

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 582 552**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

A01H 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.10.2007 E 07861586 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016 EP 2078089**

54 Título: **Acontecimiento de soja DP-305423-1 y composiciones y métodos para su identificación y/o detección**

30 Prioridad:

31.10.2006 US 863721 P

08.06.2007 US 942676 P

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

13.09.2016

73 Titular/es:

E. I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY

(100.0%)

Chestnut Run Plaza, 974 Center Road, P.O. Box

2915

Wilmington, DE 19805, US

72 Inventor/es:

KINNEY, ANTHONY J.;

STECCA, KEVIN L. y

MEYER, KNUT

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 582 552 T3

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

DESCRIPCIÓN

Acontecimiento de soja DP-305423-1 y composiciones y métodos para su identificación y/o detección

Campo de la invención

5 Esta invención pertenece al campo de la biología molecular. De modo más específico, esta invención se refiere a plantas que muestran un fenotipo de alto contenido en ácido oleico y un fenotipo de tolerancia a herbicidas conferidos por la supresión del gen FAD2 junto con la expresión de una secuencia que confiere tolerancia a los inhibidores de ALS.

Antecedentes de la invención

10 En la expresión de genes extraños en plantas se sabe que influye su localización en el genoma de la planta, quizá debido a la estructura de la cromatina (por ejemplo, heterocromatina) o la proximidad de elementos reguladores transcripcionales (por ejemplo, potenciadores) cercanos al sitio de integración (Weising *et al.* (1988), *Ann. Rev. Genet.*, 22:421-477). Al mismo tiempo, la presencia del transgén en diferentes localizaciones en el genoma influye en el fenotipo global de la planta de diferentes formas. Por esta razón, a menudo es necesario seleccionar un gran número de acontecimientos para identificar un acontecimiento caracterizado por una expresión óptima de un gen introducido de interés. Por ejemplo, se ha observado en plantas y en otros organismos que puede existir una amplia variación en los niveles de expresión de un gen introducido entre acontecimientos. También pueden existir diferencias en los patrones espaciales o temporales de expresión, por ejemplo, diferencias en la expresión relativa de un transgén en diversos tejidos vegetales, que pueden no corresponderse con los patrones esperados de los elementos reguladores transcripcionales presentes en la construcción del gen introducida. También se ha observado que la inserción del transgén puede afectar a la expresión del gen endógena. Por estas razones, es habitual producir de cientos a miles de acontecimientos diferentes y seleccionar estos acontecimientos para descubrir un único acontecimiento que presente los patrones y niveles de expresión del transgén deseados para fines comerciales. Un acontecimiento que tenga los patrones o niveles deseados de expresión del transgén es útil para introgresar el transgén en otros ambientes genéticos mediante cruzamiento sexual exogámico empleando métodos de reproducción convencionales. La progenie de dichos 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.

30 Sería ventajoso poder detectar la presencia de un acontecimiento concreto para determinar si la progenie de un cruzamiento sexual contiene un transgén de interés. Además, un método para detectar un acontecimiento concreto podría ayudar a cumplir con las normas necesarias para la aprobación y el etiquetado antes de la comercialización de alimentos derivados de plantas de cultivos recombinantes, o para emplearlo en el control ambiental, el control de rasgos en cultivos en el campo, o el control de productos derivados de un cultivo recolectado, así como para asegurar el cumplimiento de las partes sometidas a términos contractuales o normativos.

35 En la producción comercial de cultivos, resulta deseable eliminar con facilidad y rapidez las plantas no deseadas (es decir, "hierbas adventicias") de un campo de plantas cultivadas. Un tratamiento ideal sería aquel que pueda aplicarse a un campo por entero, pero que elimine solo las plantas no deseadas, dejando a las plantas del cultivo sin dañar. Este sistema de tratamiento implicaría el uso de plantas de cultivo que sean tolerantes a un herbicida, de modo que cuando el herbicida se pulveriza sobre un campo de plantas de cultivo tolerantes al herbicida, las plantas de cultivo continuarían creciendo, mientras que las hierbas adventicias no tolerantes al herbicidas morirían o quedarían gravemente dañadas.

40 El uso principal de los lípidos vegetales es como aceites comestibles en forma de triacilgliceroles. La actuación y atributos saludables específicos de los aceites comestibles vienen determinados, en gran medida, por su composición en ácidos grasos. La mayoría de los aceites vegetales derivados de variedades de plantas comerciales están compuestos principalmente por ácido palmítico (16:0), esteárico (18:0), oleico (18:1), linoleico (18:2) y linolénico (18:3). Los ácidos palmítico y esteárico son, respectivamente, ácidos grasos saturados con una longitud de 16 y 18 carbonos. Los ácidos oleico, linoleico, y linolénico son ácidos grasos insaturados con una longitud de 18 carbonos, que contienen uno, dos y tres dobles enlaces, respectivamente. El ácido oleico se denomina un ácido graso monoinsaturado, mientras que los ácidos linoleico y linolénico se denominan ácidos grasos poliinsaturados.

50 Un aceite vegetal con bajo contenido total en ácidos grasos saturados y un alto contenido en ácidos grasos monoinsaturados proporcionaría unos significativos beneficios para la salud de los consumidores, así como beneficios económicos para los procesadores de aceite. Como ejemplo, el aceite de canola se considera un aceite muy sano. Sin embargo, durante su uso, el alto nivel de ácidos grasos poliinsaturados en el aceite de canola hace que el aceite sea inestable, se oxide con facilidad, y sea susceptible al desarrollo de olores y sabores desagradables (Gailliard, 1980, vol. 4, pp. 85-116, en: Stumpf, P. K., ed., *The Biochemistry of Plants*, Academic Press, Nueva York).

55 Los niveles de ácidos grasos poliinsaturados pueden reducirse mediante hidrogenación, pero el coste de este proceso y la producción concomitante de isómeros trans, cuestionables desde el punto de vista nutricional, de los ácidos grasos insaturados remanentes reduce la conveniencia global del aceite hidrogenado (Mensink *et al.*, *New England J. Medicine* (1990), N323: 439-445). Existen problemas similares con el aceite de soja y de maíz.

Sumario de la invención

Se proporcionan composiciones y métodos relacionados con plantas de soja tolerantes al inhibidor de ALS/con alto contenido en ácido oleico transgénicas. De modo específico, la presente invención proporciona plantas de soja que contienen un acontecimiento DP-305423-1 que imparte un fenotipo de alto contenido en ácido oleico y tolerancia al menos a un herbicida inhibidor de ALS. La planta de soja que porta el acontecimiento DP-305423-1 en la localización cromosómica indicada comprende las zonas de unión genómica/del transgén que tienen al menos la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO:8, 9, 14, 15, 20, 21, 83 y 84. La caracterización del sitio de inserción genómico del acontecimiento DP-305423-1 proporciona una mayor eficacia de reproducción y permite el uso de marcadores moleculares para seguir la pista de la inserción del transgén en las poblaciones reproductoras y su progenie. Se proporcionan diversos métodos y composiciones para la identificación, la detección y el uso del acontecimiento DP-305423-1 de soja.

En una realización, la presente invención incluye un polinucleótido aislado que comprende la SEQ ID NO:5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 84, 85, 86, 87 o 88, o su complemento.

En otra realización, la presente invención incluye una planta de soja o una semilla de soja que comprende las SEQ ID NO:5, 6, 7 y 82.

En otra realización, la presente invención incluye un método para identificar si una muestra biológica comprende un polinucleótido que comprende cualquiera de SEQ ID NO:5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 o 88, comprendiendo dicho método: a) poner en contacto dicha muestra biológica con un primer y un segundo cebador, en el que el primer cebador se asocia con:

i) una región genómica 5' de SEQ ID NO:5, 6, 7 o 82, o su complemento, o

ii) una región genómica 3' de SEQ ID NO:5, 6, 7 o 82, o su complemento, y

en el que la segunda secuencia de cebador se asocia con una región de inserción de SEQ ID NO:5, 6, 7 o 82, o su complemento, y la región de inserción comprende los nucleótidos 18.652-31.579 de SEQ ID NO:5, los nucleótidos 12.164-14.494 de SEQ ID NO:6, los nucleótidos 5.751-7.813 de SEQ ID NO:7, o los nucleótidos 2.900-7.909 de SEQ ID NO:82; b) amplificar un polinucleótido que comprende cualquiera de SEQ ID NO:8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 83, 84, 85, 86, 87 o 88; y c) confirmar que dicha muestra biológica comprende un polinucleótido que comprende cualquiera de SEQ ID NO:5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 o 88. El método puede comprender también detectar un polinucleótido que comprende la SEQ ID NO:5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 o 88 mediante su hibridación con una sonda, en el que dicha sonda se hibrida bajo condiciones de hibridación rigurosas con un polinucleótido que comprende la SEQ ID NO:5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 o 88. El primer cebador puede comprender al menos 8 nucleótidos consecutivos de una región genómica 5' o una región genómica 3' de la SEQ ID NO:5, 6, 7 o 82. El primer o segundo cebador puede comprender la SEQ ID NO: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, 89, 90, 91, 92, 93 o 94.

En otra realización, la presente invención incluye un método para detectar la presencia de un polinucleótido que comprende la SEQ ID NO:5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 o 88 en una muestra biológica que comprende ADN, que comprende: (a) extraer una muestra de ADN de dicha muestra biológica; (b) poner en contacto dicha muestra de ADN con al menos un par de moléculas de cebadores de ADN seleccionadas del grupo que consiste en: i) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:26 y SEQ ID NO:27; ii) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:29 y SEQ ID NO:30; iii) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:31 y SEQ ID NO:32; iv) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:33 y SEQ ID NO:34; v) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:35 y SEQ ID NO:36; vi) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:37 y SEQ ID NO:38; vii) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:39 y SEQ ID NO:40; viii) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:41 y SEQ ID NO:42; ix) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:43 y SEQ ID NO:44; x) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:45 y SEQ ID NO:46; xi) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:47 y SEQ ID NO:48; xii) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:47 y SEQ ID NO:49; xiii) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:50 y SEQ ID NO:51; xiv) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:52 y SEQ ID NO:53; xv) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:54 y SEQ ID NO:49; xvi) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:55 y SEQ ID NO:46; xvii) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:33 y SEQ ID NO:56; xviii) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:57 y SEQ ID NO:58; xix) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:59 y SEQ ID NO:60; xx) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:61 y SEQ ID NO:36; xxi) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:35 y SEQ ID NO:62; xxii) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:37 y SEQ ID NO:63; xxiii) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:64 y SEQ ID NO:65; xxiv) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:66 y SEQ ID NO:67; xxv) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:68 y SEQ ID NO:69; xxvi) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:70 y SEQ ID NO:71; xxvii) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:72 y SEQ ID NO:73; xxviii) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:74 y SEQ ID NO:75; xxix) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:76 y SEQ ID NO:77; xxx) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:78 y SEQ ID NO:79;

xxxi) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:80 y SEQ ID NO:81; y xxxii) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:89 y SEQ ID NO:90; (c) proporcionar condiciones de reacción de amplificación del ADN; (d) realizar dicha reacción de amplificación de ADN, produciendo con ello una molécula de amplicón de ADN; y (e) detectar dicha molécula de amplicón de ADN, en el que la detección de dicha molécula de amplicón de ADN en dicha reacción de amplificación de ADN indica la presencia de un polinucleótido que comprende SEQ ID NO:8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 83, 84, 85, 86, 87 o 88.

En otra realización, la presente invención incluye un método para detectar la presencia de la SEQ ID NO:5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 o 88 en una muestra biológica, y el método comprende: (a) poner en contacto la muestra biológica que comprende ADN bajo condiciones de hibridación rigurosas con una sonda polinucleotídica, en el que dicha sonda se hibrida bajo condiciones de hibridación rigurosas con un polinucleótido que comprende la SEQ ID NO:8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 83, 84, 85, 86, 87 o 88, o su complemento, en el que dichas condiciones de hibridación son una hibridación en formamida al 50%, NaCl 1,0 M, SDS al 1% a 37 °C y un lavado en 0,1 x SSC de 60 a 65 °C, en el que la sonda tiene una longitud de al menos 8 nucleótidos y tiene una longitud suficiente de nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:5, 6, 7 o 82, o su complemento, para actuar como sonda de ADN que puede detectar y/o identificar específicamente un ADN que comprende la SEQ ID NO:8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 83, 84, 85, 86, 87 o 88, o su complemento; y (b) detectar la hibridación de la sonda con el ADN. La muestra biológica puede comprender tejido de soja.

En la presente se describe un cebador de ADN aislado que comprende al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: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, 89, 90, 91, 92, 93 o 94, o su complemento.

En otra realización, la presente invención incluye una pareja de cebadores de ADN que comprende un primer cebador de ADN y un segundo cebador de ADN, en el que los cebadores de ADN tienen una longitud de al menos 6 nucleótidos y tienen una longitud suficiente de nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:5, 6, 7 o 82, o su complemento, para actuar como cebadores de ADN que pueden detectar y/o identificar específicamente un ADN que comprende la SEQ ID NO:5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 o 88, o su complemento, y en el que primer cebador se asocia con:

- a) una región genómica 5' de SEQ ID NO:5, 6, 7 o 82, o su complemento, o
- b) una región genómica 3' de SEQ ID NO:5, 6, 7 o 82, o su complemento, y

en el que la secuencia del segundo cebador se asocia con una región de inserción de SEQ ID NO:5, 6, 7 o 82, o su complemento, y la región de inserción comprende los nucleótidos 18.652-31.579 de SEQ ID NO:5, los nucleótidos 12.164-14.494 de SEQ ID NO:6, los nucleótidos 5.751-7.813 de SEQ ID NO:7, o los nucleótidos 2.900-7.909 de SEQ ID NO:82.

En la presente se describe una sonda de ADN que tiene una longitud suficiente de nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:5, 6, 7 o 82 para actuar como sonda de ADN de diagnóstico de un ADN que comprende la SEQ ID NO:5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 o 88.

En otra realización, la presente invención incluye un método para seleccionar semillas para detectar la presencia de un polinucleótido que comprende la SEQ ID NO:5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 o 88, que comprende: a) poner en contacto una muestra que comprende ADN de dicha semilla con un primer y un segundo cebador de ADN, en el que el primer cebador se asocia a:

- i) una región genómica 5' de SEQ ID NO:5, 6, 7 o 82, o su complemento, o
- ii) una región genómica 3' de SEQ ID NO:5, 6, 7 o 82, o su complemento, y

en el que la secuencia del segundo cebador se asocia con una región de inserción de SEQ ID NO:5, 6, 7 o 82, o su complemento, y la región de inserción comprende los nucleótidos 18.652-31.579 de SEQ ID NO:5, los nucleótidos 12.164-14.494 de SEQ ID NO:6, los nucleótidos 5.751-7.813 de SEQ ID NO:7, o los nucleótidos 2.900-7.909 de SEQ ID NO:82; b) amplificar un polinucleótido que comprende un polinucleótido que comprende la SEQ ID NO:8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 83, 84, 85, 86, 87 o 88; y c) detectar dicho polinucleótido amplificado.

En otra realización, la presente invención incluye un método para seleccionar semillas para detectar la presencia de un polinucleótido que comprende la SEQ ID NO:5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 9 5, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 o 88, que comprende: (a) poner en contacto una muestra que comprende ADN de dicha semilla bajo condiciones de hibridación rigurosas con una sonda polinucleotídica que se hibrida bajo condiciones de hibridación rigurosas con un polinucleótido que comprende la SEQ ID NO:8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 83, 84, 85, 86, 87 o 88, o su complemento, en el que dichas condiciones de hibridación son una hibridación en formamida al 50%, NaCl 1,0 M, SDS al 1% a 37 °C y un lavado en 0,1 x SSC de

60 a 65 °C, en el que la sonda tiene una longitud de al menos 8 nucleótidos y tiene una longitud suficiente de nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:5, 6, 7 o 82, o su complemento, para actuar como sonda de ADN que puede detectar y/o identificar específicamente un ADN que comprende la SEQ ID NO:8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 83, 84, 85, 86, 87 o 88, o su complemento; y (b) detectar la hibridación de la sonda con el ADN.

En la presente se describe un método para producir una planta con alto contenido en ácido oleico y tolerante a inhibidores de ALS, que comprende cruzar una planta que comprende un polinucleótido que comprende la SEQ ID NO:5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 o 88, y seleccionar la progenie mediante un análisis para detectar la progenie que comprende un polinucleótido que comprende la SEQ ID NO:5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 o 88.

En la presente se describe una secuencia de ADN aislada que comprende al menos una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en: (a) una secuencia de nucleótidos indicada en SEQ ID NO: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, 89, 90, 91, 92, 93 o 94; y (b) un complemento de longitud completa de la secuencia de nucleótidos de (a).

En la presente se describe una pareja de secuencias de cebadores de ADN aislados, que comprende cada uno al menos diez nucleótidos y que, cuando se emplean juntas en un procedimiento de amplificación de ADN, producen un amplicón de ADN que comprende un polinucleótido que comprende la SEQ ID NO:5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 o 88. La pareja de secuencias de cebadores de ADN puede comprender una primera secuencia de cebador seleccionada del grupo que consiste en: a) una región genómica 5' de SEQ ID NO:5, 6; 7 o 82; y b) una región genómica 3' de SEQ ID NO:5, 6, 7 o 82; y una segunda secuencia de cebador seleccionada de una región de inserción de SEQ ID NO:5, 6, 7 o 82.

En la presente se describe un método para controlar las hierbas adventicias en un área de cultivo, que comprende aplicar una cantidad eficaz de un inhibidor de ALS al área de cultivo que comprende plantas de soja que comprenden un polinucleótido que comprende la SEQ ID NO:5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 o 88. El inhibidor de ALS puede ser un herbicida de sulfonilurea o un herbicida de imidazolinona. Puede emplearse una combinación de diferentes inhibidores de ALS. El inhibidor de ALS o la combinación de inhibidores de ALS puede utilizarse en otra combinación con uno o más herbicidas no inhibidores de ALS.

En la presente se describe una construcción de expresión de ADN que comprende el polinucleótido aislado de la invención unido operablemente al menos a una secuencia reguladora.

Las plantas de la progenie transgénicas pueden obtenerse a partir de la semilla transgénica de la invención.

En la presente se describe una construcción de ADN recombinante que comprende: un primer y un segundo módulo de expresión, en los que dicho primer módulo de expresión comprende, en unión operable: (a) un promotor KTi3 de soja; (b) un fragmento *gm-fad2-1*; y (c) un terminador transcripcional KTi3 de soja; y dicho segundo módulo de expresión comprende, en unión operable: (i) un promotor SAMS de soja; (ii) un intrón y conductor no traducido 5' SAMS de soja; (iii) una molécula de ADN que codifica *gm-hra* de soja; y (iv) un terminador transcripcional als de soja.

En la presente también se describe una planta o una semilla que comprende la construcción de ADN recombinante descrita anteriormente. La planta o la semilla puede ser una planta de soja o una semilla de soja.

Breve descripción de las figuras y de la lista de secuencias

La figura 1 proporciona un mapa esquemático del fragmento PHP19340A que indica diversos elementos genéticos y sitios de enzimas de restricción para *Nco* I y *Hind* III.

La figura 2 proporciona un mapa esquemático del fragmento PHP17752A que indica diversos elementos genéticos y sitios de enzimas de restricción para *Nco* I y *Hind* III.

La figura 3 proporciona un mapa esquemático del vector de expresión PHP19340 que indica diversos elementos genéticos y sitios de enzimas de restricción para *Asc* I, *Nco* I y *Hind* III.

La figura 4 proporciona un mapa esquemático del vector de expresión PHP17752 que indica diversos elementos genéticos y sitios de enzimas de restricción para *Asc* I, *Nco* I y *Hind* III.

La figura 5 muestra un experimento de hibridación Southern de ADN genómico procedente de tejido foliar de soja de plantas individuales de DP-305423-1 (generación T5 y T4) y de un control no modificado (Jack), digerido con *Hind* III y sondado con la sonda génica *gm-fad2-1*.

La figura 6 muestra un experimento de hibridación Southern de ADN genómico aislado a partir de tejido foliar de soja

de plantas individuales de DP-305423-1 (generación T5 y T4) y de un control no modificado (Jack), digerido con *Nco* I y sondado con la sonda génica *gm-fad2-1*.

5 La figura 7 muestra un experimento de hibridación Southern de ADN genómico aislado a partir de tejido foliar de soja de plantas individuales de DP-305423-1 (generación T5 y T4) y de un control no modificado (Jack), digerido con *Hind* III y sondado con la sonda génica *gm-hra*.

La figura 8 muestra un experimento de hibridación Southern de ADN genómico aislado a partir de tejido foliar de soja de plantas individuales de DP-305423-1 (generación T5 y T4) y de un control no modificado (Jack), digerido con *Nco* I y sondado con la sonda génica *gm-hra*.

10 La figura 9 proporciona un mapa esquemático del cóntigo-1 que indica diversos elementos genéticos dentro de la inserción-1.

La figura 10 proporciona un mapa esquemático del cóntigo-2 que indica diversos elementos genéticos dentro de la inserción-2.

La figura 11 proporciona un mapa esquemático del cóntigo-3 que indica diversos elementos genéticos dentro de la inserción-3.

15 La figura 12 proporciona un mapa esquemático del cóntigo-4 que indica diversos elementos genéticos dentro de la inserción-4.

20 La tabla 1 presenta una descripción de las siguientes secuencias que están presentes en la lista de secuencias: (1) las secuencias de inserción empleadas para crear el acontecimiento DP-305423-1 y los vectores de los que se derivan; (2) las secuencia de ADN genómico presentes en el cóntigo-1, cóntigo-2, cóntigo-3 y cóntigo-4; (3) las secuencias de la zona de unión 5' y 3', en la que se unen la inserción transgénica y la secuencia genómica de soja endógena, para cada uno de los cuatro cóntigos; y (4) secuencias de cebador que pueden emplearse para amplificar las secuencias de la zona de unión 5' y 3' de cada uno de los cuatro cóntigos.

