attactgttt actaaaaaaa taataaaata    480
aaatattaac aatgcattga gtatgatgtc cgggaaatct acatggatca gcaatgagta    540
tgatgggcaa tatggagaaa aagaaagagt aattaccaat tttttttcaa ttcaaaaatg    600
tagatgtccg cagc                                                         614

```

<210> 12

<211> 24

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Cebador directo 3006-9

<400> 12

gacatgcaat gctcattatc tcta 24

15 <210> 13

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Cebador inverso 3600-12

<400> 13

25 aagtctctgc cttctaccct gg 22

<210> 14

<211> 662

<212> ADN

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de 662 bp del amplicón producido usando los cebadores de SEQ ID NO:12 y SEQ ID NO:13

35 <400> 14

gacatgcaat gctcattatc tctagagagg ggcacgaccg gggtcacgctg cactgcaggc 60

ES 2 743 789 T3

```

atgcgcgcct taattaagga attcctcgag tttaaacgga tccctgaaag cgacgttgga 120
tgtaaacatc tacaaattgc cttttcttat cgaccatgta cgtaagcgct tacgtttttg 180
gtggaccctt gaggaaactg gtagctgttg tgggcctgtg gtctcaagat ggatcattaa 240
tttccacctt cacctacgat ggggggcatc gcaccggtga gtaatattgt acggctaaga 300
gcgaatttgg cctgtagacc tcaattgcga gcttttctaatt ttcaaactat tcgggcctaa 360
cttttggtgt gatgatgctg actggcttac gtgtggaaaa aatttgcaat ctatgtagtc 420
tttaactaat gtttttttct ttaaaaaaaa agtcattatt tttggtttga ttaatatatt 480
tggttttaaat taaataaaaat attaaaaagt ttagttaaat catctattta aacgatttgt 540
actgatttgt gatctattaa ttttttaact taatctagac cagggtacta gttggtccga 600
tcccaccttg aaaacactat ctttagcttg ctggtaggtt ccagggtaga aggcagagac 660
tt

```

<210> 15

<211> 53

5 <212> ADN

<213> Gossypium hirsutum

<220>

<223> Segmento de ADN de algodón genómico en el locus 281-24-236

10

<400> 15

ataactctg tagctctatt ccttagaccc accatgaacg agcagataaa tgc 53

15 <210> 16

<211> 16

<212> ADN

<213> Gossypium hirsutum

20 <220>

<223> genomic cotton ADN segment at locus 3006-210-23

<400> 16

25 ctggttatt ctatga 16

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método para detectar la presencia del evento de algodón cry1F 281-24-236 en una muestra que comprende ADN de algodón, en donde dicho método comprende poner en contacto dicha muestra con al menos un polinucleótido que es diagnóstico para el evento de algodón cry1F 281-24-236, en donde el evento de algodón 281-24-236 es una secuencia de polinucleótidos de inserto Cry1F que consta de los nucleótidos 2.075-12.748 de SEQ ID NO: 1 y al menos 20 nucleótidos flanqueantes contiguos en ambos lados de dicha secuencia de inserto, en donde los nucleótidos flanqueantes 5' son los restos de nucleótidos 1-2.074 de SEQ ID NO: 1 y los nucleótidos flanqueantes 3' son los restos de nucleótidos 12.749-15.490 de SEQ ID NO: 1.
- 2.- El método de la reivindicación 1, en donde dicho método comprende poner en contacto dicha muestra con
 - a. un primer cebador que se une a una secuencia flanqueante seleccionada del grupo que consiste en los restos 1-2.074 de la SEQ ID NO: 1, los restos 12.749-15.490 de la SEQ ID NO: 1 y sus complementos; y
 - b. un segundo cebador que se une a una secuencia de inserto seleccionada del grupo que consiste en los restos 2.075-12.748 de SEQ ID NO: 1 y sus complementos; ysometer dicha muestra a una reacción en cadena de la polimerasa; y analizar un amplicón, que se extiende por la unión entre dicha secuencia de flanco y dicha secuencia de inserción, generada entre dichos cebadores.
- 3.- El método de la reivindicación 2, en el que dicho segundo cebador se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 6.
- 4.- El método de la reivindicación 1, en el que dicho método comprende poner en contacto dicha muestra con al menos un polinucleótido, dicho polinucleótido comprende al menos 30 nucleótidos que se hibrida en condiciones rigurosas con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en los restos 2.060 a 2.090 de la SEQ ID NO: 1, restos 12.733 a 12.765 de SEQ ID NO: 1, y sus complementos; y en el que dicho método comprende además someter dicha muestra y dicho polinucleótido a condiciones de hibridación rigurosas; y analizar en dicha muestra la hibridación de dicho polinucleótido a dicho ADN.
- 5.- El método de la reivindicación 1, que comprende además detectar la presencia del evento de algodón cry1Ac 3006-210-23 en dicha muestra que comprende ADN de algodón, en donde dicho método comprende poner en contacto dicha muestra con al menos un polinucleótido que es diagnóstico para el evento de algodón cry1Ac 3006-210-23, en el que el evento de algodón 3006-210-23 es una secuencia de polinucleótidos inserto Cry1Ac que consiste en los nucleótidos 528-8.900 de la SEQ ID NO: 2 y al menos 20 nucleótidos flanqueantes contiguos a ambos lados de dicha secuencia de inserción, en el que los nucleótidos flanqueantes en 5' son los restos de nucleótidos 1-527 de SEQ ID NO: 2 y los nucleótidos flanqueantes en 3' son los restos de nucleótidos 8.901-9.382 de la SEQ ID NO: 2.