Tabla 1

Tabla resumen de SEQ ID NO:	
SEQ ID NO:	Descripción
1	PHP19340A
2	PHP17752A
3	PHP19340
4	PHP17752
5	Cóntigo-1 de DP-305423-1
6	Cóntigo-2 de DP-305423-1
7	Cóntigo-3 de DP-305423-1
8	Zona de unión 5' de 20-nt del cóntigo-1 (5' genómico/5' transgén; 10-nt/10-nt)
9	Zona de unión 3' de 20-nt del cóntigo-1 (3' transgén/3' genómico; 10-nt/10-nt)
10	Zona de unión 5' de 40-nt del cóntigo-1 (5' genómico/5' transgén; 20-nt/20-nt)
11	Zona de unión 3' de 40-nt del cóntigo-1 (3' transgén/3' genómico; 20-nt/20-nt)
12	Zona de unión 5' de 60-nt del cóntigo-1 (5' genómico/5' transgén; 30-nt/30-nt)
13	Zona de unión 3' de 60-nt del cóntigo-1 (3' transgén/3' genómico; 30-nt/30-nt)
14	Zona de unión 5' de 20-nt del cóntigo-2 (5' genómico/5' transgén; 10-nt/10-nt)
15	Zona de unión 3' de 20-nt del cóntigo-2 (3' transgén/3' genómico; 10-nt/10-nt)
16	Zona de unión 5' de 40-nt del cóntigo-2 (5' genómico/5' transgén; 20-nt/20-nt)
17	Zona de unión 3' de 40-nt del cóntigo-2 (3' transgén/3' genómico; 20-nt/20-nt)
18	Zona de unión 5' de 60-nt del cóntigo-2 (5' genómico/5' transgén; 30-nt/30-nt)
19	Zona de unión 3' de 60-nt del cóntigo-2 (3' transgén/3' genómico; 30-nt/30-nt)
20	Zona de unión 5' de 20-nt del cóntigo-3 (5' genómico/5' transgén; 10-nt/10-nt)

ES 2 582 552 T3

Tabla resumen de SEQ ID NO:	
SEQ ID NO:	Descripción
21	Zona de unión 3' de 20-nt del cóntigo-3 (3' transgén/3' genómico; 10-nt/10-nt)
22	Zona de unión 5' de 40-nt del cóntigo-3 (5' genómico/5' transgén; 20-nt/20-nt)
23	Zona de unión 3' de 40-nt del cóntigo-3 (3' transgén/3' genómico; 20-nt/20-nt)
24	Zona de unión 5' de 60-nt del cóntigo-3 (5' genómico/5' transgén; 30-nt/30-nt)
25	Zona de unión 3' de 60-nt del cóntigo-3 (3' transgén/3' genómico; 30-nt/30-nt)
26	Cebador directo de la zona de unión 5' del cóntigo-1 05-O-975
27	Cebador inverso de la zona de unión 5' del cóntigo-1 05-O-977
28	Cebador de la zona de unión 5' del cóntigo-1 05-QP22
29	Cebador directo de la zona de unión 5' del cóntigo-1 06-O-1573
30	Cebador inverso de la zona de unión 5' del cóntigo-1 06-O-1487
31	Cebador directo de la zona de unión 3' del cóntigo-1 06-O-1414
32	Cebador inverso de la zona de unión 3' del cóntigo-1 06-O-1579
33	Cebador directo de la zona de unión 3' del cóntigo-1 06-O-1577
34	Cebador inverso de la zona de unión 3' del cóntigo-1 06-O-1579
35	Cebador directo de la zona de unión 5' del cóntigo-2 06-O-1586
36	Cebador inverso de la zona de unión 5' del cóntigo-2 06-O-1585
37	Cebador directo de la zona de unión 3' del cóntigo-2 06-O-1404
38	Cebador inverso de la zona de unión 3' del cóntigo-2 06-O-1590
39	Cebador directo de la zona de unión 5' del cóntigo-3 06-O-1626
40	Cebador inverso de la zona de unión 5' del cóntigo-3 06-O-1366
41	Cebador directo de la zona de unión 3' del cóntigo-3 06-O-1569
42	Cebador inverso de la zona de unión 3' del cóntigo-3 06-O-1551
43	Cebador directo de la zona de unión 5' del cóntigo-1 06-O-1571
44	Cebador inverso de la zona de unión 5' del cóntigo-1 06-O-1572
45	Cebador directo de la zona de unión 5' del cóntigo-1 06-O-1351
46	Cebador inverso de la zona de unión 5' del cóntigo-1 06-O-1367
47	Cebador directo de la inserción del cóntigo-1 06-O-1357
48	Cebador inverso de la inserción del cóntigo-1 06-O-1368
49	Cebador inverso de la inserción del cóntigo-1 06-O-1369
50	Cebador directo de la inserción del cóntigo-1 06-O-1356
51	Cebador inverso de la inserción del cóntigo-1 06-O-1371
52	Cebador directo de la inserción del cóntigo-1 06-O-1360
53	Cebador inverso de la inserción del cóntigo-1 06-O-1423
54	Cebador directo de la inserción del cóntigo-1 06-O-1363
55	Cebador directo de la inserción del cóntigo-1 06-O-1421
56	Cebador inverso de la zona de unión 3' del cóntigo-1 06-O-1578
57	Cebador directo de la región 5' del contigo-1 07-O-1889
58	Cebador inverso de la región 5' del contigo-1 07-O-1940

ES 2 582 552 T3

Tabla resumen de SEQ ID NO:	
SEQ ID NO:	Descripción
59	Cebador inverso de la región 3' del contiguo-1 07-O-1892
60	Cebador directo de la región 3' del contiguo-1 07-O-1894
61	Cebador directo de la zona de unión 5' del cóntigo-2 06-O-1588
62	Cebador inverso de la zona de unión 5' del cóntigo-2 06-O-1403
63	Cebador inverso de la zona de unión 3' del cóntigo-2 06-O-1592
64	Cebador directo de la región 5' del contiguo-2 07-O-1895
65	Cebador inverso de la región 5' del contiguo-2 07-O-1898
66	Cebador directo de la región 3' del contiguo-2 07-O-1905
67	Cebador inverso de la región 3' del contiguo-2 07-O-1903
68	Cebador directo de la zona de unión 5' del cóntigo-3 06-O-1669
69	Cebador inverso de la zona de unión 5' del cóntigo-3 06-O-1426
70	Cebador directo de la inserción del cóntigo-3 06-O-1355
71	Cebador inverso de la inserción del cóntigo-3 06-O-1459
72	Cebador directo de la zona de unión 3' del cóntigo-3 05-O-1182
73	Cebador inverso de la zona de unión 3' del cóntigo-3 06-O-1672
74	Cebador directo de la región 5' del contiguo-3 07-O-1881
75	Cebador inverso de la región 5' del contiguo-3 07-O-1882
76	Cebador directo de la región 3' del contiguo-3 07-O-1886
77	Cebador inverso de la región 3' del contiguo-3 07-O-1884
78	Cebador directo de la zona de unión 5' del cóntigo-4 HOS-A
79	Cebador inverso de la zona de unión 5' del cóntigo-4 HOS-B
80	Cebador inverso de la zona de unión 3' del cóntigo-4 HOS-C
81	Cebador directo de la zona de unión 3' del cóntigo-4 HOS-D
82	Cóntigo-4 de DP-305423-1
83	Zona de unión 5' de 20-nt del cóntigo-4 (5' genómico/5' transgén; 10-nt/10-nt)
84	Zona de unión 3' de 20-nt del cóntigo-4 (3' transgén/3' genómico; 10-nt/10-nt)
85	Zona de unión 5' de 40-nt del cóntigo-4 (5' genómico/5' transgén; 20-nt/20-nt)
86	Zona de unión 3' de 40-nt del cóntigo-4 (3' transgén/3' genómico; 20-nt/20-nt)
87	Zona de unión 5' de 60-nt del cóntigo-4 (5' genómico/5' transgén; 30-nt/30-nt)
88	Zona de unión 3' de 60-nt del cóntigo-4 (3' transgén/3' genómico; 30-nt/30-nt)
89	Cebador directo QPCR de la zona de unión 5' del cóntigo-1
90	Cebador inverso QPCR de la zona de unión 5' del cóntigo-1
91	Sonda QPCR de la zona de unión 5' del cóntigo-1
92	Cebador directo QPCR de SAMS-HRA
93	Cebador inverso QPCR de SAMS-HRA
94	Sonda QPCR de SAMS-HRA

Descripción detallada de la invención

La presente invención se describirá con más detalle a continuación remitiéndose los dibujos adjuntos, en los que se

muestran algunas, pero no todas, de las realizaciones de la invención.

A los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención se les ocurrirán muchas modificaciones y otras realizaciones de la invención indicada en la presente, aprovechando las indicaciones presentadas en las anteriores descripciones y los dibujos asociados. Aunque en la presente se emplean términos y expresiones específicos, estos se emplean solo en un sentido genérico y descriptivo, y no pretenden ser limitantes.

En la descripción de la presente invención se emplean las siguientes abreviaturas:

ALS: proteína de acetolactato sintasa

pb: par de bases

FAD2: proteína de omega-6 desaturasa microsómica

10 *gm-fad2-1*: gen 1 de omega-6 desaturasa microsómica de soja

gm-als: gen de acetolactato sintasa de tipo salvaje de soja

gm-hra: versión modificada del gen de acetolactato sintasa de soja

kb: kilobase

PCR: reacción en cadena de polimerasa

15 UTR: región no traducida

Se proporcionan composiciones y métodos relacionados con plantas de sojas tolerantes al inhibidor de ALS/con alto contenido en ácido oleico transgénicas. De modo específico, la presente invención proporciona plantas de soja que contienen un acontecimiento DP-305423-1. Una planta de soja que contiene el "acontecimiento DP-305423-1" se ha modificado mediante la inserción de un módulo de supresión que contiene un fragmento de 597 pb del gen 1 de omega-6 desaturasa microsómica de soja (*gm-fad2-1*) y un módulo de expresión que contiene una versión modificada del gen de acetolactato sintasa de soja (*gm-hra*). La inserción del módulo de supresión de *gm-fad2-1* en la planta confiere un fenotipo de alto contenido en ácido oleico. La inserción del gen *gm-hra* produce una forma modificada de la enzima acetolactato sintasa (ALS). La ALS es fundamental para la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada y es inhibida por ciertos herbicidas. La modificación en el gen *gm-hra* supera esta inhibición y, por tanto, proporciona tolerancia a una amplia gama de herbicidas inhibidores de ALS. Así, una planta de soja que contenga un acontecimiento DP-305423-1 tiene un fenotipo de alto contenido en ácido oleico y es tolerante al menos a un herbicida inhibidor de ALS.

Los polinucleótidos que confieren el fenotipo de alto contenido en ácido oleico y tolerancia al inhibidor de ALS están enlazados genéticamente en el genoma de soja en el acontecimiento DP-305423-1 de soja. La planta de soja que porta el acontecimiento DP-305423-1 comprende zonas de unión genómicas/del transgén que tienen al menos la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO:8, 9, 14, 15, 20, 21, 83, y 84. La caracterización del sitio de inserción genómico del acontecimiento DP-305423-1 proporciona una mayor eficacia de reproducción y permite el uso de marcadores moleculares para seguir la pista de la inserción del transgén en las poblaciones reproductoras y su progenie. En la presente se proporcionan diversos métodos y composiciones para la identificación, la detección y el uso de acontecimientos DP-305423-1 de soja. Tal como se emplea en la presente, la expresión "específico del acontecimiento DP-305423-1" se refiere a una secuencia polinucleotídica que es adecuada para identificar, de modo discriminante, el acontecimiento DP-305423-1 en plantas, material vegetal, o en productos tales como, pero sin limitarse a productos alimentarios o de piensos (frescos o procesados) que comprenden o se derivan de material vegetal.

Tal como se emplea en la presente, el término "soja" significa *Glycine max* e incluye todas las variedades de plantas que pueden cruzarse con la soja. Tal como se emplea en la presente, el término planta incluye células vegetales, órganos vegetales, protoplastos vegetales, cultivos de tejido de células vegetales a partir de los cuales pueden regenerarse plantas, callos vegetales, matas vegetales, y células vegetales que están intactas en plantas o partes de plantas, tales como embriones, polen, óvulos, semillas, hojas, flores, ramas, frutos, tallos, raíces, zonas apicales de las raíces, anteras y similares. Grano significa la semilla madura producida por cultivadores comerciales para objetivos distintos del crecimiento o la reproducción de la especie. En la presente se describen la progenie, los variantes y los mutantes de las plantas regeneradas que comprenden el acontecimiento DP-305423-1.

Un "acontecimiento" transgénico se produce mediante la transformación de células vegetales con una o más construcciones de ADN heterólogas, que incluyen un módulo de expresión de ácido nucleico que comprende 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. Un acontecimiento se caracteriza fenotípicamente por la expresión del transgén o transgenes. A nivel genético, un acontecimiento es parte de la constitución genética de una planta. El término "acontecimiento" también se refiere a la progenie producida mediante reproducción sexual entre el transformante y otra variedad que

incluye el ADN heterólogo. Incluso después de repetidos retrocruzamientos hasta lograr un progenitor recurrente, el ADN insertado y el ADN flanqueante del progenitor transformado están presentes en la progenie del cruzamiento en la misma localización cromosómica. El término "acontecimiento" también se refiere a ADN del transformante original que comprende el ADN insertado y la secuencia flanqueante inmediatamente adyacente al ADN insertado que se espera que sea transferido a la progenie que recibe el ADN insertado que incluye el transgén de interés, como resultado de una reproducción sexual de una línea progenitora que incluye el ADN insertado (por ejemplo, el transformante original y la progenie que resulta de la autofecundación) y una línea progenitora que no contiene el ADN insertado.

Tal como se emplea en la presente, una "inserción de ADN" se refiere al ADN heterólogo dentro de los módulos de expresión empleados para transformar el material vegetal, mientras que el "ADN flanqueante" puede comprender ADN genómico presente en la naturaleza en un organismo, tal como una planta, o ADN extraño (heterólogo) introducido a través del proceso de transformación, que es extraño a la molécula de la inserción de ADN original, por ejemplo, fragmentos asociados con el acontecimiento de transformación. Una "región flanqueante" o "secuencia flanqueante", tal como se emplea en la presente, se refiere a una secuencia de al menos 20, 50, 100, 200, 300, 400, 1000, 1500, 2000, 2500, o 5000 pares de bases o mayor, que se localiza inmediatamente cadena arriba y contigua, o inmediatamente cadena abajo y contigua, a la molécula de la inserción de ADN extraño original. Se indican ejemplos de las regiones flanqueantes del acontecimiento DP-305423-1 en SEQ ID NO:5, 6, 7 y 82 y sus fragmentos.

Los procedimientos de transformación que conducen a la integración aleatoria del ADN extraño producirán transformantes que contienen diferentes regiones flanqueantes características y exclusivas para cada transformante. Una "zona de unión" es un punto en el que se unen dos fragmentos de ADN específicos. Por ejemplo, existe una zona de unión en donde la inserción de ADN se une al ADN genómico flanqueante. También existe un punto de zona de unión en un organismo transformado en donde dos fragmentos de ADN se unen de una manera que es distinta de la que se encuentra en el organismo nativo. Tal como se emplea en la presente, un "ADN de zona de unión" se refiere al ADN que comprende un punto de zona de unión. Se indican ejemplos de ADN de zona de unión del acontecimiento DP-305423-1 en SEQ ID NO:5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 o 88, o sus fragmentos.

Puede obtenerse una planta DP-305423-1 realizando en primer lugar una reproducción sexual entre una primera planta de soja progenitora cultivada a partir de la planta de soja DP-305423-1 transgénica (o su progenie derivada de la transformación con los módulos de expresión descritos en la presente que confieren tolerancia a herbicidas) y una segunda planta de soja progenitora que carece del fenotipo de tolerancia al herbicida, produciendo con ello una pluralidad de plantas de la primera progenie; y después seleccionando una planta de la primera progenie que muestre la tolerancia al herbicida deseada; y realizando una autofecundación con la planta de la primera progenie, produciendo con ello una pluralidad de plantas de la segunda progenie; y después seleccionando, a partir de las plantas de la segunda progenie, las plantas que muestran la tolerancia al herbicida deseada. Estas etapas pueden incluir además el retrocruzamiento de la planta de la primera progenie tolerante al herbicida o la planta de la segunda progenie tolerante al herbicida, con la segunda planta de soja progenitora o una tercera planta de soja progenitora, produciendo con ello una planta de soja que muestra la tolerancia al herbicida deseada. También se reconoce que no es necesario ensayar la progenie para el fenotipo. Pueden emplearse diversos métodos y composiciones, tal como se describe en otros puntos en la presente, para detectar y/o identificar el acontecimiento DP-305423-1.

Además se entiende que dos plantas transgénicas diferentes también pueden cruzarse para producir descendencia que contenga dos genes exógenos añadidos que se segregan independientemente. La autofecundación de la progenie apropiada puede producir plantas que son homocigóticas para ambos genes exógenos añadidos. También se contempla el retrocruzamiento hasta la planta progenitora y el cruzamiento exogámico con una planta no transgénica, así como la propagación vegetativa. Pueden encontrarse descripciones de otros métodos de reproducción que se emplean habitualmente para diferentes rasgos y cultivos en una de varias referencias bibliográficas, por ejemplo, Fehr, en *Breeding Methods for Cultivar Development*, Wilcos J. ed., American Society of Agronomy, Madison Wis. (1987).

Una aplicación particularmente útil de la invención reivindicada es combinar el rasgo de alto contenido en ácido oleico del acontecimiento DP-305423-1 con otras líneas de soja que tengan composiciones alteradas de ácidos grasos para obtener líneas de progenie con nuevas composiciones de ácidos grasos y/o mejores rasgos agronómicos. Las otras líneas de soja pueden ser líneas mutantes, líneas transgénicas, o líneas transgénicas que también comprenden un gen mutado. Los transgenes de DP-305423-1 pueden combinarse con genes mutantes u otros transgenes realizando un cruzamiento genético o transformando la otra línea de soja con las construcciones de ADN recombinante descritas en la presente.

Como ejemplos, el rasgo de alto contenido en ácido oleico de la invención puede combinarse con una línea mutante que tenga un fenotipo de alto contenido en ácido esteárico, tal como la línea de soja A6 [Hammond, E. G. y Fehr, W. R. (1983)] o con una línea mutante que tenga un fenotipo de bajo contenido en ácido linolénico, tal como las líneas de soja mutantes A5, A23, A16 y C1640 [Fehr, W. R. *et al.* (1992), en *Crop Science*, 32:903-906]. Los aceites producidos a partir de dichas combinaciones proporcionarán mejores materias primas para la producción de

margarinas, mantecas, aceites de revestimiento por pulverización y para freír, que eliminen o reduzcan la necesidad de una hidrogenación. Además, estos aceites proporcionan un beneficio para la salud de los consumidores, por ejemplo, reduciendo o eliminando los ácidos grasos trans, que se ha descubierto que están asociados con un alto riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares.

- 5 El rasgo de alto contenido en ácido oleico de la invención también puede combinarse con líneas mutantes que tengan un fenotipo de alto contenido en ácido oleico. Los ejemplos de líneas mutantes de alto contenido en ácido oleico incluyen las líneas de soja A5 y N782245 [Martin, B. A. y Rinne, R. W. (1985), *Crop Science*, 25:1055-1058].

10 Tal como se emplea en la presente, el uso del término "polinucleótido" no pretende limitar la presente invención a los polinucleótidos que comprenden ADN. Los expertos en la técnica reconocerán que los polinucleótidos pueden comprender ribonucleótidos y combinaciones de ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos. Estos ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos incluyen moléculas naturales y análogos sintéticos. Los polinucleótidos de la invención también incluyen todas las formas de secuencias que incluyen, pero no se limitan a las formas monocatenarias, las formas bicatenarias, las horquillas, las estructuras de tallo y bucle, y similares.

15 Una planta DP-305423-1 comprende un módulo de supresión que contiene un fragmento de 597 pb del gen 1 de omega-6 desaturasa microsómica de soja (*gm-fad2-1*) y un módulo de expresión que contiene una versión modificada del gen de acetolactato sintasa de soja (*gm-hra*). El módulo puede incluir secuencias reguladoras 5' y 3' unidas operablemente a los polinucleótidos *gm-fad2-1* y *gm-hra*. "Unido operablemente" significa un enlace funcional entre dos o más elementos. Por ejemplo, un enlace operable entre un polinucleótido de interés y una secuencia reguladora (es decir, un promotor) es un enlace funcional que permite la expresión del polinucleótido de interés. Los
20 elementos unidos operablemente pueden ser contiguos o no contiguos. Cuando se emplea para indicar la unión de dos regiones codificadoras de proteínas, unido operablemente significa que las regiones codificadoras están en el mismo marco de lectura. El módulo puede contener también al menos un gen adicional que va a ser cotransformado hacia el interior del organismo. Como alternativa, el gen o genes adicionales pueden proporcionarse sobre múltiples módulos de expresión. Este módulo de expresión se proporciona con una pluralidad de sitios de restricción y/o sitios
25 de recombinación para la inserción del polinucleótido que está bajo la regulación transcripcional de las regiones reguladoras. El módulo de expresión puede contener también genes de marcadores seleccionables.

El módulo de expresión incluirá, en la dirección 5'-3' de la transcripción, una región de inicio transcripcional y traduccional (es decir, un promotor), una región codificadora, y una región de terminación transcripcional y traduccional funcional en plantas. Un "promotor" se refiere a una secuencia de nucleótidos capaz de controlar la
30 expresión de una secuencia codificadora o un ARN funcional. En general, una secuencia codificadora se localiza 3' con respecto a una secuencia de promotor. La secuencia de promotor puede comprender elementos proximales y más distales cadena arriba, y estos últimos elementos a menudo se denominan potenciadores. Por consiguiente, un "potenciador" es una secuencia de nucleótidos que puede estimular la actividad del promotor y puede ser un elemento innato del promotor o un elemento heterólogo insertado para potenciar el nivel o especificidad de tejido de un promotor. Los promotores pueden derivarse, en su totalidad, de un gen nativo, o pueden estar compuestos de
35 diferentes elementos derivados de diferentes promotores que se encuentran en la naturaleza, o incluso comprender segmentos de nucleótidos sintéticos. Los expertos en la técnica entienden que diferentes promotores pueden dirigir la expresión de un gen en diferentes tejidos o tipos de células, o en diferentes etapas de desarrollo, o en respuesta a diferentes condiciones ambientales. Los promotores que provocan que un fragmento de ácido nucleico pueda expresarse en la mayoría de los tipos de células la mayoría de las veces se denominan habitualmente "promotores constitutivos". Constantemente se están descubriendo nuevos promotores de diversos tipos útiles en células vegetales; pueden encontrarse numerosos ejemplos en la compilación de Okamura y Goldberg (1989), *Biochemistry of Plants*, 15: 1-82. También se reconoce que, puesto que en la mayoría de los casos, los límites exactos de las secuencias reguladoras aún no se han definido por completo, fragmentos de ácidos nucleicos de diferente longitud
40 pueden tener una actividad de promotor idéntica.

Los módulos de expresión también pueden contener secuencias conductoras 5'. Estas secuencias conductoras pueden actuar para potenciar la traducción. Las regiones reguladoras (es decir, promotores, regiones reguladoras transcripcionales, regiones de estabilidad o procesamiento de ARN, intrones, señales de poliadenilación, y regiones de terminación de la traducción) y/o la región codificadora pueden ser nativas/análogas o heterólogas para la célula
50 hospedante o entre sí.

La "secuencia conductora de la traducción" se refiere a una secuencia de nucleótidos localizada entre la secuencia de promotor de un gen y la secuencia codificadora. La secuencia conductora de la traducción está presente en el ARNm totalmente procesado cadena arriba de la secuencia de inicio de la traducción. La secuencia conductora de la traducción puede afectar a numerosos parámetros, que incluyen el procesamiento de la transcripción primaria a ARNm, la estabilidad del ARNm y/o la eficacia de la traducción. Se han descrito ejemplos de secuencias conductoras de la traducción (Turner y Foster (1995), *Mol. Biotechnol.*, 3:225-236). Las "secuencias no codificadoras 3'" se refieren a secuencias de nucleótidos localizadas cadena abajo de una secuencia codificadora e incluyen secuencias de reconocimiento de la poliadenilación y otras secuencias que codifican señales reguladoras capaces de afectar al procesamiento del ARNm o a la expresión génica. La señal de poliadenilación habitualmente se caracteriza porque afecta a la adición de tramos de poli(ácido adenílico) al extremo 3' del precursor de ARNm. El uso de diferentes secuencias no codificadoras 3' se ejemplifica en Ingelbrecht *et al.* (1989), *Plant Cell*, 1:671-680.

Tal como se emplea en la presente, "heterólogo", en referencia a una secuencia, es una secuencia que se origina de una especie extraña o, si es de la misma especie, está sustancialmente modificada con respecto a su forma nativa en composición y/o locus genómico por una intervención humana deliberada. Por ejemplo, un promotor unido operablemente a un polinucleótido heterólogo procede de una especie diferente de la especie de la que se deriva el polinucleótido o, si procede de la misma especie/una especie análoga, uno o ambos están sustancialmente modificados con respecto a su forma nativa y/o locus genómico, o el promotor no es el promotor nativo para el polinucleótido unido operablemente.

Cuando se prepara el módulo de expresión, los diversos fragmentos de ADN pueden manipularse para proporcionar las secuencias de ADN en la orientación apropiada y, según sea apropiado, en el marco de lectura apropiado. Para este fin pueden emplearse adaptadores o conectores para unir los fragmentos de ADN o pueden estar implicadas otras manipulaciones para proporcionar sitios de restricción convenientes, la eliminación de ADN superfluo, la eliminación de sitios de restricción o similares. Para este fin, puede estar implicada la mutagénesis *in vitro*, la reparación de cebadores, la restricción, la reasociación, las resustituciones, por ejemplo, transiciones y transversiones. El módulo de expresión puede contener también un gen de marcador seleccionable para la selección de las células transformadas. Los genes de marcadores seleccionables se emplean para la selección de células o tejidos transformados.

Se proporcionan polinucleótidos aislados que pueden utilizarse en diversos métodos para la detección y/o identificación del acontecimiento DP-305423-1 de soja. Un polinucleótido "aislado" o "purificado", o una de sus porciones biológicamente activas, está sustancial o fundamentalmente exento de componentes que normalmente acompañan o interaccionan con el polinucleótido tal como se encuentra en su entorno natural. Así, un polinucleótido aislado o purificado está sustancialmente exento de cualquier otro material celular, o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas recombinantes, o está sustancialmente exento de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza de modo químico. De manera óptima, un polinucleótido "aislado" está exento de secuencias (de modo óptimo, secuencias codificadoras de proteínas) que flanquean al polinucleótido en la naturaleza (es decir, secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del polinucleótido) en el ADN genómico del organismo del cual se deriva el polinucleótido. Por ejemplo, en diversas realizaciones, el polinucleótido aislado puede contener menos de aproximadamente 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb, o 0,1 kb de la secuencia de nucleótidos que flanquea al polinucleótido en la naturaleza en el ADN genómico de la célula de la cual se deriva el polinucleótido.

En realizaciones específicas, los polinucleótidos de la invención comprenden la secuencia de ADN de la zona de unión indicada en SEQ ID NO:8, 9, 15, 20, 21 o 84. En otras realizaciones, los polinucleótidos de la invención comprenden las secuencias de ADN de la zona de unión indicada en SEQ ID NO:5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 84, 85, 86, 87 o 88, o sus complementos. Los fragmentos y variantes de las secuencias de ADN de la zona de unión son adecuados para identificar, de modo discriminante, el acontecimiento DP-305423-1. Tal como se analiza en otro punto de la presente, estas secuencias son útiles como cebadores y/o sondas.

Los polinucleótidos descritos en la presente comprenden polinucleótidos que pueden detectar un acontecimiento DP-305423-1 o una región específica de DP-305423-1. Estas secuencias incluyen cualquier polinucleótido indicado en SEQ ID NO:1-94, o sus variantes y fragmentos. Los fragmentos y variantes de los polinucleótidos que detectan un acontecimiento DP-305423-1 o una región específica de DP-305423-1 son adecuados para identificar, de modo discriminante, el acontecimiento DP-305423-1. Tal como se analiza en otro punto de la presente, estas secuencias son útiles como cebadores y/o sondas. También se describen secuencias de cebadores de nucleótidos de ADN aislados que comprenden o consisten en una secuencia indicada en SEQ ID NO: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, 89, 90, 91, 92, 93 o 94, o su complemento.

"Variantes" significa secuencias sustancialmente similares. Para los polinucleótidos, un variante comprende un polinucleótido que presenta deleciones (es decir, truncamientos) en el extremo 5' y/o 3'; la deleción y/o la adición de uno o más nucleótidos en uno o más sitios internos en el polinucleótido nativo; y/o la sustitución de uno o más nucleótidos en uno o más sitios en el polinucleótido nativo.

Tal como se emplea en la presente, una "sonda" es un polinucleótido aislado al cual está unido un marcador detectable o molécula indicadora convencional, por ejemplo, un isótopo radiactivo, ligando, agente quimioluminiscente, enzima, etc. Esta sonda es complementaria con una hebra de un polinucleótido diana, en el caso de la presente invención, con una hebra de ADN aislado del acontecimiento DP-305423-1 de soja, tanto de una planta de soja como de una muestra que incluya ADN del acontecimiento. Las sondas según la presente invención incluyen no solo ácidos desoxirribonucleicos o ribonucleicos, sino también poliamidas y otros materiales de sondas que pueden detectar específicamente la presencia de la secuencia de ADN diana.

Tal como se emplea en la presente, los "cebadores" son polinucleótidos aislados que se asocian con una hebra de ADN diana complementaria y, mediante hibridación de ácidos nucleicos, forman un híbrido entre el cebador y la hebra de ADN diana, y después se extienden a lo largo de la hebra del ADN diana mediante una polimerasa, por ejemplo, una ADN polimerasa. Las parejas de cebadores de la invención se refieren a su uso para la amplificación

de un polinucleótido diana, por ejemplo, mediante una reacción en cadena de polimerasa (PCR) u otros métodos de amplificación de ácidos nucleicos convencionales. La "PCR" o "reacción en cadena de polimerasa" es una técnica empleada para la amplificación de segmentos de ADN específicos (véanse las patentes de EEUU n.^{os} 4.683.195 y 4.800.159). Cualquier combinación de cebadores descritos en la presente puede utilizarse si la pareja permite la

5 detección de un acontecimiento o región específica de DP-305423-1. Los ejemplos de parejas de cebadores incluyen SEQ ID NO:26 y 27; SEQ ID NO:29 y 30; SEQ ID NO:31 y 32; SEQ ID NO:33 y 34; SEQ ID NO:35 y 36; SEQ ID NO:37 y 38; SEQ ID NO:39 y 40; SEQ ID NO:41 y 42; SEQ ID NO:43 y 44; SEQ ID NO:45 y 46; SEQ ID NOS:47 y 48; SEQ ID NO:47 y 49; SEQ ID NO:50 y 51; SEQ ID NO:52 y 53; SEQ ID NO:54 y 49; SEQ ID NO:55 y 46; SEQ ID NO:33 y 56; SEQ ID NO:57 y 58; SEQ ID NO:59 y 60; SEQ ID NO:61 y 36; SEQ ID NO:35 y 62; SEQ ID

10 NO:37 y 63; SEQ ID NO:64 y 65; SEQ ID NO:66 y 67; SEQ ID NOS:68 y 69; SEQ ID NO:70 y 71; SEQ ID NO:72 y 73; SEQ ID NO:74 y 75; SEQ ID NO:76 y 77; SEQ ID NO:78 y 79; SEQ ID NO:80 y 81; y SEQ ID NO:89 y 90.

Las sondas y cebadores tienen una longitud de nucleótidos suficiente para unirse a la secuencia de ADN diana y detectar y/o identificar específicamente un polinucleótido que contiene un acontecimiento DP-305423-1. Se reconoce que las condiciones de hibridación o condiciones de reacción pueden ser determinadas por el operario para lograr

15 este resultado. Esta longitud puede ser cualquier longitud que sea una longitud suficiente para ser útil en el método de detección elegido. En general, se emplean 8, 11, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 40, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 nucleótidos o más, o entre aproximadamente 11-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-100, 100-200, 200-300, 300-400, 400-500, 500-600, 600-700, 700-800, o más nucleótidos de longitud. Estas sondas y cebadores pueden hibridarse específicamente con una secuencia diana bajo condiciones de hibridación de alta rigurosidad. Las

20 sondas y cebadores según las realizaciones de la presente invención pueden tener una identidad de secuencia de ADN completa de nucleótidos contiguos con la secuencia diana, aunque pueden diseñarse por métodos convencionales sondas que se diferencien de la secuencia de ADN diana y que conserven la capacidad para detectar y/o identificar específicamente una secuencia de ADN diana. Por consiguiente, las sondas y los cebadores pueden compartir aproximadamente 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de

25 identidad de secuencia o complementariedad con el polinucleótido diana (es decir, SEQ ID NO:1-94), o pueden diferir de la secuencia diana (es decir, SEQ ID NO:1-94) en 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más nucleótidos. Las sondas pueden emplearse como cebadores, pero en general se diseñan para unirse al ADN o ARN diana y no se emplean en un proceso de amplificación.

Pueden emplearse cebadores específicos para amplificar un fragmento de integración para producir un amplicón que puede utilizarse como "sonda específica" o, en sí mismo, puede detectarse para identificar el acontecimiento DP-305423-1 en muestras biológicas. Como alternativa, una sonda para su uso en los métodos de la invención puede utilizarse durante la reacción de PCR para permitir la detección del acontecimiento de amplificación (concretamente, una sonda Taqman). Cuando la sonda se hibrida con los polinucleótidos de una muestra biológica

30 bajo condiciones que permiten la unión de la sonda a la muestra, esta unión puede detectarse y, así, se logra una indicación de la presencia del acontecimiento DP-305423-1 en la muestra biológica. Esta identificación de una sonda unida se ha descrito en la técnica. En una realización de la invención, la sonda específica es una secuencia que, bajo condiciones optimizadas, se hibrida específicamente con una región dentro de la región flanqueante 5' o 3' del acontecimiento y también comprende una parte del ADN extraño contiguo en su interior. La sonda específica puede comprender una secuencia al menos 80%, entre 80 y 85%, entre 85 y 90%, entre 90 y 95%, y entre 95 y 100% idéntica (o complementaria) con una región específica del acontecimiento DP-305423-1.

40

Tal como se emplea en la presente, un "ADN amplificado" o "amplicón" se refiere al producto de la amplificación del polinucleótido de un polinucleótido diana que es parte de un molde de ácido nucleico. Por ejemplo, para determinar si una planta de soja que resulta de la reproducción sexual contiene el acontecimiento DP-305423-1, el ADN extraído de la muestra de tejido de la planta de soja puede someterse a un método de amplificación de polinucleótidos empleando una pareja de cebadores de ADN que incluya un primer cebador derivado de la

45 secuencia flanqueante 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 acontecimiento DP-305423-1. Que sea "diagnóstico" para un acontecimiento DP-305423-1 significa el uso de cualquier método o ensayo que pueda discriminar entre la presencia o la ausencia de un acontecimiento DP-305423-1 en una muestra biológica. Como alternativa, el segundo cebador puede derivarse de la secuencia flanqueante. Las parejas de cebadores pueden derivarse de la secuencia flanqueante en ambos lados del ADN insertado, de modo que se produce un amplicón que incluye el polinucleótido de la inserción completo de la construcción de expresión, así como la secuencia que flanquea la inserción transgénica. El amplicón tiene una

50 longitud y una secuencia que también son diagnósticas para el acontecimiento (es decir, tiene un ADN de la zona de unión de un acontecimiento DP-305423-1). El amplicón puede tener una longitud que varía desde la longitud combinada de las parejas de cebadores más un par de bases de nucleótidos, hasta cualquier longitud del amplicón que pueda producirse mediante un protocolo de amplificación de ADN. Un miembro de una pareja de cebadores derivado de la secuencia flanqueante puede localizarse a una distancia de la secuencia de ADN insertada, y esta distancia puede variar desde un par de bases de nucleótidos hasta los límites de la reacción de amplificación, o

55 aproximadamente veinte mil pares de bases de nucleótidos. El uso del término "amplicón" excluye específicamente los dímeros de cebadores que puedan formarse en la reacción de amplificación térmica del ADN.

60

Los métodos para preparar y utilizar sondas y cebadores se describen, por ejemplo, en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2^a ed., vol. 1-3, ed. Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor,

N.Y., 1989 (en lo sucesivo, "Sambrook *et al.*, 1989"); Current Protocols in Molecular Biology, ed. Ausubel *et al.*, Greene Publishing and Wiley-Interscience, Nueva York, 1992 (con actualizaciones periódicas) (en lo sucesivo, "Ausubel *et al.*, 1992"); e Innis *et al.*, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press: San Diego, 1990. Las parejas de cebadores de PCR pueden derivarse de una secuencia conocida, por ejemplo, empleando programas informáticos previstos para ese fin, tales como la herramienta de análisis de cebadores de PCR en Vector NTI versión 6 (Informax Inc., Bethesda Md.); PrimerSelect (DNASTAR Inc., Madison, Wis.); y Primer (versión 0.5.COPYRGT., 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, Mass.). Además, la secuencia puede ser visualmente escaneada y los cebadores pueden identificarse de forma manual empleando las directrices conocidas por los expertos en la técnica.

Debe entenderse que, tal como se emplea en la presente, el término "transgénico" incluye cualquier célula, línea celular, callo, tejido, parte de una planta, o planta, cuyo genotipo ha sido alterado por la presencia de un ácido nucleico heterólogo, que incluye los transgénicos que inicialmente han sido alterados de esta manera, así como los creados por reproducción sexual o propagación asexual a partir del transgénico inicial. El término "transgénico", tal como se emplea en la presente, no incluye la alteración del genoma (cromosómico o extracromosómico) mediante métodos de cruzamientos de plantas convencionales o por acontecimientos naturales, tales como fertilización cruzada aleatoria, infección vírica no recombinante, transformación bacteriana no recombinante, transposición no recombinante, o mutación espontánea.

Una "transformación" se refiere a la transferencia de un fragmento de ácido nucleico hacia el genoma de un organismo hospedante, que resulta en una herencia genéticamente estable. Los organismos hospedantes que contienen los fragmentos de ácidos nucleicos transformados se denominan organismos "transgénicos". Los ejemplos de métodos de transformación de plantas incluyen la transformación de plantas mediada por *Agrobacterium* (De Blaere *et al.* (1987), Meth. Enzymol., 143:277) y la tecnología de transformación por partículas aceleradas o "de pistola de genes" (Klein *et al.* (1987), Nature (Londres), 327:70-73; patente de EEUU n.º 4.945.050). A continuación se describen otros métodos de transformación.

Así, los polinucleótidos aislados de la invención pueden incorporarse en las construcciones recombinantes, generalmente construcciones de ADN, que son capaces de introducirse y replicarse en una célula hospedante. Esta construcción puede ser un vector que incluya un sistema de replicación y secuencias que son capaces de transcribir y traducir una secuencia codificadora de polipéptido en una célula hospedante concreta. Se han descrito una serie de vectores para la transfección estable de células vegetales o para el establecimiento de plantas transgénicas, por ejemplo, en Pouwels *et al.* (1985; sup. 1987), Cloning Vectors: A Laboratory Manual; Weissbach y Weissbach (1989), Methods for Plant Molecular Biology (Academic Press, Nueva York); y Flevin *et al.* (1990), Plant Molecular Biology Manual (Kluwer Academic Publishers). Generalmente, los vectores de expresión en plantas incluyen, por ejemplo, uno o más genes vegetales clonados bajo el control transcripcional de secuencias reguladoras 5' y 3' y un marcador seleccionable dominante. Estos vectores de expresión en plantas también contienen una región reguladora de promotor (por ejemplo, una región reguladora que controla la expresión inducible o constitutiva, regulada por el entorno o por el desarrollo, o específica de célula o tejido), un sitio de inicio de la transcripción, un sitio de unión a ribosomas, una señal de procesamiento del ARN, un sitio de terminación de la transcripción y/o una señal de poliadenilación.

Se proporcionan diversos métodos y composiciones para identificar el acontecimiento DP-305423-1. Estos métodos son útiles para identificar y/o detectar un acontecimiento DP-305423-1 en cualquier material biológico. Estos métodos incluyen, por ejemplo, métodos para confirmar la pureza de las semillas y métodos para seleccionar semillas en un lote de semillas para un acontecimiento DP-305423-1. En la presente se describe un método para identificar el acontecimiento DP-305423-1 en una muestra biológica, y comprende poner en contacto la muestra con un primer y un segundo cebador; y amplificar un polinucleótido que comprende una región específica de DP-305423-1.

Una muestra biológica puede comprender cualquier muestra en la que se desee determinar si está presente un ADN que contenga el acontecimiento DP-305423-1. Por ejemplo, una muestra biológica puede comprender cualquier material vegetal o un material que comprenda o se deriva de un material vegetal tal como, pero sin limitarse a productos alimentarios o de piensos. Tal como se emplea en la presente, un "material vegetal" se refiere a un material que se obtiene o se deriva de una planta o de una parte de una planta. En realizaciones específicas, la muestra biológica comprende un tejido de soja.

Los cebadores y las sondas basados en las secuencias de ADN flanqueante y de la inserción descritos en la presente pueden emplearse para confirmar (y, si es necesario, para corregir) las secuencias descritas por métodos convencionales, por ejemplo, mediante reclonación y secuenciación de dichas secuencias. Las sondas y los cebadores polinucleotídicos descritos en la presente detectan específicamente una secuencia de ADN diana. Puede emplearse cualquier método de amplificación o de hibridación de ácidos nucleicos convencional para identificar la presencia de ADN de un acontecimiento transgénico en una muestra. "Detecta específicamente" significa que el polinucleótido puede emplearse como cebador para amplificar una región específica de DP-305423-1, o el polinucleótido puede emplearse como sonda que se hibrida, bajo condiciones rigurosas, con un polinucleótido que contiene un acontecimiento DP-305423-1 o una región específica de DP-305423-1. El nivel o el grado de hibridación que permite la detección específica de un acontecimiento DP-305423-1 o una región específica de un

acontecimiento DP-305423-1 es suficiente para distinguir el polinucleótido con la región específica DP-305423-1 de un polinucleótido que carece de esta región y, por tanto, permite identificar, de modo discriminante, un acontecimiento DP-305423-1. Que "comparte una complementariedad o identidad de secuencia suficiente para permitir la amplificación de un acontecimiento específico DP-305423-1" significa que la secuencia comparte al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de complementariedad o identidad con un fragmento o a lo largo de la longitud completa del polinucleótido que contiene la región específica de DP-305423-1.

Con respecto a la amplificación de un polinucleótido diana (por ejemplo, mediante PCR) empleando una pareja de cebadores de amplificación concreta, unas "condiciones rigurosas" son condiciones que permiten que la pareja de cebadores se hibride con el polinucleótido diana, con el que un cebador que tenga la correspondiente secuencia de tipo salvaje (o su complemento) se uniría, y preferiblemente producen un producto de la amplificación identificable (el amplicón) que contiene una región específica de DP-305423-1 en una reacción de amplificación térmica de ADN. En una estrategia de PCR, pueden diseñarse cebadores oligonucleotídicos para su uso en reacciones de PCR para amplificar una región específica de DP-305423-1. Los métodos para diseñar cebadores de PCR y de clonación con PCR son conocidos en general en la técnica y se describen en Sambrook *et al.* (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, Nueva York). Véase también, Innis *et al.*, eds. (1990), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, Nueva York); Innis y Gelfand, eds. (1995), *PCR Strategies* (Academic Press, Nueva York); e Innis y Gelfand, eds. (1999), *PCR Methods Manual* (Academic Press, Nueva York). También se describen métodos de amplificación en las patentes de EEUU n.ºs 4.683.195, 4.683.202, y en Chen *et al.* (1994), *PNAS*, 91:5695-5699. Estos métodos, así como otros métodos conocidos en la técnica de la amplificación de ADN, pueden utilizarse en la práctica de las realizaciones de la presente invención. Se entiende que puede ser necesario ajustar una serie de parámetros en un protocolo de PCR específico a las condiciones de laboratorio específicas, y que pueden ser ligeramente modificados y todavía se pueden recoger resultados similares. Estos ajustes serán evidentes para los expertos en la técnica.

El polinucleótido amplificado (amplicón) puede tener cualquier longitud que permita la detección del acontecimiento DP-305423-1 o una región específica de DP-305423-1. Por ejemplo, el amplicón puede tener una longitud de aproximadamente 10, 50, 100, 200, 300, 500, 700, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 nucleótidos o mayor.

En una realización específica, se detecta la región específica del acontecimiento DP-305423-1.

Puede emplearse cualquier cebador en los métodos de la invención que permita amplificar y/o detectar una región específica de DP-305423-1. Por ejemplo, en realizaciones específicas, la pareja de cebadores comprende un primer cebador que comprende un fragmento de una región genómica 5' de SEQ ID NO:5, 6, 7 o 82, y un segundo cebador que comprende una región de inserción de SEQ ID NO:5, 6, 7 o 82, o, como alternativa, la pareja de cebadores puede comprender un primer cebador que comprende un fragmento de una región genómica 3' de SEQ ID NO:5, 6, 7 o 82, y un segundo cebador que comprende una región de inserción de SEQ ID NO:5, 6, 7 o 82. En otras realizaciones, el primer y el segundo cebador pueden comprender cualquiera o cualquier combinación de las secuencias indicadas en SEQ ID NO: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, 89, 90, 91, 92, 93 o 94. Los cebadores pueden tener cualquier longitud suficiente para amplificar una región de DP-305423-1, e incluyen, por ejemplo, al menos 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 15, o 30, o aproximadamente 7-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-35, 35-40, 40-45 nucleótidos o más.

Tal como se analiza en otro punto en la presente, puede emplearse cualquier método para amplificar mediante PCR el acontecimiento o la región específica de DP-305423-1 que incluye, por ejemplo, una PCR a tiempo real. Véase, por ejemplo, Livak *et al.* (1995a), *Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system for detecting PCR product and nucleic acid hybridization*, *PCR methods and Applications*, 4:357-362; patente de EEUU 5.538.848; patente de EEUU 5.723.591; Applied Biosystems User Bulletin n.º 2, "Relative Quantitation of Gene Expression," P/N 4303859; y Applied Biosystems User Bulletin n.º 5, "Multiplex PCR with Taqman VIC probes," P/N 4306236.

Así, en realizaciones específicas, se proporciona un método para detectar la presencia del acontecimiento DP-305423-1 de soja, o su progenie, en una muestra biológica. El método comprende (a) extraer una muestra de ADN de la muestra biológica; (b) proporcionar una pareja de moléculas de cebadores de ADN que incluyen, pero no se limitan a: i) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:26 y SEQ ID NO:27; ii) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:29 y SEQ ID NO:30; iii) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:31 y SEQ ID NO:32; iv) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:33 y SEQ ID NO:34; v) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:35 y SEQ ID NO:36; vi) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:37 y SEQ ID NO:38; vii) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:39 y SEQ ID NO:40; viii) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:41 y SEQ ID NO:42; ix) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:43 y SEQ ID NO:44; x) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:45 y SEQ ID NO:46; xi) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:47 y SEQ ID NO:48; xii) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:49 y SEQ ID NO:50; xiii) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:51; xiv) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:52 y SEQ ID NO:53; xv) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:54 y SEQ ID NO:49; xvi) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:55 y SEQ ID NO:46; xvii) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:33 y SEQ ID NO:56; xviii) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:57 y SEQ ID

NO:58; xix) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:59 y SEQ ID NO:60; xx) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:61 y SEQ ID NO:36; xxi) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:35 y SEQ ID NO:62; xxii) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:37 y SEQ ID NO:63; xxiii) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:64 y SEQ ID NO:65; xxiv) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:66 y SEQ ID NO:67; xxv) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:68 y SEQ ID NO:69; xxvi) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:70 y SEQ ID NO:71; xxvii) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:72 y SEQ ID NO:73; xxviii) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:74 y SEQ ID NO:75; xxix) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:76 y SEQ ID NO:77; xxx) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:78 y SEQ ID NO:79; xxxi) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:80 y SEQ ID NO:81; y xxxii) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:89 y SEQ ID NO:90, y poner en contacto al menos una de dichas parejas de cebador con dicha muestra de ADN; (c) proporcionar unas condiciones de reacción de amplificación de ADN; (d) realizar la reacción de amplificación de ADN, produciendo con ello una molécula de amplicón de ADN; y (e) detectar la molécula de amplicón de ADN, en el que la detección de dicha molécula de amplicón de ADN en la reacción de amplificación de ADN indica la presencia del acontecimiento DP-305423-1 de soja. Para que una molécula de ácido nucleico actúe como una sonda o un cebador solo debe ser suficientemente complementaria, en secuencia, como para ser capaz de formar una estructura bicatenaria estable bajo las condiciones salinas y de disolvente particulares empleadas.

En las técnicas de hibridación, se emplea todo o una parte del polinucleótido que se hibrida selectivamente con un polinucleótido diana que contiene un acontecimiento DP-305423-1 específico. Unas "condiciones rigurosas" o "condiciones de hibridación rigurosas", cuando se refieren a una sonda polinucleotídica, se indican las condiciones bajo las cuales una sonda se hibrida con su secuencia diana en un grado detectable mayor que con otras secuencias (por ejemplo, al menos 2 veces más sobre el fondo). Con respecto a la amplificación de un polinucleótido diana (por ejemplo, mediante PCR) empleando una pareja de cebadores de amplificación concreta, unas "condiciones rigurosas" son condiciones que permiten que la pareja de cebadores se hibride con el polinucleótido diana, con el que un cebador que tenga la correspondiente secuencia de tipo salvaje se uniría. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Controlando la rigurosidad de la hibridación y/o las condiciones de lavado, pueden identificarse secuencias diana que sean 100% complementarias con la sonda (sondeo homólogo). Como alternativa, las condiciones de rigurosidad pueden ajustarse para permitir cierto grado de desapareamiento en las secuencias, de modo que se detectan grados más bajos de identidad (sondeo heterólogo). En general, una sonda tiene una longitud menor que aproximadamente 1000 nucleótidos o menor que 500 nucleótidos.

Tal como se emplea en la presente, una secuencia sustancialmente idéntica o complementaria es un polinucleótido que se hibrida específicamente con el complemento de la molécula de ácido nucleico con la que se está comparando bajo condiciones de alta rigurosidad. Las condiciones de rigurosidad apropiadas que estimulan la hibridación del ADN, por ejemplo, 6X cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45 °C, seguido de un lavado con 2X SSC a 50 °C, son conocidas por los expertos en la técnica, o pueden encontrarse en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Generalmente, las condiciones rigurosas para la hibridación y la detección serán aquellas en las que la concentración salina es menor que aproximadamente 1,5 M de ion Na, generalmente de aproximadamente 0,01 a 1,0 M de concentración de ion Na (u otras sales) a pH 7,0 a 8,3, y la temperatura es al menos aproximadamente 30 °C para sondas cortas (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60 °C para sondas más largas (por ejemplo, mayores que 50 nucleótidos). También pueden lograrse condiciones rigurosas con la adición de agentes desestabilizantes, tales como formamida. Los ejemplos de condiciones de baja rigurosidad incluyen la hibridación con una disolución tampón de formamida del 30 al 35%, NaCl 1 M, SDS (dodecilsulfato de sodio) al 1% a 37 °C, y un lavado en 1X a 2X SSC (20X SSC = NaCl 3,0 M/citrato de trisodio 0,3 M) de 50 a 55 °C. Los ejemplos de condiciones de rigurosidad moderada incluyen la hibridación con formamida del 40 al 45%, NaCl 1,0 M, SDS al 1% a 37 °C, y un lavado en 0,5X a 1X SSC de 55 a 60 °C. Los ejemplos de condiciones de alta rigurosidad incluyen la hibridación en formamida al 50%, NaCl 1 M, SDS al 1% a 37 °C, y un lavado en 0,1X SSC de 60 a 65 °C. Opcionalmente, los tampones de lavado pueden comprender SDS de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 1%. La duración de la hibridación en general es menor que aproximadamente 24 horas, habitualmente de aproximadamente 4 a aproximadamente 12 horas. La duración del tiempo de lavado será al menos una longitud de tiempo suficiente para alcanzar el equilibrio.