- 6.- El método de la reivindicación 5, en donde dicho método comprende poner en contacto dicha muestra con
 - a. un primer cebador que se une a una secuencia flanqueante seleccionada del grupo que consiste en los restos 1-527 de SEQ ID NO: 2, los restos 8.901-9.382 de SEQ ID NO: 2 y sus complementos; y
 - b. un segundo cebador que se une a una secuencia de inserto seleccionada del grupo que consiste en los restos 528-8.900 de la SEQ ID NO: 2, y sus complementos; ysometer dicha muestra a una reacción en cadena de la polimerasa; y determinar un amplicón, que abarca la unión entre dicha secuencia flanqueante y dicha secuencia de inserción, generada entre dichos cebadores.
- 7.- El método de la reivindicación 6, en el que dicho segundo cebador se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 12.
- 8.- El método de la reivindicación 5, en el que dicho método comprende poner en contacto dicha muestra con al menos un polinucleótido, comprendiendo dicho polinucleótido al menos 30 nucleótidos que hibrida en condiciones rigurosas con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en los restos 512-543 de la SEQ ID NO: 2, restos 8.885 a 8.916 de SEQ ID NO: 2, y sus complementos; y en el que dicho método comprende además someter dicha muestra y dicho polinucleótido a condiciones de hibridación rigurosas; y determinar en dicha muestra la hibridación de dicho polinucleótido con dicho ADN.
- 9.- Un kit de detección de ADN que comprende un primer cebador que se une a una secuencia flanqueante seleccionada del grupo que consiste en los restos 1-2.074 de la SEQ ID NO: 1, los restos 12.749-15.490 de la SEQ ID NO: 1 y sus complementos; y un segundo cebador que se une a una secuencia de inserto seleccionada del grupo que consiste en los restos 2.075-12.748 de SEQ ID NO: 1 y sus complementos.
- 10.- El kit de detección de ADN de la reivindicación 9, que comprende además un primer cebador que se une a una secuencia flanqueante seleccionada del grupo que consiste en los restos 1-527 de SEQ ID NO: 2, los restos 8.901-9.382 de SEQ ID NO: 2, y complementos de los mismos; y un segundo cebador que se une a una secuencia de

inserto seleccionada del grupo que consiste en los restos 528-8.900 de la SEQ ID NO: 2, y sus complementos.

11.- Un kit de detección de ADN que comprende un polinucleótido que comprende al menos 30 nucleótidos que hibrida en condiciones rigurosas con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en los restos 2.060 a 2.090 de la SEQ ID NO: 1, los restos 12.733 a 12.765 de la SEQ ID NO: 1, y sus complementos.

- 5 12.- El kit de detección de ADN de la reivindicación 11, que comprende además un polinucleótido que comprende al menos 30 nucleótidos que se hibrida en condiciones rigurosas con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en los restos 512-543 de SEQ ID NO: 2, restos 8,885 a 8,916 de SEQ ID NO: 2, y sus complementos.

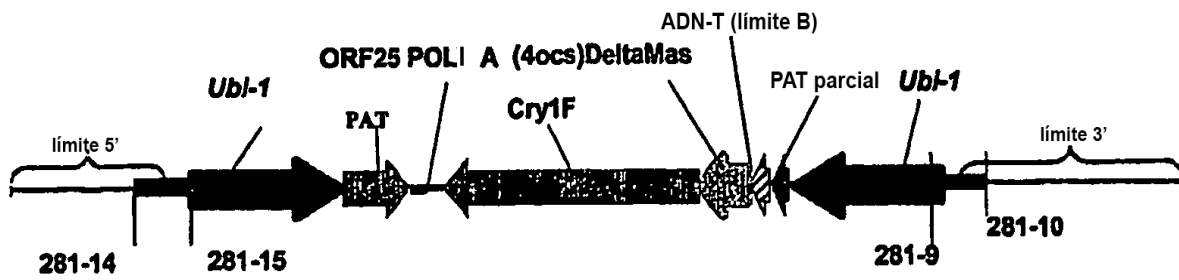


FIG. 1

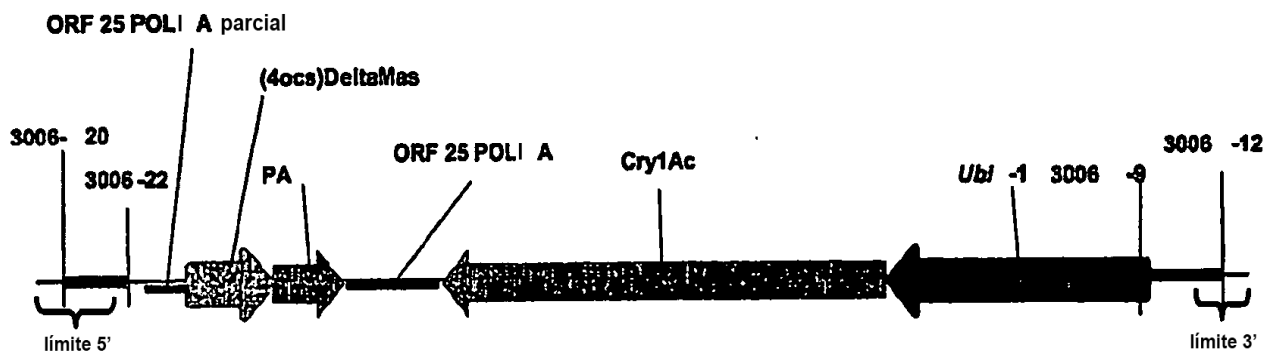


FIG. 2