En las reacciones de hibridación, la especificidad generalmente está en función de los lavados de posthibridación, y los factores críticos son la fuerza iónica y la temperatura de la disolución de lavado final. Para los híbridos de ADN-ADN, la T_m puede aproximarse a partir de la ecuación de Meinkoth y Wahl (1984), Anal. Biochem., 138:267-284: $T_m = 81,5 \text{ °C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\%GC) - 0,61 (\% \text{ form.}) - 500/L$; en la que M es la molaridad de los cationes monovalentes, %GC es el porcentaje de nucleótidos de guanosina y citosina en el ADN, % form. es el porcentaje de formamida en la disolución de hibridación, y L es la longitud del híbrido en pares de bases. La T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica y pH definidos) en la cual 50% de una secuencia diana complementaria se hibrida con una sonda perfectamente apareada. La T_m se reduce en aproximadamente 1 °C por cada 1% de desapareamiento; así, las condiciones de T_m , hibridación y/o lavado pueden ajustarse para la hibridación a secuencias con la identidad deseada. Por ejemplo, si se buscan secuencias con $\geq 90\%$ de identidad, la T_m puede disminuir 10 °C. En general, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5 °C menores que el punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica y su complemento a una fuerza iónica y pH definidos. Sin embargo, unas condiciones muy rigurosas pueden utilizar una hibridación y/o un lavado a 1, 2, 3, o 4 °C menor que el punto de

fusión térmico (T_m); unas condiciones moderadamente rigurosas pueden utilizar una hibridación y/o un lavado a 6, 7, 8, 9, o 10°C menor que el punto de fusión térmico (T_m); una condiciones de baja rigurosidad pueden utilizar una hibridación y/o un lavado a 11, 12, 13, 14, 15, o 20°C menor que el punto de fusión térmico (T_m). Utilizando la ecuación, las composiciones de hibridación y lavado, y la T_m deseada, los expertos en la técnica entenderán que se describen inherentemente las variaciones en la rigurosidad de la hibridación y/o lavado. Si el grado deseado de resultados de desapareamiento produce una T_m menor que 45 °C (disolución acuosa) o 32 °C (disolución de formamida), resulta óptimo aumentar la concentración de SSC de modo que pueda utilizarse una temperatura mayor. Puede encontrarse una guía completa para la hibridación de ácidos nucleicos en Tijssen (1993), *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes*, parte I, capítulo 2 (Elsevier, Nueva York); y Ausubel *et al.*, eds. (1995), *Current Protocols in Molecular Biology*, capítulo 2 (Greene Publishing and Wiley-Interscience, Nueva York). Véase Sambrook *et al.* (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, Nueva York); y Haymes *et al.* (1985), en: *Nucleic Acid Hybridization, a Practical Approach*, IRL Press, Washington, D.C.

Se dice que un polinucleótido es el "complemento" de otro polinucleótido si muestran complementariedad. Tal como se emplea en la presente, se dice que las moléculas muestran una "complementariedad completa" cuando cada nucleótido de una de las moléculas polinucleotídicas es complementario con un nucleótido de la otra. Se dice que dos moléculas son "mínimamente complementarias" si pueden hibridarse entre sí con la suficiente estabilidad para que puedan seguir asociadas entre sí bajo al menos unas condiciones de "baja rigurosidad" convencionales. De modo similar, se dice que las moléculas son "complementarias" si pueden hibridarse entre sí con la suficiente estabilidad para que puedan seguir asociadas entre sí bajo al menos unas condiciones de "alta rigurosidad" convencionales.

También se proporcionan métodos para detectar la presencia de un ADN que se corresponde con el acontecimiento DP-305423-1 en una muestra. En una realización, el método comprende: (a) poner en contacto la muestra biológica con una sonda polinucleotídica que se hibrida bajo condiciones de hibridación rigurosas con un ADN de un acontecimiento DP-305423-1 de soja y detecta específicamente el acontecimiento DP-305423-1; (b) someter la muestra y la sonda a condiciones de hibridación rigurosas; y (c) detectar la hibridación de la sonda al ADN, en el que la detección de la hibridación indica la presencia del acontecimiento DP-305423-1.

Pueden emplearse diversos métodos para detectar la región específica de DP-305423-1 o su amplicón que incluyen, pero no se limitan a Genetic Bit Analysis (Nikiforov *et al.* (1994), *Nucleic Acid Res.*, 22:4167-4175), en el que se diseña un oligonucleótido de ADN que se solapa con la secuencia de ADN flanqueante adyacente y con la secuencia de ADN insertada. El oligonucleótido se inmoviliza en pocillos de una placa de microtitulación. Después de una PCR de la región de interés (empleando un cebador en la secuencia insertada y otro en la secuencia 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 basarse en ELISA. Una señal indica la presencia de la secuencia de la inserción/flanqueante debido a que se ha realizado una amplificación, una hibridación y una extensión de una sola base con éxito.

Otro método de detección es la técnica de pirosecuenciación, según se describe en Winge ((2000), *Innov. Pharma. Tech.*, 00:18-24). En este método, se diseña un oligonucleótido que se solapa con el ADN adyacente y con la zona de unión del ADN de la inserción. El oligonucleótido se hibrida con un producto de la PCR monocatenario de la región de interés (un cebador en la secuencia insertada y otro en la secuencia flanqueante) y se incuba en presencia de una ADN polimerasa, ATP, sulfurilasa, luciferasa, apirasa, adenosina 5 fosfosulfato y luciferina. Se añaden individualmente dNTP y la incorporación produce una señal luminosa que se mide. Una señal luminosa indica la presencia de la inserción del transgén/secuencia flanqueante debido a que se ha realizado una amplificación, una hibridación y una extensión de una sola base o de múltiples bases con éxito.

La polarización de fluorescencia, tal como describen Chen *et al.* ((1999), *Genome Res.*, 9:492-498, 1999) también es un método que puede utilizarse para detectar un amplicón producido por los métodos de la invención. Empleando este método, se diseña un oligonucleótido que se solapa con la zona de unión del ADN insertado y flanqueante. El oligonucleótido se hibrida con un producto de la PCR monocatenario de la región de interés (un cebador en la secuencia insertada y otro en la secuencia flanqueante) y se incuba en presencia de una ADN polimerasa y ddNTP marcado fluorescente. Una 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 inserción del transgén/secuencia flanqueante debido a que se ha realizado una amplificación, una hibridación y una extensión de una sola base con éxito.

Taqman® (PE Applied Biosystems, Foster City, Calif.) se describe como un método para detectar y cuantificar la presencia de una secuencia de ADN y se entiende sin problemas en las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Brevemente, se diseña una sonda oligonucleotídica FRET que se solapa con la zona de unión del ADN insertado y flanqueante. La sonda FRET y los cebadores de PCR (un cebador en la secuencia insertada y otro en la secuencia flanqueante) se ciclan en presencia de una polimerasa termoestable y dNTP. La hibridación de la sonda FRET provoca la escisión y la liberación del resto fluorescente del resto extintor sobre la sonda FRET. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia de la inserción del transgén/flanqueante debido a que se ha

realizado una amplificación y una hibridación con éxito.

Se han descrito balizas moleculares para su uso en la detección de secuencias, tal como se describe en Tyangi *et al.* ((1996), *Nature Biotech.*, 14:303-308). Brevemente, se diseña un oligonucleótido FRET que se solapa con la zona de unión del ADN insertado y flanqueante. La estructura exclusiva de la sonda FRET hace que contenga una estructura secundaria que mantiene muy cercanos a los restos fluorescente y extintor. La sonda FRET y los cebadores de PCR (un cebador en la secuencia insertada y otro en la secuencia flanqueante) se ciclan en presencia de una polimerasa termoestable y dNTP. Después de 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 de la inserción del transgén/flanqueante debido a que se ha realizado una amplificación y una hibridación con éxito.

Una reacción de hibridación que emplea una sonda específica para una secuencia que se encuentra dentro del amplicón es otro método utilizado para detectar el amplicón producido mediante una reacción de PCR.

Tal como se emplea en la presente, un "kit" se refiere a un conjunto de reactivos para poner en práctica las realizaciones del método de la invención, más en concreto, la identificación y/o la detección del acontecimiento DP-305423-1 en muestras biológicas. El kit descrito en la presente puede utilizarse, y sus componentes pueden ajustarse específicamente, para el control de calidad (por ejemplo, la pureza de lotes de semillas), la detección del acontecimiento DP-305423-1 en material vegetal, o material que comprende o se deriva de material vegetal, tal como, pero sin limitarse a productos alimentarios o de piensos.

En la presente se describe un kit para identificar el acontecimiento DP-305423-1 en una muestra biológica. El kit comprende un primer y un segundo cebador, en el que el primer y el segundo cebador amplifican un polinucleótido que comprende una región específica de DP-305423-1. El kit también puede comprender un polinucleótido para la detección de la región específica de DP-305423-1. El kit puede comprender, por ejemplo, un primer cebador que comprende un fragmento de un polinucleótido de SEQ ID NO:5, 6, 7 o 82, en el que el primer o el segundo cebador comparte una complementariedad u homología de secuencia suficiente con el polinucleótido para amplificar dicha región específica de DP-305423-1. Por ejemplo, el primer cebador comprende un fragmento de un polinucleótido de SEQ ID NO:5, 6, 7 o 82, en el que el primer o el segundo cebador comparte una complementariedad u homología de secuencia suficiente con los polinucleótidos para amplificar dicha región específica de DP-305423-1. La pareja de cebadores puede comprender un primer cebador que comprende un fragmento de una región genómica 5' de SEQ ID NO:5, 6, 7 o 82, y un segundo cebador que comprende un fragmento de una región genómica 3' de SEQ ID NO:5, 6, 7 o 82, o una región de inserción de SEQ ID NO:5, 6, 7 o 82, o, como alternativa, la pareja de cebadores puede comprender un primer cebador que comprende un fragmento de una región genómica 3' de SEQ ID NO:5, 6, 7 o 82, y un segundo cebador que comprende un fragmento de una región genómica 5' de SEQ ID NO:5, 6, 7 o 82, o una región de inserción de SEQ ID NO:5, 6, 7 o 82. El primer y el segundo cebador pueden comprender cualquiera o cualquier combinación de las secuencias indicadas en SEQ ID NO: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, 89, 90, 91, 92, 93 o 94. Los cebadores pueden tener cualquier longitud suficiente para amplificar una región de DP-305423-1, e incluyen, por ejemplo, al menos 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 15, o 30, o aproximadamente 7-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-35, 35-40, 40-45 nucleótidos o más.

En la presente también se describen kits de detección de ADN que comprenden al menos un polinucleótido que puede detectar específicamente una región específica de DP-305423-1, en los que dicho polinucleótido comprende al menos una molécula de ADN de longitud suficiente de nucleótidos contiguos homóloga o complementaria con SEQ ID NO:5, 6, 7 o 82. El kit de detección de ADN puede comprender un polinucleótido que tiene la SEQ ID NO:8, 9, 14, 15, 20, 21, 83 o 84, o puede comprender una secuencia que se hibrida con al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: a) las secuencias de una región genómica 5' de SEQ ID NO:5, 6, 7 o 82, y las secuencias de una región de inserción de SEQ ID NO:5, 6, 7 o 82; y, b) la secuencias de una región genómica 3' de SEQ ID NO:5, 6, 7 o 82, y las secuencias de una región de inserción de SEQ ID NO:5, 6, 7 o 82.

Cualquiera de los polinucleótidos y sus fragmentos y variantes empleados en los métodos y las composiciones de la invención puede compartir una identidad de secuencia con una región de la inserción del transgén del acontecimiento DP-305423-1, una secuencia de zona de unión del acontecimiento DP-305423-1, o una secuencia flanqueante del acontecimiento DP-305423-1. Los métodos para determinar la relación de diversas secuencias son conocidos. Tal como se emplea en la presente, una "secuencia de referencia" es una secuencia definida que se emplea como base para la comparación de secuencias. Una secuencia de referencia puede ser un subconjunto o la totalidad de una secuencia especificada, por ejemplo, como un segmento de una secuencia génica o ADNc de longitud completa, o la secuencia génica o ADNc completo. Tal como se emplea en la presente, una "ventana de comparación" hace referencia a un segmento contiguo y especificado de una secuencia polinucleotídica, en la que la secuencia polinucleotídica en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos), comparado con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones ni deleciones) para el alineamiento óptimo de los dos polinucleótidos. En general, la ventana de comparación tiene una longitud de al menos 20 nucleótidos contiguos, y opcionalmente puede tener 30, 40, 50, 100, o más. Los expertos en la técnica entienden que, para evitar una alta similitud con una secuencia de referencia debida a la inclusión de huecos en la

secuencia polinucleotídica, generalmente se introduce una penalización de hueco y se resta del número de apareamientos.

Los métodos de alineamiento de secuencias para la comparación son muy conocidos en la técnica. Así, la determinación del porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias cualesquiera puede lograrse empleando un algoritmo matemático. Los ejemplos no limitantes de dichos algoritmos matemáticos son el algoritmo de Myers y Miller (1988), CABIOS 4:11-17; el algoritmo de alineamiento local de Smith *et al.* (1981), Adv. Appl. Math., 2:482; el algoritmo de alineamiento global de Needleman y Wunsch (1970), J. Mol. Biol., 48:443-453; el método de búsqueda de alineamiento local de Pearson y Lipman (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444-2448; el algoritmo de Karlin y Altschul (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:2264, modificado como en Karlin y Altschul (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:5873-5877.

Pueden utilizarse aplicaciones informáticas de estos algoritmos matemáticos para la comparación de secuencias para determinar la identidad de secuencia. Estas aplicaciones incluyen, pero no se limitan a: CLUSTAL en el programa PC/Gene (disponible en Intelligenetics, Mountain View, California); el programa ALIGN (versión 2.0) y GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, y TFASTA en el paquete GCG Wisconsin Genetics Software Package, versión 10 (disponible en Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, California, EEUU). Empleando estos programas, los alineamientos pueden realizarse utilizando los parámetros por defecto. El programa CLUSTAL se describe a fondo en Higgins *et al.* (1988), Gene, 73:237-244 (1988); Higgins *et al.* (1989), CABIOS, 5:151-153; Corpet *et al.* (1988), Nucleic Acids Res., 16:10881-10890; Huang *et al.* (1992), CABIOS 8:155-165; y Pearson *et al.* (1994), Meth. Mol. Biol., 24:307-331. El programa ALIGN se basa en el algoritmo de Myers y Miller (1988), *supra*. Puede utilizarse una tabla de peso de restos PAM120, una penalización de longitud de hueco de 12, y una penalización de hueco de 4 con el programa ALIGN cuando se comparan secuencias de aminoácidos. Los programas BLAST de Altschul *et al.* (1990), J. Mol. Biol., 215:403, se basan en el algoritmo de Karlin y Altschul (1990), *supra*. Las búsquedas de nucleótidos BLAST pueden realizarse con el programa BLASTN, puntuación = 100, longitud de palabra = 12, para obtener secuencias de nucleótidos homólogas con una secuencia de nucleótidos descrita en la presente. Las búsquedas de proteínas BLAST pueden realizarse con el programa BLASTX, puntuación = 50, longitud de palabra = 3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas con una proteína o un polipéptido descrito en la presente. Para obtener alineamientos con huecos para comparaciones, puede utilizarse Gapped BLAST (en BLAST 2.0), tal como se describe en Altschul *et al.* (1997), Nucleic Acids Res., 25:3389. Como alternativa, puede utilizarse PSI-BLAST (en BLAST 2.0) para realizar una búsqueda iterada que detecte relaciones lejanas entre moléculas. Véase, Altschul *et al.* (1997), *supra*. Cuando se utiliza BLAST, Gapped BLAST, o PSI-BLAST, pueden emplearse los parámetros por defecto de los respectivos programas (por ejemplo, BLASTN para secuencias de nucleótidos, BLASTX para proteínas). Véase, www.ncbi.nlm.nih.gov. El alineamiento también puede realizarse de forma manual mediante inspección.

Los cálculos de alineamiento de secuencias y de porcentaje de identidad pueden determinarse empleando una diversidad de métodos de comparación diseñados para detectar secuencias homólogas que incluyen, pero no se limitan al programa Megalign® del paquete bioinformático LASERGENE® (DNASTAR® Inc., Madison, WI). Por ejemplo, pueden realizarse múltiples alineamientos de las secuencias proporcionadas en la presente empleando el método de alineamiento Clustal V (Higgins y Sharp (1989), CABIOS, 5:151-153) con los parámetros por defecto (PENALIZACIÓN DE HUECO = 10, PENALIZACIÓN DE LONGITUD DE HUECO = 10). Los parámetros por defecto para los alineamientos apareados y el cálculo del porcentaje de identidad de las secuencias de proteínas empleando el método Clustal V son KTUPLO = 1, PENALIZACIÓN DE HUECO = 3, VENTANA = 5 y DIAGONALES GUARDADAS = 5. Para los ácidos nucleicos, estos parámetros son KTUPLO = 2, PENALIZACIÓN DE HUECO = 5, VENTANA = 4 y DIAGONALES GUARDADAS = 4. Después del alineamiento de las secuencias empleando el programa Clustal V, es posible obtener los valores del "porcentaje de identidad" y de "divergencia" observando la tabla de "distancias de secuencia" en el mismo programa.

A menos que se indique lo contrario, los valores de similitud/identidad de secuencia proporcionados en la presente se refieren al valor obtenido empleando GAP, versión 10, utilizando los siguientes parámetros: % de identidad y % de similitud para una secuencia de nucleótidos empleando un peso GAP de 50 y un peso de longitud de 3, y la matriz de puntuación nwsgapdna.cmp; % de identidad y % de similitud para una secuencia de aminoácidos empleando un peso GAP de 8 y un peso de longitud de 2, y la matriz de puntuación BLOSUM62; o cualquier programa equivalente a estos. Un "programa equivalente" significa cualquier programa de comparación de secuencias que, para cualquier par de secuencias en cuestión, genera un alineamiento que tiene idénticos desapareamientos de nucleótidos o restos aminoácidos, y un porcentaje de identidad de secuencia idéntico cuando se compara con el correspondiente alineamiento generado por GAP, versión 10.

GAP emplea el algoritmo de Needleman y Wunsch (1970), J. Mol. Biol., 48:443-453, para encontrar el alineamiento de dos secuencias completas que maximice el número de apareamientos y minimice el número de huecos. GAP considera todos los alineamientos posibles y posiciones de huecos, y crea el alineamiento con el mayor número de bases apareadas y el mínimo de huecos. Permite proporcionar la penalización de creación de huecos y la penalización de extensión de huecos en unidades de bases apareadas. GAP debe aprovechar la penalización de creación de huecos del número de apareamientos para cada hueco que inserta. Si se elige la penalización de extensión de hueco mayor que cero, GAP debe aprovechar, además, cada hueco insertado de la longitud del hueco por la penalización de la extensión de hueco. Los valores de penalización de creación de huecos y los valores de

penalización de extensión de hueco por defecto en la versión 10 del paquete GCG Wisconsin Genetics Software Package para secuencias de proteínas son de 8 y 2, respectivamente. Para las secuencias de nucleótidos, la penalización de creación de huecos por defecto es de 50, mientras que la penalización de extensión de huecos por defecto es de 3. Las penalizaciones de creación de huecos y de extensión de huecos pueden expresarse como un número entero seleccionado del grupo de números enteros de 0 a 200. Así, por ejemplo, las penalizaciones de creación de huecos y de extensión de huecos pueden ser 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 o mayor.

GAP presenta un miembro de la familia de los mejores alineamientos. Existen muchos miembros de esta familia, pero ningún otro miembro tiene mejor calidad. GAP muestra cuatro factores de calidad para los alineamientos: calidad, proporción, identidad, y similitud. La calidad es la métrica maximizada para alinear las secuencias. La proporción es la calidad dividida entre el número de bases en el segmento más corto. El porcentaje de identidad es el porcentaje de símbolos que realmente se aparean. El porcentaje de similitud es el porcentaje de símbolos que son similares. Los símbolos que están frente a los huecos no se toman en cuenta. Se puntúa una similitud cuando el valor de la matriz de puntuación para una pareja de símbolos es mayor o igual a 0,50, el umbral de similitud. La matriz de puntuación empleada en la versión 10 del paquete GCG Wisconsin Genetics Software Package es BLOSUM62 (véase, Henikoff y Henikoff (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:10915).

Tal como se emplea en la presente, la "identidad de secuencia" o "identidad", en el contexto de dos secuencias de polinucleótidos o de polipéptidos, se refiere a los restos en las dos secuencias que son los mismos cuando se alinean para la máxima correspondencia a lo largo de una ventana de comparación especificada. Cuando el porcentaje de identidad de secuencia se emplea en referencia a las proteínas, se reconoce que las posiciones de los restos que no son idénticos a menudo difieren por sustituciones de aminoácidos conservadoras, en las que los restos aminoácidos son sustituidos por otros restos aminoácidos con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad) y, por tanto, no cambian las propiedades funcionales de la molécula. Cuando las secuencias se diferencian en sustituciones conservadoras, el porcentaje de identidad de secuencia puede ajustarse hacia arriba para corregir la naturaleza conservadora de la sustitución. Se dice que las secuencias que se diferencian por dichas sustituciones conservadoras tienen "similitud de secuencia" o "similitud". Los medios para realizar este ajuste son muy conocidos por los expertos en la técnica. Generalmente, esto implica puntuar una sustitución conservadora como desapareamiento parcial, en lugar de total, aumentando con ello el porcentaje de identidad de secuencia. Así, por ejemplo, cuando un aminoácido idéntico recibe una puntuación de 1 y una sustitución no conservadora recibe una puntuación de cero, una sustitución conservadora recibe una puntuación entre cero y 1. La puntuación de las sustituciones conservadoras se calcula, por ejemplo, según se aplica en el programa PC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, California).

Tal como se emplea en la presente, un "porcentaje de identidad de secuencia" significa el valor determinado comparando dos secuencias óptimamente alineadas a lo largo de una ventana de comparación, en el que la porción de la secuencia polinucleotídica en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos), comparado con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que aparece la base de ácido nucleico o el resto aminoácido idéntico en ambas secuencias, para producir el número de posiciones apareadas, dividiendo el número de posiciones apareadas entre el número total de posiciones en la ventana de comparación, y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia.

En la presente se describen métodos para controlar las hierbas adventicias en un área de cultivo, para evitar el desarrollo o la aparición de hierbas adventicias resistentes a herbicidas en un área de cultivo, para producir una cosecha y para aumentar la seguridad de la cosecha. La expresión "controlar" y sus derivados, por ejemplo, "controlar las hierbas adventicias", se refiere a uno o más de inhibir el crecimiento, la germinación, la reproducción y/o la proliferación y/o matar, eliminar, destruir o disminuir de otro modo la aparición y/o la actividad de una hierba adventicia.

Tal como se emplea en la presente, un "área de cultivo" comprende cualquier región en la que se desee cultivar una planta. Estas áreas de cultivo incluyen, pero no se limitan a un campo en el que se cultiva una planta (tal como un campo de cultivo, un campo de césped, un campo de árboles, un bosque gestionado, un campo para cultivar frutas y verduras, etc.), un invernadero, una cámara de crecimiento, etc.

Los métodos descritos en la presente comprenden plantar el área de cultivo con plantas o semillas DP-305423-1 de soja y, en realizaciones específicas, aplicar al cultivo, semilla, hierba adventicia o a su área de cultivo una cantidad eficaz de un herbicida de interés. Se reconoce que el herbicida puede aplicarse antes o después de que el cultivo se plante en el área de cultivo. Estas aplicaciones de herbicidas pueden incluir una aplicación de un inhibidor de ALS. Un inhibidor de ALS puede aplicarse al acontecimiento DP-305423-1 de soja, en el que la concentración eficaz del inhibidor de ALS dañará significativamente una planta control apropiada. El herbicida puede comprender al menos uno de una sulfonilaminocarboniltriazolinona; una triazolopirimidina; un pirimidinil(tio)benzoato; una imidazolinona; una triazina; y/o un ácido fosfínico.

El herbicida puede comprender imazapir, clorimurona-etilo, quizalofop, o fomesafeno, en el que una cantidad eficaz es tolerada por el cultivo y las hierbas adventicias control. Tal como se describe en otro punto en la presente, puede

aplicarse una cantidad eficaz de estos herbicidas. Una cantidad eficaz de imazapiró puede comprender de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 27,5 g ai/hectárea; una cantidad eficaz de clorimurona-etilo puede comprender de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 27,5 g ai/hectárea; una cantidad eficaz de quizalofop puede comprender de aproximadamente 50 a aproximadamente 70 g ai/hectárea; y una cantidad eficaz de fomesafeno puede comprender de aproximadamente 240 a aproximadamente 260 g ai/hectárea.

Puede aplicarse una combinación de al menos dos herbicidas. En otro punto en la presente se analizan más detalles con respecto a las diversas combinaciones de herbicidas que pueden emplearse en los métodos descritos en la presente.

Un "control" o "planta control" o "célula vegetal control" proporciona un punto de referencia para medir los cambios en el fenotipo de la planta o célula vegetal sujeto, y puede ser cualquier planta o célula vegetal adecuada. Una planta o célula vegetal control puede comprender, por ejemplo: (a) una planta o célula vegetal de tipo salvaje, es decir, del mismo genotipo que el material de partida para la alteración genética que produjo la planta o célula diana sujeto; (b) una planta o célula vegetal del mismo genotipo que el material de partida, pero que se ha transformado con una construcción nula (es decir, con una construcción que no tiene ningún efecto conocido sobre el rasgo de interés, tal como una construcción que comprende un gen marcador); (c) una planta o célula vegetal que es un segregante no transformado entre la progenie de una planta o célula vegetal sujeto; (d) una planta o célula vegetal que es genéticamente idéntica a la planta o célula vegetal sujeto pero que no se expone al mismo tratamiento (por ejemplo, un tratamiento con herbicida) que la planta o célula vegetal sujeto; (e) la propia planta o célula vegetal sujeto, bajo condiciones en las que el gen de interés no se expresa; o (f) la propia planta o célula vegetal sujeto, bajo condiciones en las que no ha sido expuesta a un tratamiento concreto, tal como, por ejemplo, un herbicida o combinación de herbicidas y/u otros productos químicos. En algunos casos, una planta control o célula vegetal control apropiada puede tener un genotipo diferente de la planta o célula vegetal sujeto, pero puede compartir las características de sensibilidad a herbicidas del material de partida para la alteración o alteraciones genéticas que produjeron la planta o célula sujeto (véase, por ejemplo, Green (1998), *Weed Technology*, 12:474-477; Green y Ulrich (1993), *Weed Science*, 41:508-516). En algunos casos, una planta de soja control apropiada es una planta de soja "Jack" (Illinois Foundation Seed, Champaign, Illinois). En otras realizaciones, el segregante nulo puede utilizarse como control, puesto que es genéticamente idéntico a DP-305423-1 con la excepción del ADN de la inserción transgénico.

Cualquier herbicida puede aplicarse al cultivo de soja DP-305423-1, a una parte del cultivo, o al área de cultivo que contiene la planta cultivada. Las clasificaciones de herbicidas (es decir, el agrupamiento de herbicidas en clases y subclases) son muy conocidas en la técnica, e incluyen las clasificaciones realizadas por HRAC (Herbicide Resistance Action Committee) y WSSA, (the Weed Science Society of America) (véase también, Retzinger y Mallory-Smith (1997), *Weed Technology*, 11:384-393). Una versión abreviada de la clasificación HRAC (con notas con respecto al correspondiente grupo WSSA) se indica a continuación en la tabla 2.

Los herbicidas pueden clasificarse según su modo de acción y/o sitio de acción, y también pueden clasificarse según el momento en que se aplican (por ejemplo, preemergente o postemergente), según el método de aplicación (por ejemplo, aplicación foliar o aplicación al suelo), o según cómo son captados por la planta o afectan a la planta. Por ejemplo, la tifensulfurona-metilo y la tribenurona-metilo se aplican al follaje de un cultivo y en general son metabolizados allí, mientras que la rimsulfurona y la clorimurona-etilo en general son captadas a través de las raíces y el follaje de una planta. El "modo de acción" en general se refiere al proceso metabólico o fisiológico dentro de la planta que el herbicida inhibe o altera de otra forma, mientras que el "sitio de acción" en general se refiere a la localización física o sitio bioquímico dentro de la planta sobre el cual el herbicida actúa o con el que directamente interactúa. Los herbicidas pueden clasificarse de diversas formas, que incluyen el modo de acción y/o el sitio de acción (véase, por ejemplo, la tabla 2).

A menudo, un gen de tolerancia a un herbicida que confiere tolerancia a un herbicida concreto o a otro producto químico en una planta que lo expresa también conferirá tolerancia a otros herbicidas o productos químicos de la misma clase o subclase, por ejemplo, una clase o subclase indicada en la tabla 2. Así, en algunas realizaciones de la invención, una planta transgénica de la invención es tolerante a más de un herbicida o producto químico de la misma clase o subclase tal como, por ejemplo, un inhibidor de PPO, una sulfonilurea o una auxina sintética.

La invención proporciona una planta de soja transgénica, según se define en las reivindicaciones adjuntas, que puede seleccionarse para su uso en la producción de cultivos basándose en la prevalencia de especies de hierbas adventicias tolerantes a un herbicida en el área en que el cultivo transgénico se va a cultivar. Se conocen métodos en la técnica para evaluar la tolerancia a herbicidas de diversas especies de hierbas adventicias. Las técnicas de gestión de hierbas adventicias también son conocidas en la técnica, tales como, por ejemplo, la rotación de cultivos empleando un cultivo que sea tolerante a un herbicida al cual las especies de hierbas adventicias locales no son tolerantes. Una serie de entidades controlan e informan al público de la incidencia y características de las hierbas adventicias tolerantes a herbicidas, que incluyen the Herbicide Resistance Action Committee (HRAC), the Weed Science Society of America, y diversas agencias estatales (véanse, por ejemplo, las puntuaciones de tolerancia a herbicidas para diversas hierbas adventicias de hoja ancha de the 2004 Illinois Agricultural Pest Management Handbook), y los expertos en la técnica podrán utilizar esta información para determinar qué combinación de cultivo y herbicida debería utilizarse en una localización concreta.

5 Estas entidades también publican consejos y directrices para evitar el desarrollo y/o la aparición y el control de la proliferación de hierbas adventicias tolerantes a herbicidas (véase, por ejemplo, Owen y Hartzler (2004), 2005 Herbicide Manual for Agricultural Professionals, Pub. WC 92 revisado (Iowa State University Extension, Iowa State University of Science and Technology, Ames, Iowa); Weed Control for Corn, Soybeans, and Sorghum, capítulo 2 de "2004 Illinois Agricultural Pest Management Handbook" (University of Illinois Extension, University of Illinois at Urbana-Champaign, Illinois); Weed Control Guide for Field Crops, MSU Extension Bulletin E434 (Michigan State University, East Lansing, Michigan)).

Tabla 2 - Versión abreviada de la clasificación de herbicidas HRAC

I. Inhibidores de ALS (WSSA Grupo 2)

A. Sulfonilureas

- | | |
|----------------------------|-----------------------------|
| 1. Azimsulfurona | 17. Flupirsulfurona- metilo |
| 2. Clorimurona-etilo | 18. Foramsulfurona |
| 3. Metsulfurona-metilo | 19. Imazosulfurona |
| 4. Nicosulfurona | 20. Yodosulfurona-metilo |
| 5. Rimsulfurona | 21. Mesosulfurona-metilo |
| 6. Sulfometurona-metilo | 22. Oxasulfurona |
| 7. Tifensulfurona-metilo | 23. Primisulfurona-metilo |
| 8. Tribenurona-metilo | 24. Prosulfurona |
| 9. Amidosulfurona | 25. Pirazosulfurona-etilo |
| 10. Bensulfurona-metilo | 26. Sulfosulfurona |
| 11. Clorsulfurona | 27. Triasulfurona |
| 12. Cinosulfurona | 28. Trifloxisulfurona |
| 13. Ciclosulfamurona | 29. Triflusulfurona-metilo |
| 14. Etametsulfurona-metilo | 30. Tritosulfurona |
| 15. Etoxisulfurona | 31. Halosulfurona-metilo |
| 16. Flazasulfurona | 32. Flucetosulfurona |

B. Sulfonilaminocarboniltriazolinonas

- | | |
|-----------------|-----------------|
| 1. Flucarbazona | 2. Procarbazona |
|-----------------|-----------------|

C. Triazolopirimidinas

- | | |
|------------------------|----------------|
| 1. Cloransulamo-metilo | 5. Metosulamo |
| 2. Flumetsulamo | 6. Penoxsulamo |
| 3. Diclosulamo | 7. Piroxsulamo |
| 4. Florasulamo | |

D. Pirimidiniloxi(tio)benzoatos

- | | |
|------------------|------------------------|
| 1. Bispiribaco | 4. Piritiobaco |
| 2. Pirifalida | 5. Piriminobaco-metilo |
| 3. Piribenzoxima | |

E. Imidazolinonas

- | | |
|----------------|-------------------------|
| 1. Imazapiro | 4. Imazapico |
| 2. Imazetapiro | 5. Imazametabenz-metilo |
| 3. Imazaquino | 6. Imazamox |

II. Otros ingredientes activos herbicidas/otros modos de acción

A. Inhibidores de la acetil CoA carboxilasa (ACCase) (WSSA Grupo 1)

1. Ariloxifenoxipropionatos ("FOP")

- | | |
|--------------------------|-----------------------|
| a. Quizalofop-P-etilo | f. Propaquizafop |
| b. Diclofop-metilo | g. Haloxifop-P-metilo |
| c. Clodinafop-propargilo | h. Cihalofop-butilo |
| d. Fenoxaprop-P-etilo | i. Quizalofop-P-etilo |
| e. Fluazifop-P-butilo | |

2. Ciclohexandionas ("DIMO")

- | | |
|----------------|------------------|
| a. Aloxidimo | e. Setoxidimo |
| b. Butroxidimo | f. Tepraloxidimo |
| c. Cletodimo | g. Tralcoxidimo |
| d. Cicloxidimo | |

B. Inhibidores del fotosistema II--HRAC Grupo C1/WSSA Grupo 5

1. Triazinas

- | | |
|------------------|------------------|
| a. Ametrina | h. Propazina |
| b. Atrazina | i. Simazina |
| c. Cianazina | j. Simetrina |
| d. Desmetrina | k. Terbumetona |
| e. Dimetametrina | l. Terbutilazina |
| f. Prometona | m. Terbutrina |
| g. Prometrina | n. Trietazina |

2. Triazinonas

- | | |
|----------------|----------------|
| a. Hexazinona | c. Metamitrina |
| b. Metribuzina | |

3. Triazolinonas

- a. Amicarbazona

4. Uracilos

- | | |
|--------------|--------------|
| a. Bromacilo | c. Terbacilo |
| b. Lenacilo | |

5. Piridazinonas

- a. Pirazona

6. Fenilcarbamatos

- | | |
|----------------|----------------|
| a. Desmedifamo | b. Fenmedifamo |
|----------------|----------------|

C. Inhibidores del fotosistema II--HRAC Grupo C2/WSSA Grupo 7

1. Ureas

- | | |
|-------------------|-----------------------|
| a. Fluometurona | j. Isoproturona |
| b. Linurona | k. Isourona |
| c. Clorobromurona | l. Metabenzitiazurona |
| d. Clorotolurona | m. Metobromurona |
| e. Cloroxurona | n. Metoxurona |

- f. Dimefurona
- g. Diurona
- h. Etidimurona
- i. Fenurona
- 2. Amidas
 - a. Propanilo
- o. Monolinurona
- p. Neburona
- q. Sidurona
- r. Tebutiurona
- b. Pentanoclor

D. Inhibidores del fotosistema II-HRAC Grupo C3/WSSA Grupo 6

- 1. Nitrilos
 - a. Bromofenoximo
 - b. Bromoxinilo
 - c. Ioxinilo
- 2. Benzotiadiazinona (bentazona)
 - a. Bentazona
- 3. Fenilpiridazinas
 - a. Piridato
 - b. Piridafol

E. Diversión de electrones del fotosistema-I (bipiridilios) (WSSA Grupo 22)

- 1. Diquat
- 2. Paraquat

F. Inhibidores de PPO (protoporfirinógeno oxidasa) (WSSA Grupo 14)

- 1. Difenil éteres
 - a. Acifluorfenó-Na
 - b. Bifenox
 - c. Clometoxifeno
 - d. Fluoroglicofeno-etilo
 - e. Fomesafeno
 - f. Halosafeno
 - g. Lactofeno
 - h. Oxifluorfenó
- 2. Fenilpirazoles
 - a. Fluazolato
 - b. Piraflufeno-etilo
- 3. N-fenilftalimididas
 - a. Cinidona-etilo
 - b. Flumioxazina
 - c. Flumicloraco-pentilo
- 4. Tiadiazoles
 - a. Flutiacet-metilo
 - b. Tidiazimina
- 5. Oxadiazoles
 - a. Oxadiazona
 - b. Oxadiargilo
- 6. Triazolinonas
 - a. Carfentrazona-etilo
 - b. Sulfentrazona
- 7. Oxazolidindionas
 - a. Pentoxazona
- 8. Pirimidindionas
 - a. Benzfendizona
 - b. Butafenicilo
- 9. Otros
 - a. Pirazogilo
 - b. Profluazol

G. Blanqueamiento: Inhibición de la biosíntesis de carotenoides en la etapa de fitoeno desaturasa (PDS) (WSSA Grupo 12)

1. Piridazinonas

a. Norflurazona

2. Piridincarboxamidas

a. Diflufenicano

b. Picolinafeno

3. Otros

a. Beflubutamida

c. Flurocloridona

b. Fluridona

d. Flurtamona

H. Blanqueamiento: Inhibición de la 4-hidroxifenil-piruvato-dioxigenasa (4-HPPD) (WSSA Grupo 28)

1. Tricetonas

a. Mesotriona

b. Sulcotriona

2. Isoxazoles

a. Isoxaclortol

b. Isoxaflutol

3. Pirazoles

a. Benzenofenap

c. Pirazolinato

b. Pirazoxifeno

4. Otros

a. Benzobuciclona

I. Blanqueamiento: Inhibición de la biosíntesis de carotenoide (diana desconocida) (WSSA Grupo 11 y 13)

1. Triazoles (WSSA Grupo 11)

a. Amitrol

2. Isoxazolidinonas (WSSA Grupo 13)

a. Clomazona

3. Ureas

a. Fluometurona

4. Difenil éter

a. Aclonifeno

J. Inhibición de la EPSP sintasa

1. Glicinas (WSSA Grupo 9)

a. Glifosato

b. Sulfosato

K. Inhibición de la glutamina sintetasa

1. Ácidos fosfínicos

a. Glufosinato-amonio

b. Bialafós

L. Inhibición de la DHP (dihidropteroato) sintasa (WSSA Grupo 18)

1. Carbamatos

a. Asulamo

M. Inhibición del ensamblaje de microtúbulos (WSSA Grupo 3)

1. Dinitroanilinas

a. Benfluralina

e. Orizalina

b. Butralina

f. Pendimetalina

c. Dinitramina

g. Trifluralina

- d. Etalfluralina
- 2. Fosforamidatos
 - a. Amiprofós-metilo
 - b. Butamifós
- 3. Piridinas
 - a. Ditiopiro
 - b. Tiazopior
- 4. Benzamidas
 - a. Pronamida
 - b. Tebutamo
- 5. Ácidos bencendicarboxílicos
 - a. Clortal-dimetilo

N. Inhibición de la mitosis/organización de los microtúbulos (WSSA Grupo 23)

- 1. Carbamatos
 - a. Clorprofamo
 - c. Carbetamida
 - b. Profamo

O. Inhibición de la división celular (inhibición de ácidos de cadena muy larga como mecanismo propuesto; WSSA Grupo 15)

- 1. Cloroacetamidas
 - a. Acetoclór
 - g. Metolaclór
 - b. Alaclór
 - h. Petoxamida
 - c. Butaclór
 - i. Pretilaclór
 - d. Dimetaclór
 - j. Propaclór
 - e. Dimetanamida
 - k. Propisoclór
 - f. Metazaclór
 - l. Tenilclór
- 2. Acetamidas
 - a. Difenamida
 - c. Naproanilida
 - b. Napropamida
- 3. Oxyacetamidas
 - a. Flufenaceto
 - b. Mefenaceto
- 4. Tetrazolinonas
 - a. Fentrazamida
- 5. Otros
 - a. Anilofós
 - c. Indanofano
 - b. Cafenstrol
 - d. Piperofós

P. Inhibición de la síntesis de la pared celular (celulosa)

- 1. Nitrilos (WSSA Grupo 20)
 - a. Diclobenilo
 - b. Clortiamida
- 2. Benzamidas (isoxabeno (WSSA Grupo 21))
 - a. Isoxabeno
- 3. Triazolocarboxamidas (flupoxamo)
 - a. Flupoxamo

Q. Desacoplamiento (alteración de la membrana): (WSSA Grupo 24)

- 1. Dinitrofenoles

- a. DNOC
- b. Dinosebo
- c. Dinoterbo

R. Inhibición de la síntesis de lípidos de un modo distinto a la inhibición de ACC

1. Tiocarbamatos (WSSA Grupo 8)

- a. Butilato
- b. Cicloato
- c. Dimepiperato
- d. EPTC
- e. Esprocarbo
- f. Molinato
- g. Orbencarbo
- h. Pebulato
- i. Prosulfocarbo
- j. Bentiocarbo
- k. Tiocarbazilo
- l. Trialato
- m. Vernolato

2. Fosforoditioatos

- a. Bensulida

3. Benzofuranos

- a. Benfuresato

4. Ácidos alcanoicos halogenados (WSSA Grupo 26)

- a. TCA

b. Etofumesato

c. Flupropanato

b. Dalapón

S. Auxinas sintéticas (similares a IAA) (WSSA Grupo 4)

1. Ácidos fenoxicarboxílicos

- a. Clomeprop
- b. 2,4-D
- c. Mecoprop

2. Ácidos benzoicos

- a. Dicamba
- b. Clorambeno
- c. TBA

3. Ácidos piridincarboxílicos

- a. Clopiralid
- b. Fluroxipiro
- c. Picloramo
- d. Triciclopiro

4. Ácidos quinolincarboxílicos

- a. Quincloraco
- b. Quinmeraco

5. Otros (benazolina-etilo)

- a. Benazolina-etilo

T. Inhibición del transporte de auxinas

1. Ftalamatos; semicarbazonas (WSSA Grupo 19)

- a. Naptalamo
- b. Diflufenzopiro-Na

U. Otros mecanismos de acción

1. Ácidos arilaminopropiónicos

- a. Flamprop-M-metilo/-isopropilo

2. Pirazolio

- a. Difenzoquat

3. Organoarsénicos

a. DSMA

b. MSMA

4. Otros

a. Bromobutida

h. Fosamina

b. Cinmetilina

i. Metamo

c. Cumilurona

j. Oxaziclomefona

d. Dazometo

k. Ácid oleico

e. Daimurona-metilo

l. Ácido pelargónico

f. Dimurona

m. Piributicarb

g. Etobenzanida

Puede aplicarse un inhibidor de ALS o al menos dos inhibidores de ALS al cultivo de soja DP-305423-1 o al área de cultivo. El inhibidor de ALS puede aplicarse a cualquier tasa eficaz que controle selectivamente las hierbas adventicias y que no dañe significativamente al cultivo. Por ejemplo, al menos un inhibidor de ALS puede aplicarse a un nivel que dañe significativamente una planta control apropiada, o al menos un inhibidor de ALS puede aplicarse por encima de la tasa de uso recomendada en la etiqueta para el cultivo. Puede aplicarse una mezcla de inhibidores de ALS a una tasa menor que la tasa de uso recomendada y las hierbas adventicias aún pueden ser selectivamente controladas. Los herbicidas que inhiben la acetolactato sintasa (también conocida como acetohidroxiácido sintasa) y, por tanto, son útiles en los métodos descritos en la presente, incluyen sulfonilureas, tal como se lista en la tabla 2, que incluyen sus sales agrícolamente adecuadas (por ejemplo, sales de sodio); sulfonilaminocarboniltriazolinonas, tal como se lista en la tabla 2, que incluyen sus sales agrícolamente adecuadas (por ejemplo, sales de sodio); triazolpirimidinas, tal como se lista en la tabla 2, que incluyen sus sales agrícolamente adecuadas (por ejemplo, sales de sodio); pirimidiniloxi(tio)benzoatos, tal como se lista en la tabla 2, que incluyen sus sales agrícolamente adecuadas (por ejemplo, sales de sodio); e imidazolinonas, tal como se lista en la tabla 2, que incluyen sus sales agrícolamente adecuadas (por ejemplo, sales de sodio). Los métodos descritos en la presente pueden comprender el uso de una sulfonilurea que no sea clorimurona-etilo, clorsulfurona, rimsulfurona, tifensulfurona-metilo, o tribenurona-metilo.

Así, una planta transgénica de la invención puede utilizarse en un método para cultivar un cultivo de soja DP-305423-1 mediante la aplicación de herbicidas a los cuales la planta es tolerante. De esta manera, se describe un tratamiento con una combinación de uno o más herbicidas que incluyen, pero no se limitan a: acetoclor, acifluorfenó y su sal de sodio, acilofenol, acroleína (2-propenal), alaclor, aloxidimó, ametrina, amicarbazona, amidosulfurona, aminopiridina, amitrol, sulfamato de amonio, anilofós, asulamo, atrazina, azimsulfurona, beflubutamida, benazolina, benazolina-etilo, bencarbazona, benfluralina, benfuresato, bensulfurona-metilo, bensulida, bentazona, benzobiciclona, benzofenapó, bifenox, bilanafós, bispiribaco y su sal de sodio, bromacilo, bromobutida, bromofenoxima, bromoxinilo, octanoato de bromoxinilo, butaclor, butafenacilo, butamifós, butralina, butroxidimó, butilato, cafenstrol, carbetamida, carfentrazona-etilo, catequina, clometoxifeno, clorambeno, clorbromurona, clorflurenol-metilo, cloridazona, clorimurona-etilo, clorotolurona, clorprofamo, clorsulfurona, clortal-dimetilo, clortiamida, cinidona-etilo, cinmetilina, cinosulfurona, cletodimó, clodinafop-propargilo, clomazona, clomeprop, clopiralida, clopiralida-olamina, cloransulamo-metilo, CUH-35 (2-[[[4-cloro-2-fluoro-5-[(1-metil-2-propinil)oxi]fenil](3-fluorobenzil)amino]carbonil]-1-ciclohexen-1-carboxilato de 2-metoxietilo), cumilurona, cianazina, cicloato, cicloulfamurona, cicloxidimó, cihalofop-butilo, 2,4-D y sus ésteres de butotilo, butilo, isoctilo e isopropilo y sus sales de dimetilamonio, diolamina y trolamina, daimurona, dalapona, dalapona-sodio, dazomet, 2,4-DB y sus sales de dimetilamonio, potasio y sodio, desmedifamo, desmetrina, dicamba y sus sales de diglicolamonio, dimetilamonio, potasio y sodio, diclobenilo, diclorprop, diclofop-metilo, diclosulamo, metilsulfato de difenzoquat, diflufenicano, diflufenzopiro, dimefurona, dimepiperato, dimetaclor, dimetametrina, dimetenamida, dimetenamida-P, dimetipina, ácido dimetilarsínico y su sal de sodio, dinitramina, dinoterb, difenamida, dibromuro de diquat, ditiopiro, diurona, DNOC, endotal, EPTC, esprocarb, etalfuralina, etametsulfurona-metilo, etofumesato, etoxifeno, etoxisulfurona, etobenzanida, fenoxaprop-etilo, fenoxaprop-P-etilo, fentrazamida, fenurona, fenurona-TCA, flamprop-metilo, flamprop-M-isopropilo, flamprop-M-metilo, flazasulfurona, florasulamo, fluazifop-butilo, fluazifop-P-butilo, flucarbazona, flucetosulfurona, fluclopiralida, flufenacetó, flufenpiro, flufenpiro-etilo, flumetsulamo, flumicloraco-pentilo, flumioxazina, fluometurona, fluoroglicofeno-etilo, flupirsulfurona-metilo y su sal de sodio, flurenol, flurenol-butilo, fluridona, fluorocloridona, fluroxipiro, flurtamona, flutiacetó-metilo, fomesafeno, foramsulfurona, fosamina-amonio, glufosinato, glufosinato-amonio, glifosato y sus sales, tales como sales de amonio, isopropilamonio, potasio, sodio (incluyendo sesquisodio) y trimesio (denominada también sulfosato), halosulfurona-metilo, haloxifop-etotilo, haloxifop-metilo, hexazinona, HOK-201 (N-(2,4-difluorofenilo)-1,5-dihidro-N-(1-metiletil)-5-oxo-1-[(tetrahydro-2H-piran-2-il)metil]-4H-1,2,4-triazol-4-carboxamida), imazametabenz-metilo, imazamox, imazapico, imazapiro, imazaquina, imazaquina-amonio, imazetapiro-amonio, imazosulfurona, indanofano, yodosulfurona-metilo, ioxinilo, octanoato de ioxinilo, ioxinil sodio, isoproturona, isourona, isoxabeno, isoxaflutol, isoxaclortol, lactofeno, lenacilo, linurona, maleico hidrazida, MCPA y sus sales (por ejemplo, MCPA-dimetilamonio, MCPA-potasio y MCPA-sodio,

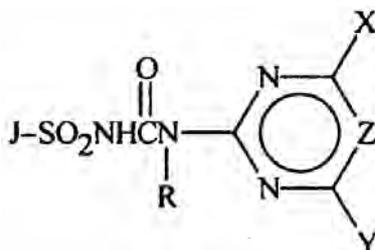
ésteres (por ejemplo, MCPA-2-etilhexilo, MCPA-butotilo) y tioésteres (por ejemplo, MCPA-tioetilo), MCPB y sus sales (por ejemplo, MCPB-sodio) y ésteres (por ejemplo, MCPB-etilo), mecoprop, mecoprop-P, mefenaceto, mefluidida, mesosulfurona-metilo, mesotriona, metamo-sodio, metamifop, metamitrona, metazaclor, metabenztiазurona, ácido metilarsonico y sus sales de calcio, monoamonio, monosodio y disodio, metildimrona, metobenzurona, metobromurona, metolaclor, S-metholaclor, metosulamo, metoxurona, metribuzina, metsulfurona-metilo, molinato, monolinurona, naproanilida, napropamida, naptalamo, neburona, nicosulfurona, norflurazona, orbencarb, orizalina, oxadiargilo, oxadiazono, oxasulfurona, oxaziclomefona, oxifluorfenol, dicloruro de paraquat, pebulato, ácido pelargónico, pendimetalina, penoxsulamo, pentanoclor, pentoxazona, perfluidona, petoxiamida, fenmedifamo, picloramo, picloramo-potasio, picolinafeno, pinoxadeno, piperofós, pretilaclor, primisulfurona-metilo, prodiamina, profoxidimo, prometona, prometrina, propaclor, propanilo, propaquizafop, propazina, profamo, propisoclor, propoxicarbazona, propizamida, prosulfocarb, prosulfurona, piraclonilo, pirafufenol-etilo, pirasulfotol, pirazogilo, pirazolinato, pirazoxifeno, pirazosulfurona-etilo, piribenzoxima, piributicarb, piridato, pirifalida, piriminobaco-metilo, pirimisulfano, piritiobaco, piritiobaco-sodio, piroxsulamo, quincloraco, quinmeraco, quinoclamina, quizalofop-etilo, quizalofop-metilo, quizalofop-P-tefurilo, rimsulfurona, setoxidimo, sidurona, simazina, simetrina, sulcotriona, sulfentazona, sulfometurona-metilo, sulfosulfurona, 2,3,6-TBA, TCA, TCA-sodio, tebutamo, tebutiurona, tefuritriona, tembotriona, tepraloxidimo, terbacilo, terbumetona, terbutilazina, terbutrina, tenilclor, tiazopiro, tiencarbazona, tifensulfurona-metilo, tiobencarb, tiocarbazilo, topramezona, tralcoxidimo, tri-alato, triasulfurona, triaziflamo, tribenurona-metilo, triclopiro, triclopirbutotilo, triclopiro-trietilamonio, tridifano, trietazina, trifloxisulfurona, trifluralina, triflusulfurona-metilo, tritosulfurona y vernolato.

Otros herbicidas y productos químicos agrícolas adecuados son conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, los descritos en el documento WO 2005/041654. Otros herbicidas incluyen también bioherbicidas, tales como *Alternaria destruens* Simmons, *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., *Drechslera monoceras* (MTB-951), *Myrothecium verrucaria* (Albertini & Schweinitz) Ditmar: Fries, *Phytophthora palmivora* (Butl.) Butl. y *Puccinia thlaspeos* Schub. Las combinaciones de diversos herbicidas pueden producir un efecto mayor que el aditivo (es decir, sinérgico) sobre las hierbas adventicias y/o un efecto menor que el aditivo (es decir, efecto antídoto) en cultivos u otras plantas deseables. Las cantidades herbicidamente eficaces de cualquier herbicida concreto pueden ser determinadas con facilidad por los expertos en la técnica mediante unos sencillos experimentos.

Los herbicidas pueden clasificarse en grupos y/o subgrupos, según se describió anteriormente en la presente, remitiéndose a su modo de acción, o pueden clasificarse en grupos y/o subgrupos según su estructura química.

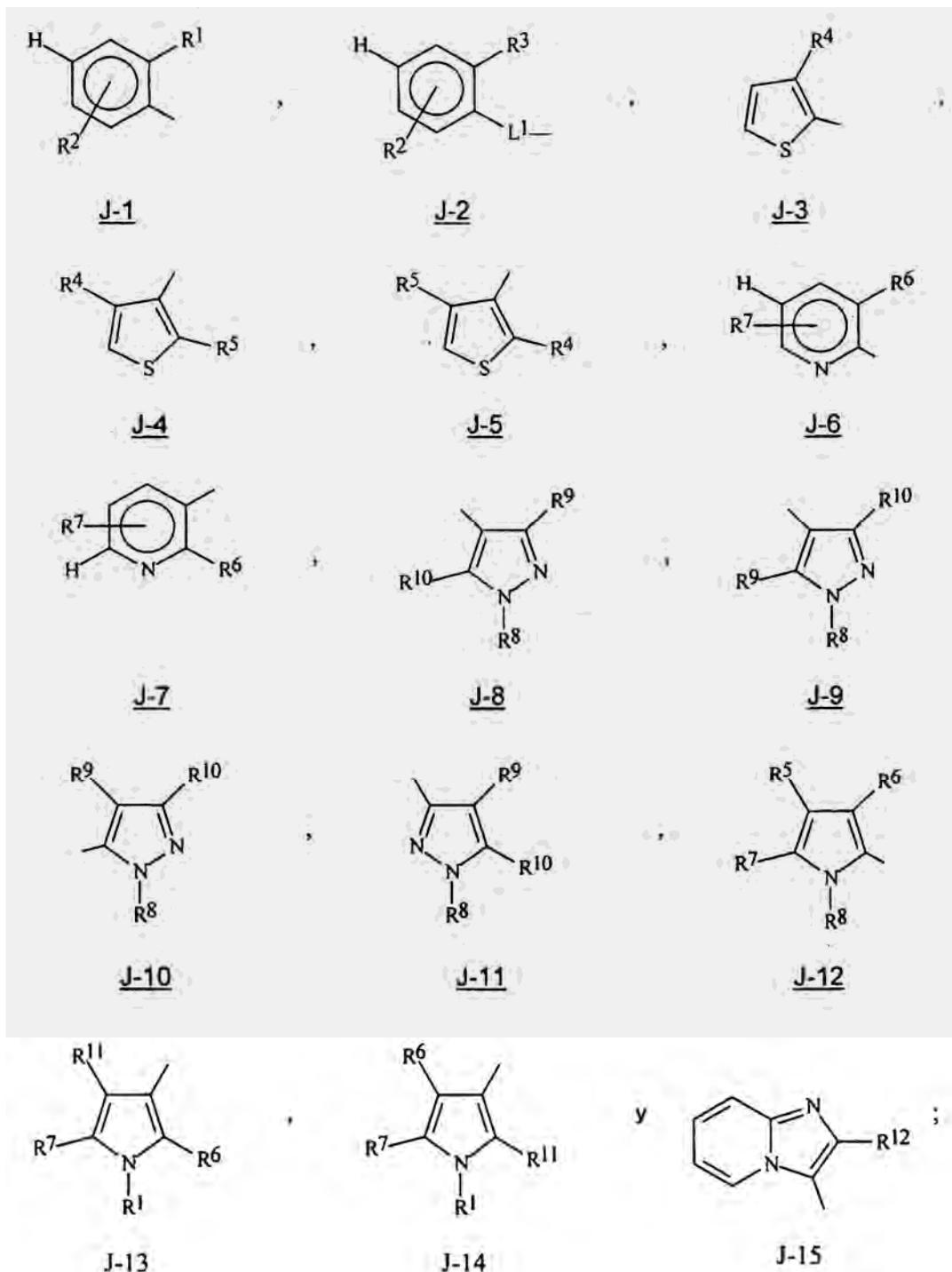
Los herbicidas de sulfonamida tienen, como característica de estructura molecular fundamental, un resto sulfonamida (-S(O)₂NH-). Tal como se mencionan en la presente, los herbicidas de sulfonamida comprenden, en particular, herbicidas de sulfonilurea, herbicidas de sulfonilaminocarboniltriaolinona y herbicidas de triazolopirimidina. En los herbicidas de sulfonilurea, el resto sulfonamida es un componente en un puente de sulfonilurea (-S(O)₂NHC(O)NH(R)-). En los herbicidas de sulfonilurea, el extremo sulfonilo y el puente de sulfonilurea están conectados directamente o a través de un átomo de oxígeno o un grupo amino o metileno opcionalmente sustituido con un grupo cíclico o acíclico generalmente sustituido. En el extremo opuesto al puente de sulfonilurea, el grupo amino, que puede tener un sustituyente, tal como metilo (R es CH₃) en lugar de hidrógeno, está conectado a un grupo heterocíclico, generalmente un anillo de pirimidina o triazina simétrico, que tiene uno o dos sustituyentes, tales como metilo, etilo, trifluorometilo, metoxi, etoxi, metilamino, dimetilamino, etilamino y los halógenos. En los herbicidas de sulfonilaminocarboniltriaolinona, el resto sulfonamida es un componente de un puente de sulfonilaminocarbonilo (-S(O)₂NHC(O)-). En los herbicidas de sulfonilaminocarboniltriaolinona, el extremo sulfonilo del puente de sulfonilaminocarbonilo generalmente está conectado con un anillo de fenilo sustituido. En extremo opuesto del puente de sulfonilaminocarbonilo, el carbonilo está conectado a la posición 1 de un anillo de triazolinona, que generalmente está sustituido con grupos tales como alquilo y alcoxi. En los herbicidas de triazolopirimidina, el extremo sulfonilo del resto sulfonamida está conectado con la posición 2 de un sistema de anillo de [1,2,4]triazolopirimidina sustituida, y el extremo amino del resto sulfonamida está conectado con un arilo sustituido, generalmente un grupo fenilo o, como alternativa, el extremo amino del resto sulfonamida está conectado con la posición 2 de un sistema de anillo de [1,2,4]triazolopirimidina sustituida, y el extremo sulfonilo del resto sulfonamida está conectado con un grupo arilo sustituido, generalmente pirdinilo.

Los ejemplos de herbicidas de sulfonilurea útiles en los métodos descritos en la presente son los que presentan la fórmula:



en la que:

J se selecciona del grupo que consiste en:



J es $R^{13}SO_2N(CH_3)-$;

R es H o CH_3 ;

5 R^1 es F, Cl, Br, NO_2 , alquilo C_1-C_4 , haloalquilo C_1-C_4 , cicloalquilo C_3-C_4 , haloalquenilo C_2-C_4 , alcoxi C_1-C_4 , haloalcoxi C_1-C_4 , (alcoxi C_2-C_4)alcoxi, CO_2R^{14} , $C(O)NR^{15}R^{16}$, $SO_2NR^{17}R^{18}$, $S(O)_nR^{19}$, $C(O)R^{20}$, CH_2CN o L;

R^2 es H, F, Cl, Br, I, CN, CH_3 , OCH_3 , SCH_3 , CF_3 o OCF_2H ;

R^3 es Cl, NO_2 , CO_2CH_3 , $CO_2CH_2CH_3$, $C(O)CH_3$, $C(O)CH_2CH_3$, $C(O)$ -ciclopropilo, $SO_2N(CH_3)_2$, SO_2CH_3 , $SO_2CH_2CH_3$, OCH_3 u OCH_2CH_3 ;

R⁴ es alquilo C₁-C₃, haloalquilo C₁-C₂, alcoxi C₁-C₂, haloalquenilo C₂-C₄, F, Cl, Br, NO₂, CO₂R¹⁴, C(O)NR¹⁵R¹⁶, SO₂NR¹⁷R¹⁸, S(O)_nR¹⁹, C(O)R²⁰ o L;

R⁵ es H, F, Cl, Br o CH₃;

5 R⁶ es alquilo C₁-C₃ opcionalmente sustituido con 0-3 F, 0-1 Cl y 0-1 (alcoxi C₃-C₄)acetiloxi, o R⁶ es alcoxi C₁-C₂, haloalquenilo C₂-C₄, F, Cl, Br, CO₂R¹⁴, C(O)NR¹⁵R¹⁶, SO₂NR¹⁷R¹⁸, S(O)_nR¹⁹, C(O)R²⁰ o L;

R⁷ es H, F, Cl, CH₃ o CF₃;

R⁸ es H, alquilo C₁-C₃ o piridinilo;

R⁹ es alquilo C₁-C₃, alcoxi C₁-C₂, F, Cl, Br, NO₂, CO₂R¹⁴, SO₂NR¹⁷R¹⁸, S(O)_nR¹⁹, OCF₂H, C(O)R²⁰, haloalquenilo C₂-C₄ o L;

10 R¹⁰ es H, Cl, F, Br, alquilo C₁-C₃ o alcoxi C₁-C₂;

R¹¹ es H, alquilo C₁-C₃, alcoxi C₁-C₂, haloalquenilo C₂-C₄, F, Cl, Br, CO₂R¹⁴, C(O)NR¹⁵R¹⁶, SO₂NR¹⁷R¹⁸, S(O)_nR¹⁹, C(O)R²⁰ o L;

R¹² es halógeno, alquilo C₁-C₄ o alquilsulfonilo C₁-C₃;

R¹³ es alquilo C₁-C₄;

15 R¹⁴ es alilo, propargilo u oxetan-3-ilo; o R¹⁴ es alquilo C₁-C₃ opcionalmente sustituido con al menos un miembro seleccionado independientemente de halógeno, alcoxi C₁-C₂ y CN;

R¹⁵ es H, alquilo C₁-C₃ o alcoxi C₁-C₂;

R¹⁶ es alquilo C₁-C₂;

R¹⁷ es H, alquilo C₁-C₃, alcoxi C₁-C₂, alilo o ciclopropilo;

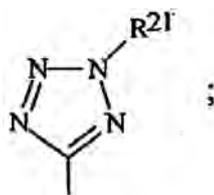
20 R¹⁸ es H o alquilo C₁-C₃;

R¹⁹ es alquilo C₁-C₃, haloalquilo C₁-C₃, alilo o propargilo;

R²⁰ es alquilo C₁-C₄, haloalquilo C₁-C₄ o cicloalquilo C₃-C₅ opcionalmente con halógeno;

n es 0, 1 o 2;

L es



25

L¹ es CH₂, NH o O;

R²¹ es H o alquilo C₁-C₃;

X es H, alquilo C₁-C₄, alcoxi C₁-C₄, haloalcoxi C₁-C₄, haloalquilo C₁-C₄, haloalquiltio C₁-C₄, alquiltio C₁-C₄, halógeno, (alcoxi C₂-C₅)alquilo, (alcoxi C₂-C₅)alcoxi, amino, alquilamino C₁-C₃ o di(alquil C₁-C₃)amino;

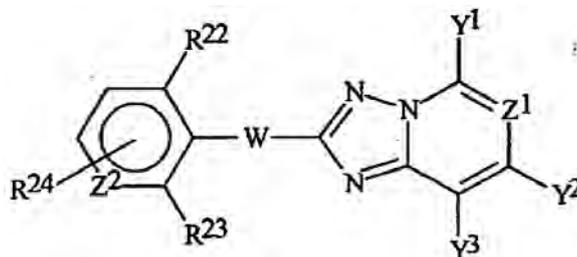
30 Y es H, alquilo C₁-C₄, alcoxi C₁-C₄, haloalcoxi C₁-C₄, alquiltio C₁-C₄, haloalquiltio C₁-C₄, (alcoxi C₂-C₅)alquilo, (alcoxi C₂-C₅)alcoxi, amino, alquilamino C₁-C₃, di(alquil C₁-C₃)amino, alqueniloxi C₃-C₄, alquiniloxi C₃-C₄, (alquil C₂-C₅)tioalquilo, (alquil C₂-C₅)sulfinilalquilo, (alquil C₂-C₅)sulfonilalquilo, haloalquilo C₁-C₄, alquinilo C₂-C₄, cicloalquilo C₃-C₅, azido o ciano; y

Z es CH o N;

35 con la condición de que: (i) cuando uno o ambos de X e Y es haloalcoxi C₁, entonces Z es CH; y (ii) cuando X es halógeno, entonces Z es CH e Y es OCH₃, OCH₂CH₃, N(OCH₃)CH₃, NHCH₃, N(CH₃)₂ o OCF₂H. Merece mencionarse la composición herbicida líquida única de la presente que comprende una o más sulfonilureas de fórmula I, en la que R⁶ es alquilo, y dicho alquilo no está sustituido.

Los ejemplos de herbicidas de triazolopirimidina contemplados para su uso en los métodos descritos en la presente

son los que presentan la fórmula:



en la que:

5 R^{22} y R^{23} son cada uno independientemente halógeno, nitro, alquilo C_1-C_4 , haloalquilo C_1-C_4 , alcoxi C_1-C_4 , haloalcoxi C_1-C_4 o (alcoxi C_2-C_3)carbonilo;

R^{24} es H, halógeno, alquilo C_1-C_2 o alcoxi C_1-C_2 ;

W es $-NHS(O)_2-$ o $-S(O)_2NH-$;

Y^1 es H, alquilo C_1-C_2 o alcoxi C_1-C_2 ;

Y^2 es H, F, Cl, Br, alquilo C_1-C_2 o alcoxi C_1-C_2 ;

10 Y^3 es H, F o metoxi;

Z^1 es CH o N; y

Z^2 es CH o N;

con la condición de que al menos uno de Y^1 e Y^2 es distinto de H.

15 En la anterior descripción de Markush de los herbicidas de triazolopirimidina representativos, cuando W es $-NHS(O)_2-$, el extremo sulfonilo del resto sulfonamida está conectado con el sistema de anillo de [1,2,4]triazolopirimidina, y cuando W es $-S(O)_2NH-$, el extremo amino del resto sulfonamida está conectado con el sistema de anillo de [1,2,4]triazolopirimidina.

20 En las anteriores relaciones, el término "alquilo", utilizado por sí solo o en palabras compuestas, tales como "alquilitio" o "haloalquilo", incluye alquilo de cadena lineal o ramificada, tal como metilo, etilo, n-propilo, *i*-propilo, o los diferentes isómeros de butilo. "Cicloalquilo" incluye, por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo y ciclopentilo. "Alquenilo" incluye alquenos de cadena lineal o ramificada, tales como etenilo, 1-propenilo, 2-propenilo, y los diferentes isómeros de butenilo. "Alquenilo" también incluye polienos, tales como 1,2-propadienilo y 2,4-butadienilo. "Alquinilo" incluye alquinos de cadena lineal o ramificada, tales como etinilo, 1-propinilo, 2-propinilo y los diferentes isómeros de butinilo. "Alquinilo" también puede incluir restos formados por múltiples enlaces triples, tales como 2,5-hexadiinilo.

25 "Alcoxi" incluye, por ejemplo, metoxi, etoxi, n-propiloxi, isopropiloxi y los diferentes isómeros de butoxi. "Alcoxialquilo" indica una sustitución alcoxi sobre un alquilo. Los ejemplos de "alcoxialquilo" incluyen CH_3OCH_2 , $CH_3OCH_2CH_2$, $CH_3CH_2OCH_2$, $CH_3CH_2CH_2CH_2OCH_2$ y $CH_3CH_2OCH_2CH_2$. "Alcoxialcoxi" indica una sustitución alcoxi sobre un alcoxi. "Alqueniloxi" incluye restos alqueniloxi de cadena lineal o ramificada. Los ejemplos de "alqueniloxi" incluyen $H_2C=CHCH_2O$, $(CH_3)CH=CHCH_2O$ y $CH_2=CHCH_2CH_2O$. "Alquiniloxi" incluyen restos alquiniloxi de cadena lineal o ramificada. Los ejemplos de "alquiniloxi" incluyen $HC\equiv CCH_2O$ y $CH_3C\equiv CCH_2O$. "Alquilitio" incluye restos alquilitio de cadena lineal o ramificada, tales como metilitio, etilitio y los diferentes isómeros de propilitio. "Alquilitioalquilo" indica una sustitución alquilitio sobre un alquilo. Los ejemplos de "alquilitioalquilo" incluyen CH_3SCH_2 , $CH_3SCH_2CH_2$, $CH_3CH_2SCH_2$, $CH_3CH_2CH_2CH_2SCH_2$ y $CH_3CH_2SCH_2CH_2$; "alquilsulfinilalquilo" y "alquilsulfonilalquilo" incluyen los correspondientes sulfóxidos y sulfonas, respectivamente. Otros sustituyentes, tales como "alquilamino", "dialquilamino", se definen de modo análogo.

35

El número total de átomos de carbono en un grupo sustituyente se indica mediante el prefijo " C_i-C_j ", en el que *i* y *j* son números de 1 a 5. Por ejemplo, alquilo C_1-C_4 indica de metilo a butilo, incluyendo los diversos isómeros. Como otros ejemplos, (alcoxi C_2)alquilo indica CH_3OCH_2 ; (alcoxi C_3)alquilo indica, por ejemplo, $CH_3CH(OCH_3)$, $CH_3OCH_2CH_2$ o $CH_3CH_2OCH_2$; y (alcoxi C_4)alquilo indica los diversos isómeros de un grupo alquilo sustituido con un grupo alcoxi que contiene un total de cuatro átomos de carbono, cuyos ejemplos incluyen $CH_3CH_2CH_2OCH_2$ y $CH_3CH_2OCH_2CH_2$.

40

El término "halógeno", utilizado por sí solo o en palabras compuestas, tales como "haloalquilo", incluye flúor, cloro, bromo o yodo. Además, cuando se emplea en palabras compuestas, tales como "haloalquilo", dicho alquilo puede estar parcial o totalmente sustituido con átomos de halógeno que pueden ser iguales o diferentes. Los ejemplos de "haloalquilo" incluyen F_3C , $ClCH_2$, CF_3CH_2 y CF_3CCl_2 . Los términos "haloalcoxi", "haloalquilitio", y similares, se

45

definen de modo análogo al término "haloalquilo". Los ejemplos de "haloalcoxi" incluyen CF_3O , $\text{CCl}_3\text{CH}_2\text{O}$, $\text{HCF}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ y $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{O}$. Los ejemplos de "haloalquilitio" incluyen CCl_3S , CF_3S , $\text{CCl}_3\text{CH}_2\text{S}$ y $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$.

Los siguientes herbicidas de sulfonilurea ilustran las sulfonilureas útiles para los métodos descritos en la presente: amidosulfurona (*N*-[[[(4,6-dimetoxi-2-pirimidinil)amino]carbonil]amino]sulfonil]-*N*-metilmetansulfonamida), azimsulfurona (*N*-[[[(4,6-dimetoxi-2-pirimidinil)amino]carbonil]-1-metil-4-(2-metil-2*H*-tetrazol-5-il)-1*H*-pirazol-5-sulfonamida), bensulfurona-metilo (2-[[[(4,6-dimetoxi-2-pirimidinil)amino]carbonil]amino]sulfonil]metil]benzoato de metilo), clorimurona-etilo (2-[[[(4-cloro-6-metoxi-2-pirimidinil)amino]carbonil]amino]sulfonil]benzoato de etilo), clorsulfurona (2-cloro-*N*-[[[(4-metoxi-6-metil-1,3,5-triazin-2-il)amino]carbonil]bencensulfonamida), cinosulfurona (*N*-[[[(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)amino]carbonil]-2-(2-metoxi)bencensulfonamida), ciclosulfamurona (*N*-[[2-(ciclopropilcarbonil)fenil]amino]sulfonil]-*N*-(4,6-dimetoxipirimidin-2-il)urea), etametsulfurona-metilo (2-[[[(4-etoxi-6-(metilamino)-1,3,5-triazin-2-il)amino]carbonil]amino]sulfonil]benzoato de metilo), etoxisulfurona (2-etoxifenil-[[[(4,6-dimetoxi-2-pirimidinil)amino]carbonil]sulfamato), flazasulfurona (*N*-[[[(4,6-dimetoxi-2-pirimidinil)amino]carbonil]-3-(trifluorometil)-2-piridinsulfonamida), flucetosulfurona (metoxiacetato de 1-[3-[[[(4,6-dimetoxi-2-pirimidinil)amino]carbonil]amino]sulfonil]-2-piridinil]-2-fluoropropilo), flupirsulfurona-metilo (2-[[[(4,6-dimetoxi-2-pirimidinil)amino]carbonil]amino]sulfonil]-6-(trifluorometil)-3-piridincarboxilato de metilo), foramsulfurona (2-[[[(4,6-dimetoxi-2-pirimidinil)amino]carbonil]amino]sulfonil]-4-(formilamino)-*N,N*-dimetilbenzamida), halosulfurona-metilo (3-cloro-5-[[[(4,6-dimetoxi-2-pirimidinil)amino]carbonil]amino]sulfonil]-1-metil-1*H*-pirazol-4-carboxilato de metilo), imazosulfurona (2-cloro-*N*-[[[(4,6-dimetoxi-2-pirimidinil)amino]carbonil]-imidazo[1,2-*a*]piridin-3-sulfonamida), yodosulfurona-metilo (4-yodo-2-[[[(4-metoxi-6-metil-1,3,5-triazin-2-il)amino]carbonil]amino]sulfonil]benzoato de metilo), mesosulfurona-metilo (2-[[[(4,6-dimetoxi-2-pirimidinil)amino]carbonil]amino]sulfonil]-4-[[[(metilsulfonil)amino]metil]benzoato de metilo), metsulfurona-metilo (2-[[[(4-metoxi-6-metil-1,3,5-triazin-2-il)amino]carbonil]amino]sulfonil]benzoato de metilo), nicosulfurona (2-[[[(4,6-dimetoxi-2-pirimidinil)amino]carbonil]amino]sulfonil]-*N,N*-dimetil-3-piridincarboxamida), oxasulfurona (2-[[[(4,6-dimetil-2-pirimidinil)amino]carbonil]amino]sulfonil]benzoato de 3-oxetanilo), primisulfurona-metilo (2-[[[(4,6-bis(trifluorometoxi)-2-pirimidinil]amino]carbonil]amino]sulfonil]benzoato de metilo), prosulfurona (*N*-[[[(4-metoxi-6-metil-1,3,5-triazin-2-il)amino]carbonil]-2-(3,3,3-trifluoro-propil)bencensulfonamida), pirazosulfurona-etilo (5-[[[(4,6-dimetoxi-2-pirimidinil)amino]carbonil]amino]sulfonil]-1-metil-1*H*-pirazol-4-carboxilato de etilo), rimsulfurona (*N*-[[[(4,6-dimetoxi-2-pirimidinil)amino]carbonil]-3-(etilsulfonil)-2-piridinsulfonamida), sulfometurona-metilo (2-[[[(4,6-dimetil-2-pirimidinil)amino]carbonil]amino]sulfonil]benzoato de metilo), sulfosulfurona (*N*-[[[(4,6-dimetoxi-2-pirimidinil)amino]carbonil]-2-(etilsulfonil)imidazo[1,2-*a*]piridin-3-sulfonamida), tifensulfurona-metilo (3-[[[(4-metoxi-6-metil-1,3,5-triazin-2-il)amino]carbonil]amino]sulfonil]-2-tiofencarboxilato de metilo), triasulfurona (2-(2-cloroetoxi)-*N*-[[[(4-metoxi-6-metil-1,3,5-triazin-2-il)amino]carbonil]bencensulfonamida), tribenurona-metilo (2-[[[*N*-(4-metoxi-6-metil-1,3,5-triazin-2-il)-*N*-metilamino]carbonil]amino]sulfonil]benzoato de metilo), trifloxisulfurona (*N*-[[[(4,6-dimetoxi-2-pirimidinil)amino]carbonil]-3-(2,2,2-trifluoroetoxi)-2-piridinsulfonamida), triflusulfurona-metilo (2-[[[(4-dimetilamino)-6-(2,2,2-trifluoroetoxi)-1,3,5-triazin-2-il]amino]carbonil]amino]sulfonil]-3-metilbenzoato de metilo) y tritosulfurona (*N*-[[[(4-metoxi-6-(trifluorometil)-1,3,5-triazin-2-il)amino]carbonil]-2-(trifluorometil)bencensulfonamida).

Los siguientes herbicidas de triazolopirimidina ilustran las triazolopirimidinas útiles para los métodos descritos en la presente: cloransulamo-metilo (3-cloro-2-[[[(5-etoxi-7-fluoro[1,2,4]triazolo[1,5-*c*]pirimidin-2-il)sulfonil]amino]benzoato de metilo), diclosulamo (*N*-(2,6-diclorofenil)-5-etoxi-7-fluoro[1,2,4]triazolo[1,5-*c*]pirimidin-2-sulfonamida), florasulamo (*N*-(2,6-difluorofenil)-8-fluoro-5-metoxi[1,2,4]triazolo[1,5-*c*]pirimidin-2-sulfonamida), flumetsulamo (*N*-(2,6-difluorofenil)-5-metil[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidin-2-sulfonamida), metosulamo (*N*-(2,6-dicloro-3-metilfenil)-5,7-dimetoxi[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidin-2-sulfonamida), penoxsulamo (2-(2,2-difluoroetoxi)-*N*-(5,8-dimetoxi[1,2,4]triazolo[1,5-*c*]pirimidin-2-il)-6-(trifluorometil)bencensulfonamida) y proixsulamo (*N*-(5,7-dimetoxi[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidin-2-il)-2-metoxi-4-(trifluorometil)-3-piridinsulfonamida).

Los siguientes herbicidas de sulfonilaminocarboniltriazolinona ilustran las sulfonilaminocarboniltriazolinonas útiles para los métodos descritos en la presente: flucarbazona (4,5-dihidro-3-metoxi-4-metil-5-oxo-*N*-[[2-(trifluorometoxi)fenil]sulfonil]-1*H*-1,2,4-triazol-1-carboxamida) y procarbazona (2-[[[(4,5-dihidro-4-metil)-5-oxo-3-propoxi-1*H*-1,2,4-triazol-1-il]carbonil]amino]sulfonil]benzoato de metilo).

Otros herbicidas incluyen fenmedifamo, triazolinonas, y los herbicidas descritos en el documento WO2006/012981.

Los métodos descritos en la presente comprenden además aplicar al cultivo y a las hierbas adventicias en un campo una cantidad suficiente de al menos un herbicida al cual las semillas o las plantas del cultivo son tolerantes, tal como, por ejemplo, glifosato, un inhibidor de hidroxifenilpiruvatodioxigenasa (por ejemplo, mesotriona o sulcotriona), un inhibidor de fitoeno desaturasa (por ejemplo, diflufenicano), un inhibidor de la síntesis de pigmentos, sulfonamida, imidazolinona, bialafós, fosfinotricina, azafenidina, butafenacilo, sulfosato, glufosinato, triazolopirimidina, pirimidiniloxi(tio)benzoato, o sulfonilaminocarboniltriazolinona, un inhibidor de acetil Co-A carboxilasa, tal como quizalofop-P-etilo, una auxina sintética, tal como quincloraco, o un inhibidor de protox para controlar las hierbas adventicias sin dañar significativamente a las plantas del cultivo.

En general, la cantidad eficaz de herbicida aplicada al campo es suficiente para controlar selectivamente las hierbas adventicias sin dañar significativamente al cultivo. Una "hierba adventicia", tal como se emplea en la presente, se refiere a una planta que no resulta deseable en un área concreta. A la inversa, una "planta de cultivo", tal como se emplea en la presente, se refiere a una planta que se desea en un área concreta, tal como, por ejemplo, una planta

de soja. Así, una hierba adventicia puede ser una planta que no es un cultivo o una especie que no es un cultivo, o una hierba adventicia puede ser una especie de cultivo que se desea eliminar de un área concreta, tal como, por ejemplo, una planta de soja no transgénica y/o inferior en un campo plantado con el acontecimiento DP-305423-1 de soja, o una planta de maíz en un campo plantado con DP-305423-1. Las hierbas adventicias pueden clasificarse en dos grupos principales: monocotiledóneas y dicotiledóneas.

Muchas especies vegetales pueden controlarse (es decir, matarse o dañarse) por medio de los herbicidas descritos en la presente. Por consiguiente, los métodos descritos en la presente son útiles para controlar estas especies vegetales cuando resultan indeseables (es decir, cuando son hierbas adventicias). Estas especies vegetales incluyen plantas de cultivo, así como especies que se consideran habitualmente hierbas adventicias, que incluyen, pero no se limitan a especies tales como: cola de zorra (*Alopecurus myosuroides*), almorejo (*Setaria faberi*), pata de gallina (*Digitaria sanguinalis*), pasto amargo (*Brachiaria decumbens*), avena salvaje (*Avena fatua*), cachurro (*Xanthium pensylvanicum*), cenizo (*Chenopodium album*), yedra colorada (*Ipomoea coccinea*), amaranto (*Amaranthus spp.*), yute de China (*Abutilon theophrasti*), pasto dentado (*Echinochloa crusgalli*), grama común (*Cynodon dactylon*), arabueyes (*Bromus tectorum*), capín (*Eleusine indica*), cebadilla (*Setaria viridis*), raigrás italiano (*Lolium multiflorum*), sorgo de Alepo (*Sorghum halepense*), alpistillo (*Phalaris minor*), agrostis silvestre (*Apera spicaventi*), paspalo veloso (*Erichloa villosa*), juncia avellanada (*Cyperus esculentus*), pamplina (*Stellaria media*), altamisa (*Ambrosia artemisiifolia*), *Kochia scoparia*, erigero del Canadá (*Conyza canadensis*), vallico (*Lolium rigidum*), paja de burro (*Eleusine indica*), rama negra (*Conyza bonariensis*), llantén menor (*Plantago lanceolata*), golondrina (*Commelina benghalensis*), correhuela (*Convolvulus arvensis*), juncia real (*Cyperus rotundus*), viña roja (*Brunnichia ovata*), tamarindillo (*Sesbania exaltata*), palo zorrillo (*Senna obtusifolia*), girasol enano (*Helianthus ciliaris*), y garras del diablo (*Proboscidea louisianica*). La hierba adventicia puede comprender un raigrás resistente a herbicidas, por ejemplo, un raigrás resistente al glifosato, un raigrás resistente al paraquat, un raigrás resistente a un inhibidor de ACCasa, y un raigrás resistente a un herbicida no selectivo. Las plantas no deseadas pueden estar próximas a las plantas del cultivo.

Tal como se emplea en la presente, "controlado selectivamente" significa que la mayoría de las hierbas adventicias en un área de cultivo resultan significativamente dañadas o muertas, mientras que, si las plantas del cultivo también están presentes en el campo, la mayoría de las plantas del cultivo no resultan significativamente dañadas. Así, se considera que un método controla selectivamente a las hierbas adventicias cuando al menos 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o más de las hierbas adventicias resultan significativamente dañadas o muertas, mientras que, si las plantas del cultivo también están presentes en el campo, menos del 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, o 1% de las plantas del cultivo resultan significativamente dañadas o muertas.

Una planta DP-305423-1 de soja de la invención puede no ser significativamente dañada por un tratamiento con un herbicida concreto aplicado a esa planta a una dosis equivalente a una tasa de al menos 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 150, 170, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 800, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 o más gramos u onzas (1 onza = 29,57 ml) de ingrediente activo o producto comercial o formulación de herbicida por acre o por hectárea, al mismo tiempo que una planta control apropiada resulta significativamente dañada por el mismo tratamiento.

Una cantidad eficaz de un herbicida inhibidor de ALS puede comprender al menos aproximadamente 0,1, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, o más gramos u onzas (1 onza = 29,57 ml) de ingrediente activo por hectárea. Una cantidad eficaz de un herbicida inhibidor de ALS puede comprender al menos aproximadamente 0,1-50, aproximadamente 25-75, aproximadamente 50-100, aproximadamente 100-110, aproximadamente 110-120, aproximadamente 120-130, aproximadamente 130-140, aproximadamente 140-150, aproximadamente 150-200, aproximadamente 200-500, aproximadamente 500-600, aproximadamente 600-800, aproximadamente 800-1000, o más gramos u onzas (1 onza = 29,57 ml) de ingrediente activo por hectárea. Puede aplicarse cualquier inhibidor de ALS, por ejemplo, los listados en la tabla 2, a estos niveles.

Una cantidad eficaz de una sulfonilurea puede comprender al menos 0,1, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 5000 o más gramos u onzas (1 onza = 29,57 ml) de ingrediente activo por hectárea. Una cantidad eficaz de una sulfonilurea puede comprender al menos aproximadamente 0,1-50, aproximadamente 25-75, aproximadamente 50-100, aproximadamente 100-110, aproximadamente 110-120, aproximadamente 120-130, aproximadamente 130-140, aproximadamente 140-150, aproximadamente 150-160, aproximadamente 160-170, aproximadamente 170-180, aproximadamente 190-200, aproximadamente 200-250, aproximadamente 250-300, aproximadamente 300-350, aproximadamente 350-400, aproximadamente 400-450, aproximadamente 450-500, aproximadamente 500-550, aproximadamente 550-600, aproximadamente 600-650, aproximadamente 650-700, aproximadamente 700-800, aproximadamente 800-900, aproximadamente 900-1000, aproximadamente 1000-2000, o más gramos u onzas (1 onza = 29,57 ml) de ingrediente activo por hectárea. Los ejemplos de sulfonilureas que pueden aplicarse a este nivel se indican en la tabla 2.

Una cantidad eficaz de una sulfonilaminocarboniltriazolinona, triazolopirimidina, pirimidiniloxi(tio)benzoato, e imidazolinona puede comprender al menos aproximadamente 0,1, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350, 1400, 1500, 1550, 1600, 1650, 1700, 1800, 1850, 1900, 1950, 2000, 2500, 3500, 4000, 4500, 5000 o más gramos u onzas

- (1 onza = 29,57 ml) de ingrediente activo por hectárea. Una cantidad eficaz de una sulfonilaminocarboniltriazolina, triazolopirimidina, pirimidiniloxi(tio)benzoato, o imidazolinona puede comprender al menos aproximadamente 0,1-50, aproximadamente 25-75, aproximadamente 50-100, aproximadamente 100-110, aproximadamente 110-120, aproximadamente 120-130, aproximadamente 130-140, aproximadamente 140-150, aproximadamente 150-160, aproximadamente 160-170, aproximadamente 170-180, aproximadamente 190-200, aproximadamente 200-250, aproximadamente 250-300, aproximadamente 300-350, aproximadamente 350-400, aproximadamente 400-450, aproximadamente 450-500, aproximadamente 500-550, aproximadamente 550-600, aproximadamente 600-650, aproximadamente 650-700, aproximadamente 700-800, aproximadamente 800-900, aproximadamente 900-1000, aproximadamente 1000-2000, o más gramos u onzas (1 onza = 29,57 ml) de ingrediente activo por hectárea.
- 5 Otros intervalos de cantidades eficaces de herbicidas pueden encontrarse, por ejemplo, en diversas publicaciones de los servicios de extensión de universidades. Véase, por ejemplo, Bernards *et al.* (2006), Guide for Weed Management in Nebraska (www.ianrpubs.url.edu/sendt/ec130); Regher *et al.* (2005), Chemical Weed Control for Fields Crops, Pastures, Rangeland, and Noncropland, Kansas State University Agricultural Extension Station and Corporate Extension Service; Zollinger *et al.* (2006), North Dakota Weed Control Guide, North Dakota Extension Service, y the Iowa State University Extension en www.weeds.iastate.edu.
- 10 Los herbicidas conocidos por inhibir ALS varían en su ingrediente activo, así como en sus formulaciones químicas. Los expertos en la técnica están familiarizados con la determinación de la cantidad de ingrediente activo y/o ácido equivalente presente en un volumen y/o peso concreto de preparación de herbicida.
- 15 Las tasas en las que se aplica el herbicida inhibidor de ALS al cultivo, parte del cultivo, semilla o área de cultivo pueden ser cualquiera de las tasas descritas en la presente. La tasa para el herbicida inhibidor de ALS puede ser de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5000 g ai/hectárea, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 300 g ai/hectárea, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 150 g ai/hectárea.
- 20 En general, un herbicida concreto se aplica a un campo concreto (y a cualquier planta que crezca en él) no más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, u 8 veces al año, o no más de 1, 2, 3, 4, o 5 veces por temporada de cosecha.
- 25 "Tratado con una combinación de" o "aplicar una combinación de herbicidas a un cultivo, un área de cultivo o un campo" significa que un campo, cultivo o hierba adventicia concreto se trata con cada uno de los herbicidas y/o productos químicos indicados como parte de la combinación, de modo que se logra un efecto deseado, es decir, que las hierbas adventicias son controladas selectivamente mientras que el cultivo no resulta significativamente dañado. Las hierbas adventicias que son susceptibles a cada uno de los herbicidas muestran daños consecuencia del tratamiento con cada uno de los herbicidas que pueden ser aditivos o sinérgicos. La aplicación de cada herbicida y/o producto químico puede ser simultánea, o las aplicaciones pueden realizarse en diferentes momentos, con la condición de que se logre el efecto deseado. Además, la aplicación puede producirse antes de plantar el cultivo.
- 30 Las proporciones de herbicidas empleadas en los métodos descritos en la presente con otros ingredientes activos herbicidas en las composiciones herbicidas en general están en la proporción de 5000:1 a 1:5000, de 1000:1 a 1:1000, de 100:1 a 1:100, de 10:1 a 1:10, o de 5:1 a 1:5 en peso. Las proporciones óptimas pueden ser determinadas con facilidad por los expertos en la técnica basándose en el espectro de control de hierbas adventicias deseado. Además, también pueden aplicarse muchas combinaciones de intervalos de los diversos herbicidas descritos en la tabla 2 en los métodos descritos en la presente.
- 35 Así, en la presente se describen métodos mejorados para el control selectivo de hierbas adventicias en un campo, en el que la aplicación total de herbicida puede ser menor que 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, o 1% que la empleada en otros métodos. De modo similar, la cantidad de un herbicida concreto utilizada para controlar selectivamente las hierbas adventicias en un campo puede ser menor que 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, o 1% de la cantidad que se emplearía de ese herbicida concreto en otros métodos, es decir, métodos que no utilizan una planta de la invención.
- 40 Tal como se emplea en la presente, los términos "sinergia," "sinérgico," "sinérgicamente" y sus derivados, tal como en un "efecto sinérgico" o una "combinación herbicida sinérgica" o una "composición herbicida sinérgica" se refieren a las circunstancias bajo las cuales la actividad biológica de una combinación de herbicidas, tal como al menos un primer herbicida y un segundo herbicida, es mayor que la suma de las actividades biológicas de los herbicidas individuales. La sinergia, expresada en términos de un "índice de sinergia (SI)," en general puede determinarse mediante el método descrito en Kull *et al.*, Applied Microbiology, 9, 538 (1961). Véase también, Colby "Calculating Synergistic and Antagonistic Responses of Herbicide Combinations," Weeds, 15, 20-22 (1967).
- 45 Una planta de soja DP-305423-1 de la invención puede mostrar una mayor tolerancia a una formulación concreta de un ingrediente activo herbicida en comparación con una planta control apropiada. Los herbicidas se comercializan como formulaciones que generalmente incluyen otros ingredientes además del ingrediente activo herbicida; estos ingredientes a menudo pretenden potenciar la eficacia del ingrediente activo. Estos otros ingredientes pueden incluir, por ejemplo, antidotos y adyuvantes (véase, por ejemplo, Green y Foy (2003), "Adjuvants: Tools for Enhancing Herbicide Performance," en Weed Biology and Management, ed. Inderjit (Kluwer Academic Publishers, Países
- 50
- 55

Bajos)). Así, una planta de soja DP-305423-1 de la invención puede mostrar tolerancia a una formulación concreta de un herbicida (por ejemplo, un producto de herbicida disponible en el mercado concreto) al que tenga al menos 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 12%, 15%, 17%, 20%, 22%, 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000%, 1100%, 1200%, 1300%, 1400%, 1500%, 1600%, 1700%, 1800%, 1900%, o 2000% o más de tolerancia que la tolerancia de una planta control apropiada que contenga solo un único gen de tolerancia al herbicida que confiere tolerancia a la misma formulación de herbicida.

Una combinación de herbicida puede aplicarse sobre una planta de soja DP-305423-1, en la que la combinación de herbicida produce un efecto aditivo o sinérgico para controlar hierbas adventicias. Estas combinaciones de herbicidas pueden permitir reducir la tasa de aplicación, controlar un espectro más amplio de vegetación no deseada, mejorar el control de la vegetación no deseada con un menor número de aplicaciones, una aparición más rápida de la actividad herbicida, o una actividad herbicida más prolongada.

Una "composición herbicida aditiva" tiene una actividad herbicida que es aproximadamente igual que las actividades observadas de los componentes individuales. Una "combinación herbicida sinérgica" tiene una actividad herbicida mayor que la que se esperaría basándose en las actividades observadas de los componentes individuales cuando se emplean por sí solos. Por consiguiente, en la presente se describe una combinación herbicida sinérgica, en la que el grado de control de hierbas adventicias excede la suma del control de los herbicidas individuales. El grado de control de hierbas adventicias puede exceder la suma del control de los herbicidas individuales en cualquier cantidad estadísticamente significativamente que incluye, por ejemplo, de aproximadamente 1% a 5%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 10%, de aproximadamente 10% a aproximadamente 20%, de aproximadamente 20% a aproximadamente 30%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 40%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 50%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 60%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 70%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 80%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 90% a aproximadamente 100%, de aproximadamente 100% a 120% o mayor. Además, una "cantidad sinérgicamente eficaz" de un herbicida se refiere a la cantidad de un herbicida necesaria para suscitar un efecto sinérgico en otro herbicida presente en la composición herbicida. Así, el término "sinérgico," y sus derivaciones, se refieren a una sustancia que potencia la actividad de un ingrediente activo (ai), es decir, una sustancia en una formulación a partir de la cual se obtiene un efecto biológico, por ejemplo, un herbicida.

Las plantas de la presente invención pueden cruzarse con plantas transgénicas que son tolerantes al glifosato, para producir una progenie que tiene tolerancia al glifosato y a inhibidores de ALS.

Las hierbas adventicias que pueden ser difíciles de controlar solo con el glifosato en los campos en que se cultiva una cosecha (tal como, por ejemplo, una cosecha de soja) incluyen, pero no se limitan a las siguientes: erógero del Canadá (por ejemplo, *Conyza canadensis*); vallico (por ejemplo, *Lolium rigidum*); capín (por ejemplo, *Eleusine indica*); raigrás italiano (por ejemplo, *Lolium multiflorum*); rama negra (por ejemplo, *Conyza bonariensis*); llantén menor (por ejemplo, *Plantago lanceolata*); altamisa (por ejemplo, *Ambrosia artemisiifolia*); don diego (por ejemplo, *Ipomoea spp.*); amaranto (por ejemplo, *Amaranthus spp.*); correhuela (por ejemplo, *Convolvulus arvensis*); juncia avellanada (por ejemplo, *Cyperus esculentus*); cenizo (por ejemplo, *Chenopodium album*); enredadera (por ejemplo, *Polygonum convolvulus*); yute de China (por ejemplo, *Abutilon theophrasti*); pinillo (por ejemplo, *Kochia scoparia*); y golondrina (por ejemplo, *Commelina spp.*). En áreas en las que se encuentran estas hierbas adventicias, la soja DP-305423-1 resulta particularmente útil porque permite el tratamiento de un campo (y, por tanto, de cualquier cultivo que crezca en el campo) con combinaciones de herbicidas que provocarían un daño inaceptable en las plantas del cultivo que no contengan ambos de estos polinucleótidos. Las plantas que son tolerantes al glifosato y otros herbicidas, tales como, por ejemplo, herbicidas de sulfonilurea, imidazolinona, triazolopirimidina, pirimidinil(tio)benzoato y/o sulfonilaminocarboniltriazolinona, además de ser tolerantes al menos a otro herbicida con un modo de acción diferente o un sitio de acción diferente, son particularmente útiles en situaciones en las que las hierbas adventicias son tolerantes al menos a dos de los mismos herbicidas a los que las plantas son tolerantes. De esta manera, las plantas descritas en la presente permiten mejorar el control de las hierbas adventicias que son tolerantes a más de un herbicida.

En los métodos descritos en la presente, un herbicida puede formularse y aplicarse a un área de interés, tal como, por ejemplo, un campo o un área de cultivo, de cualquier manera adecuada. Un herbicida puede aplicarse a un campo en cualquier forma, tal como, por ejemplo, en un pulverizado líquido o como gránulos o polvos sólidos. El herbicida o combinación de herbicidas que se emplean en los métodos descritos en la presente pueden comprender una mezcla en tanque o una premezcla. Un herbicida también puede formularse, por ejemplo, como una "mezcla de gránulos homogénea" producida empleando la tecnología de mezclas (véase, por ejemplo, la patente de EEUU n.º 6.022.552, titulada "Uniform Mixtures of Pesticide Granules"). La tecnología de mezclas de la patente de EEUU n.º 6.022.552 produce una mezcla no segregante (es decir, una "mezcla de gránulos homogénea") de productos químicos de protección a cultivos formulados en una forma de gránulos secos que permite la administración de mezclas a la carta diseñadas para resolver problemas específicos. Una mezcla de gránulos homogénea puede trasladarse, manipularse, dividirse y aplicarse de la misma manera que los productos premezclados tradicionales, en los que se formulan múltiples ingredientes activos en el mismo gránulo.

Brevemente, una "mezcla de gránulos homogénea" se prepara mezclando juntos al menos dos productos de

gránulos formulados extrusionados. Cada producto de gránulo puede comprender una formulación registrada que contiene un único ingrediente activo que es, por ejemplo, un herbicida, un fungicida y/o un insecticida. La uniformidad (homogeneidad) de una "mezcla de gránulos homogénea" puede optimizarse controlando los tamaños relativos y las distribuciones de tamaño de los gránulos utilizados en la mezcla. El diámetro de los gránulos extrusionados se controla mediante el tamaño de los orificios en el troquel del extrusor, y puede emplearse un proceso de tamizado centrífugo para obtener una población de gránulos extrusionados con una distribución de longitud deseada (véase, por ejemplo, la patente de EEUU n.º 6.270.025).

Una mezcla de gránulos homogénea se considera "homogénea" cuando puede dividirse en parte alícuotas con un tamaño apropiado y la composición de cada parte alícuota cumpla con los requisitos del ensayo especificados. Para demostrar la homogeneidad, se prepara una gran muestra de la mezcla de gránulos homogénea y después se divide en partes alícuotas de un tamaño mayor que el tamaño de muestra estadístico mínimo.

Las mezclas también permiten añadir otros agroquímicos en las tasas de uso normales y etiquetadas, tales como otros herbicidas (un tercer/cuarto mecanismo de acción), fungicidas, insecticidas, reguladores del crecimiento vegetal y similares, ahorrando con ello los costes asociados con aplicaciones adicionales.

Cualquier formulación de herbicida aplicada sobre la planta de soja DP-305423-1 puede prepararse como una composición "de mezcla en tanque". Cada ingrediente o combinación de ingredientes puede conservarse de modo separado. Los ingredientes después pueden mezclarse entre sí antes de la aplicación. Generalmente, este mezclado se produce un poco antes de la aplicación. En un proceso de mezcla en tanque, cada ingrediente, antes de mezclar, generalmente está presente en agua o en un disolvente orgánico adecuado. Para obtener más directrices sobre la técnica de la formulación, véase T. S. Woods, "The Formulator's Toolbox-Product Forms for Modern Agriculture" Pesticide Chemistry and Bioscience, The Food-Environment Challenge, T. Brooks y T. R. Roberts, eds., Proceedings of the 9th International Congress on Pesticide Chemistry, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1999, pp. 120-133. Véase también la patente de EEUU n.º 3.235.361, columna 6, línea 16, hasta columna 7, línea 19, y los ejemplos 10-41; la patente de EEUU n.º 3.309.192, columna 5, línea 43, hasta columna 7, línea 62, y los ejemplos 8, 12, 15, 39, 41, 52, 53, 58, 132, 138-140, 162-164, 166, 167 y 169-182; la patente de EEUU n.º 2.891.855, columna 3, línea 66, hasta columna 5, línea 17, y los ejemplos 1-4; Klingman, Weed Control as a Science, John Wiley and Sons, Inc., Nueva York, 1961, pp. 81-96; y Hance *et al.*, Weed Control Handbook, 8ª ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1989.

Los métodos descritos en la presente permiten también desarrollar combinaciones de herbicidas para ser utilizadas con las plantas de soja DP-305423-1. En estos métodos, se evalúan las condiciones ambientales en el área de cultivo. Las condiciones ambientales que pueden evaluarse incluyen, pero no se limitan a problemas de contaminación del suelo y el agua superficial, uso previsto del cultivo, tolerancia del cultivo, residuos en el suelo, hierbas adventicias presentes en el área de cultivo, textura del suelo, pH del suelo, cantidad de materia orgánica en el suelo, equipo de aplicación, y prácticas de labranza. Después de evaluar las condiciones ambientales, puede aplicarse una cantidad eficaz de una combinación de herbicidas al cultivo, parte del cultivo, semilla del cultivo o área del cultivo.

El herbicida aplicado a las plantas de soja DP-305423-1 de la invención actúa para prevenir el inicio del crecimiento de hierbas adventicias susceptibles y/o actúa para provocar daños en las hierbas adventicias que están creciendo en el área de interés. El herbicida o mezcla de herbicidas ejerce estos efectos sobre las hierbas adventicias que afectan a cultivos que después se plantan en el área de interés (es decir, el campo o área de cultivo). En los métodos descritos en la presente, no es necesario que la aplicación de la combinación de herbicidas se produzca al mismo tiempo. Con la condición de que el campo en el que se planta el cultivo contenga cantidades detectables del primer herbicida y de que el segundo herbicida se aplique en algún momento durante el periodo en el que el cultivo se encuentre en el área de cultivo, el cultivo se considera tratado con una mezcla de herbicidas. Así, los métodos descritos en la presente incluyen las aplicaciones de herbicidas que son "preemergentes," "postemergentes," "preincorporación al plantado" y/o que impliquen un "tratamiento antes de plantar" las semillas.

En la presente también se describen métodos para revestir semillas. Los métodos comprenden revestir una semilla con una cantidad eficaz de un herbicida o una combinación de herbicidas (tal como se describe en otro punto en la presente). Las semillas después pueden plantarse en un área de cultivo. También se describen semillas que tienen un revestimiento que comprende una cantidad eficaz de un herbicida o una combinación de herbicidas (tal como se describe en otro punto en la presente).

"Preemergente" se refiere a un herbicida que se aplica a un área de interés (por ejemplo, un campo o un área de cultivo) antes de que la planta emerja visiblemente del suelo. "Postemergente" se refiere a un herbicida que se aplica a un área después de que una planta emerja visiblemente del suelo. En algunos casos, los términos "preemergente" y "postemergente" se emplean con referencia a una hierba adventicia en un área de interés, y algunos casos, estos términos se emplean con referencia a una planta de cultivo en un área de interés. Cuando se emplean con referencia a una hierba adventicia, estos términos pueden aplicarse solo a un tipo concreto de hierba adventicia o especie de hierba adventicia que está presente, o que se cree que está presente en el área de interés. Aunque puede aplicarse cualquier herbicida en un tratamiento preemergente y/o postemergente, se sabe que algunos herbicidas son más eficaces para controlar una hierba o hierbas adventicias cuando se aplican en la preemergencia

o la postemergencia. Por ejemplo, la rimsulfurona tiene actividad de preemergencia y de postemergencia, mientras que otros herbicidas tienen una actividad predominante de preemergencia (metolaclor) o de postemergencia (glifosato). Estas propiedades de los herbicidas concretos son conocidas en la técnica y los expertos en la técnica pueden determinarlas con facilidad. Además, los expertos en la técnica pueden seleccionar con facilidad los herbicidas y tiempos de aplicación apropiados para su uso con las plantas transgénicas de la invención y/o en áreas en las que las plantas transgénicas de la invención se van a plantar. La "preincorporación al plantado" implica la incorporación de los compuestos al suelo antes de plantar.

El momento en que se aplica un herbicida a un área de interés (y a las plantas en él) puede ser importante para optimizar el control de las hierbas adventicias. El momento en que se aplica un herbicida puede determinarse con referencia al tamaño de las plantas y/o a la etapa de crecimiento y/o desarrollo de las plantas en el área de interés, por ejemplo, las plantas de cultivo o las hierbas adventicias que crecen en el área. Las etapas de crecimiento y/o desarrollo de las plantas son conocidas en la técnica. Por ejemplo, las plantas de soja normalmente avanzan a través de etapas de crecimiento vegetativo conocidas como V_E (emergencia), V_C (cotiledón), V_1 (unifoliado), y V_2 a V_N . La soja después cambia a una fase de crecimiento reproductivo en respuesta a indicaciones del fotoperiodo; las etapas reproductivas incluyen R_1 (inicio de la floración), R_2 (floración), R_3 (inicio de la formación de la vaina), R_4 (vaina), R_5 (inicio de la formación de la semilla), R_6 (semilla), R_7 (inicio de la maduración), y R_8 (maduración). Así, por ejemplo, el momento en que se aplica un herbicida u otro producto químico a un área de interés en la cual están creciendo plantas puede ser el momento en que algunas o todas las plantas en un área concreta han alcanzado al menos un tamaño concreto y/o una etapa de crecimiento y/o desarrollo concretos, o el momento en que algunas o todas las plantas en un área concreta no han alcanzado aún un tamaño concreto y/o una etapa de crecimiento y/o desarrollo concretos.

El término "antídoto" se refiere a una sustancia que, cuando se añade a una formulación de herbicida, elimina o reduce los efectos fitotóxicos del herbicida en ciertos cultivos. Los expertos en la técnica apreciarán que la elección del antídoto depende, en parte, de la planta de cultivo de interés y del herbicida o combinación de herbicidas concretos incluidos en la composición herbicida sinérgica. Los ejemplos de antídotos adecuados para su uso con las composiciones herbicidas descritas en la presente incluyen, pero no se limitan a las descritas en las patentes de EEUU n.ºs 4.808.208; 5.502.025; 6.124.240 y las publicaciones de solicitud de patente de EEUU n.ºs 2006/0148647; 2006/0030485; 2005/0233904; 2005/0049145; 2004/0224849; 2004/0224848; 2004/0224844; 2004/0157737; 2004/0018940; 2003/0171220; 2003/0130120; 2003/0078167. Los métodos descritos en la presente pueden implicar el uso de herbicidas en combinación con antídotos de herbicidas, tales como benoxacor, BCS (1-bromo-4-[(clorometil) sulfonil]benceno), cloquintocet-mexilo, ciometrinilo, diclormida, 2-(diclorometil)-2-metil-1,3-dioxolano (MG 191), fenclorazol-etilo, fenclorimo, flurazol, fluxofenimo, furilazol, isoxadifeno-etilo, mfenpiro-diétilo, metoxifenona ((4-metoxi-3-metilfenil)(3-metilfenil)metanona), anhídrido naftálico (anhídrido 1,8-naftálico) y oxabetrinilo, para aumentar la seguridad del cultivo. Las cantidades antídotalmente eficaces de los antídotos de herbicidas pueden aplicarse al mismo tiempo que los compuestos o aplicarse como tratamientos a las semillas.

El tratamiento de las semillas es particularmente útil para el control selectivo de hierbas adventicias, porque limita físicamente el efecto antídoto a las plantas del cultivo. Por tanto, un método particularmente útil para controlar selectivamente el crecimiento de hierbas adventicias en un campo comprende tratar la semilla a partir de la cual crece el cultivo con una cantidad antídotalmente eficaz de un antídoto y tratar el campo con una cantidad eficaz de un herbicida para controlar las hierbas adventicias. Las cantidades antídotalmente eficaces de los antídotos pueden ser determinadas con facilidad por los expertos en la técnica mediante unos sencillos experimentos. Una cantidad antídotalmente eficaz de un antídoto está presente cuando una planta deseada se trata con el antídoto de modo que el efecto de un herbicida sobre la planta disminuye, en comparación con el efecto del herbicida sobre una planta que no ha sido tratada con el antídoto; en general, una cantidad antídotalmente eficaz de un antídoto evita el daño o el daño grave a la planta tratada con el antídoto. Los expertos en la técnica son capaces de determinar si el uso de un antídoto resulta apropiado y determinar la dosis a la cual debe administrarse un antídoto a un cultivo.

La combinación de herbicidas antídotos puede comprender un primer inhibidor de ALS y un segundo inhibidor de ALS.

Estas mezclas proporcionan una mayor tolerancia del cultivo (es decir, una disminución en las lesiones del herbicida). Este método permite unas mayores tasas de aplicación de los productos químicos post- o pretratamiento. Estos métodos pueden utilizarse para aumentar el control de la vegetación no deseada. Puede lograrse un efecto de antídoto cuando los cultivos de soja DP-305423-1, partes del cultivo, semillas del cultivos, hierbas adventicias o el área de cultivo se tratan con al menos un herbicida de la familia química de la sulfonilurea en combinación con al menos un herbicida de la familia de la imidazolinona. Este método proporciona al cultivo una mayor tolerancia (es decir, una disminución en las lesiones del herbicida). La sulfonilurea puede comprender rimsulfurona, y la imidazolinona puede comprender imazetapiró.

Tal como se emplea en la presente, un "adyuvante" es cualquier material añadido a una formulación o disolución en pulverizado para modificar la acción de un producto químico agrícola o las propiedades físicas de la disolución en pulverizado. Véase, por ejemplo, Green y Foy (2003), "Adjuvants: Tools for Enhancing Herbicide Performance," en *Weed Biology and Management*, ed. Inderjit (Kluwer Academic Publishers, Países Bajos). Los adyuvantes pueden clasificarse o subclasificarse en activadores, acidificantes, tampones, aditivos, adherentes, antifloculantes,

antiespumantes, desespumantes, anticongelantes, atractores, mezclas básicas, agentes quelantes, limpiadores, colorantes o tintes, agentes de compatibilidad, codisolventes, acoplantes, concentrados de aceite de cultivo, agentes de depósito, detergentes, dispersantes, agentes de control de la deriva, emulgentes, reductores de la evaporación, extensores, fertilizantes, marcadores de espuma, formulantes, productos inertes, humectantes, aceites de semillas metilados, COC de carga alta, polímeros, aceites vegetales modificados, penetrantes, repelentes, concentrados de aceite de petróleo, conservantes, agentes resistentes a la lluvia, adyuvantes de la retención, solubilizantes, tensioactivos, extensores, agentes de pegajosidad, agentes de pegajosidad extensores, espesantes, adyuvantes de la translocación, protectores de UV, aceites vegetales, acondicionadores de agua, y agentes humectantes.

Además, los métodos descritos en la presente pueden comprender el uso de un herbicida o una mezcla de herbicidas, así como uno o más insecticidas, fungicidas, nematocidas, bactericidas, acaricidas, reguladores del crecimiento, quimioesterilizantes, semioquímicos, repelentes, atractores, feromonas, estimulantes de la alimentación u otros compuestos biológicamente activos o bacterias, virus u hongos entomopatógenos, para formar una mezcla de múltiples componentes que ofrece un espectro aún más amplio de protección agrícola. Los ejemplos de dichos protectores agrícolas que pueden usarse en los métodos descritos en la presente incluyen: insecticidas, tales como abamectih, acefato, acetamiprida, amidoflumeto (S-1955), avermectina, azadiractina, azinfós-metilo, bifentrina, bifenazato, buprofezina, carbofurano, cartapo, clorfenapiro, clorfluazurona, clorpirifós, clorpirifós-metilo, cromafenozida, clotianidina, ciflumetofeno, ciflutrina, beta-ciflutrina, cihalotrina, lambda-cihalotrina, cipermetrina, ciromazina, deltametrina, diafentiurona, diazinona, dieldrina, diflubenzurona, dimeflutrina, dimetoato, dinotefurano, diofenolano, emamectina, endosulfano, esfenvalerato, etiprol, fenotiocarb, fenoxicarb, fenpropatrina, fenvalerato, fipronilo, flonicamida, flubendiamida, flucitrinato, tau-fluvalinato, flufenerimo (UR-50701), flufenoxurona, fonofós, halofenozida, hexaflumurona, hidrametilnona, imidacloprid, indoxacarb, isofenfós, lufenurona, malationa, metaflumizona, metaldehído, metamidofós, metidationa, metomilo, metopreno, metoxiclor, metoflutrina, monocrotofós, metoxifenzida, nitenpiramo, nitiazina, novalurona, noviflumurona (XDE-007), oxamilo, parationa, parationa-metilo, permetrina, forato, fosalona, fosmeto, fosfamidona, pirimicarb, profenofós, proflutrina, pimetozina, pirafuprol, piretrina, piridalilo, piriprol, piriproxifeno, rotenona, rianodina, espinosad, espiroclorfenol, espiromesifeno (BSN 2060), espirotetramato, sulprofós, tebufenozida, teflubenzurona, teflutrina, terbufós, tetraclorvinfós, tiacloprida, tiametoxamo, tiodicarb, tiosultapo-sodio, tralometrina, triazamato, triclorfona y triflumurona; fungicidas, tales como acibenzolar, aldimorf, amisulbroma, azaconazol, azoxiestrobina, benalaxilo, benomilo, bentiavalicarb, bentiavalicarb-isopropilo, binomialo, bifenilo, bitertanol, blasticidina-S, caldo bordelés (sulfato de cobre tribásico), boscalida/nicobifeno, bromuconazol, bupirinato, butiobato, carboxina, carpropamida, captafol, captano, carbendazima, cloroneb, clorotalonilo, clozolinato, clotrimazol, oxiclóruro de cobre, sales de cobre, tales como sulfato de cobre e hidróxido de cobre, ciazofamida, ciflunamida, cimoxanilo, ciproconazol, ciprodinilo, diclofluanida, diclocimeto, diclomezina, diclorano, dietofencarb, difenoconazol, dimetomorf, dimoxiestrobina, diniconazol, diniconazol-M, dinocap, diescostrobina, ditianona, dodemorf, dodina, econazol, etaconazol, edifenfós, epoxiconazol, etaboxamo, etirimol, etridiazol, famoxadona, fenamidona, fenarimol, fenbuconazol, fencaramida, fenfuramo, fenhexamida, fenoxanilo, fenpiclonilo, fenpropidina, fenpropimorf, acetato de fentina, hidróxido de fentina, ferbamo, ferfurazoato, ferimzona, fluazinamo, fludioxonilo, flumetover, fluopicolida, fluoxastrobina, fluquinconazol, fluquinconazol, flusilazol, flusulfamida, flutolanilo, flutriafol, folpet, fosetilo-aluminio, fuberidazol, furalaxilo, furametapiro, hexaconazol, himexazol, guazatina, imazalilo, imibenconazol, iminocadina, iodiacarb, ipconazol, iprobenfós, iprodiona, iprovalicarb, isoconazol, isoprotilano, kasugamicina, kresoxima-metilo, mancozeb, manopropamida, maneb, mapanipirina, mefenoxamo, mepronilo, metalaxilo, metconazol, metasulfocarb, metiram, metominioestrobina/fenominioestrobina, mepanipirimo, metrafenona, miconazol, miclobutanilo, neo-asozina (metanarsonato férrico), nuarimol, octilnona, ofurace, orisaestrobina, oxadixilo, ácido oxolínico, oxpoconazol, oxicarboxina, paclobutrazol, penconazol, pencicurona, pentiopirad, perfurazoato, ácido fosfínico, ftalida, picobenzamida, picoxiestrobina, polioxina, probenazol, procloraz, procimidona, propamocarb, propamocarb-clorhidrato, propiconazol, propineb, proquinazid, protioconazol, piraclostrobin, priazofós, pirifenox, pirimetanilo, pirifenox, pirolnitrina, piroquilona, quinconazol, quinoxifeno, quintozeno, siltiofamo, simeconazol, espiroxamina, estreptomycin, azufre, tebuconazol, tecrazeno, teclotalamo, tecnazeno, tetraconazol, tiabendazol, tiffuzamida, tiofanato, tiofanato-metilo, tiramo, tiadinilo, tolclofós-metilo, tolifluanida, triadimefona, triadimenol, triarimol, triazóxido, tridemorf, trimopramida, triciclazol, trifloxiestrobina, triforina, triticonazol, uniconazol, validamicina, vinclozolina, zineb, ziram, y zoxamida; nematocidas, tales como aldicarb, oxamilo y fenamifós; bactericidas, tales como estreptomycin; acaricidas, tales como amitraz, quinometionato, clorobenzilato, cihexatina, dicofol, dienoclor, etoxazol, fenazaquina, óxido de fenbutatina, fenpropatrina, fenpiroximato, hexitiazox, propargita, piridabeno y tebufenpirad; y agentes biológicos que incluyen bacterias entomopatógenas, tales como *Bacillus thuringiensis* subsp. *Aizawai*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki*, y las delta-endotoxinas encapsuladas de *Bacillus thuringiensis* (por ejemplo, Cellcap, MPV, MPVII); hongos entomopatógenos, tales como el hongo de muscardina verde; y virus entomopatógenos, que incluyen baculovirus, nucleopolihedrovirus (NPV), tales como HzNPV, AfNPV; y virus de granulosis (GV), tal como CpGV. Las proporciones en peso de estos diversos compañeros de mezcla con otras composiciones (por ejemplo, herbicidas) empleadas en los métodos descrito en la presente generalmente están entre 100:1 y 1:100, o entre 30:1 y 1:30, entre 10:1 y 1:10, o entre 4:1 y 1:4.

En la presente se describe una composición que comprende una cantidad biológicamente eficaz de un herbicida de interés, o una mezcla de herbicidas, y una cantidad eficaz de al menos otro agente o compuesto biológicamente activo, y puede comprender también al menos uno de un tensioactivo, un diluyente sólido o un diluyente líquido. Los ejemplos de dichos agentes o compuestos biológicamente activos son: insecticidas, tales como abamectina, acefato,

acetamiprida, amidoflumeto (S-1955), avermectina, azadiractina, azinfós-metilo, bifentrina, binfenazato, buprofezina, carbofurano, clorfenapiro, clorfluazurona, clorpirifós, clorpirifós-metilo, cromafenozida, clotianidina, ciflutrina, beta-ciflutrina, cihalotrina, lambda-cihalotrina, cipermetrina, ciromazina, deltametrina, diafentiurona, diazinona, diflubenzurona, dimetoato, diofenolano, emamectina, endosulfano, esfenvalerato, etiprol, fenotiocarb, fenoxicarb, fenpropatrina, fenvalerato, fipronilo, flonicamida, flucitrinato, tau-fluvalinato, flufenerimo (UR-50701), flufenoxurona, fonofós, halofenozida, hexaflumurona, imidacloprida, indoxacarb, isofenfós, lufenurona, malationa, metaldehído, metamidofós, metidationa, metomilo, metopreno, metoxiclor, monocrotofós, metoxifenozida, nitiazina, novalurona, noviflumurona (XDE-007), oxamilo, parationa, parationa-metilo, permetrina, forato, fosalona, fosmet, fosfamidona, pirimicarb, profenofós, pimetozina, piridialilo, piriproxifeno, rotenona, espinosad, espiromesifina (BSN 2060), sulprofós, tebufenozida, teflubenzurona, teflutrina, terbufós, tetraclorvinfós, tiacloprida, tiametoxamo, tiodicarb, tiosultap-sodio, tralometrina, triclorfona y triflumurona; fungicidas, tales como acibenzolar, azoxiestrobina, benomilo, blastidina-S, caldo bordelés (sulfato de cobre tribásico), bromuconazol, carpropamida, captafol, captano, carbendazima, cloroneb, clorotalonilo, oxiclورو de cobre, sales de cobre, ciflufenamida, cimoxanilo, ciproconazol, ciprodinilo, (S)-3,5-dicloro-N-(3-cloro-1-etil-1-metil-2-oxopropil)-4-metilbenzamida (RH 7281), diclocimeto (S-2900), diclomezina, diclorano, difenoconazol, (S)-3,5-dihidro-5-metil-2-(metiltio)-5-fenil-3-(fenilamino)-4H-imidazol-4-ona (RP 407213), dimetomorf, dimoxiestrobina, diniconazol, diniconazol-M, dodina, edifenfós, epoxiconazol, famoxadona, fenamidona, fenarimol, fenbuconazol, fencaramida (SZX0722), fencpiclonilo, fenpropidina, fenpropimorf, acetato de fentina, hidróxido de fentina, fluazinamo, fludioxonilo, flumetover (RPA 403397), flumorf/flumorlina (SYP-L190), fluoxastrobina (HEC 5725), fluquinconazol, flusilazol, flutolanilo, flutriafol, folpet, fosetilo-aluminio, furalaxilo, furametapiro (S-82658), hexaconazol, ipconazol, iprobenfós, iprodiona, isoprotiolano, kasugamicina, kresoxima-metilo, mancozeb, maneb, mefenoxamo, mepronilo, metalaxilo, metconazol, metominoestrobil/fenominoestrobina (SSF-126), metrafenona (AC375839), miclobutanilo, neo-asozina (metanarsonato férrico), nicobifeno (BAS 510), orisaestrobina, oxadixilo, penconazol, pencicurona, probenazol, procloraz, propamocarb, propiconazol, proquinazid (DPX-KQ926), protioconazol (JAU6476), pirifenox, piraclostrobina, pirimetanilo, piroquilona, quinoxifeno, espiroxamina, azufre, tebuconazol, tetraconazol, tiabendazol, tifulzamida, tiofanato-metilo, tiramo, tiadinilo, triadimefona, triadimenol, triciclazol, trifloxiestrobina, triticonazol, validamicina y vinclozolina; nematocidas, tales como aldicarb, oxamilo y fenamifós; bactericidas, tales como estreptomycin; acaricidas, tales como amitraz, quinometionato, clorobenzilato, cihexatina, dicofol, dienoclor, etoxazol, fenazaquina, óxido de fenbutatina, fenpropratrina, fenpiroximato, hexitiazox, propargita, piridabeno y tebufenpirad; y agentes biológicos, que incluyen bacterias entomopatógenas, tales como *Bacillus thuringiensis* subsp. *Aizawai*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki*, y las delta-endotoxinas encapsuladas de *Bacillus thuringiensis* (por ejemplo, Cellcap, MPV, MPVII); hongos entomopatógenos, tales como el hongo de muscardina verde; y virus entomopatógenos, que incluyen baculovirus, nucleopolihedrovirus (NPV), tales como HzNPV, AfNPV; y virus de granulosis (GV), tal como CpGV. Los métodos descritos en la presente también comprenden el uso de plantas genéticamente transformadas para que expresen proteínas tóxicas para plagas de invertebrados (tales como delta-endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*). El efecto de los compuestos de control de plagas de invertebrados aplicados de modo exógeno puede ser sinérgico con las proteínas de toxinas expresadas.

Las referencias generales de estos protectores agrícolas incluyen The Pesticide Manual, 13ª edición, C. D. S. Tomlin, ed., British Crop Protection Council, Farnham, Surrey, Reino Unido, 2003, y The BioPesticide Manual, 2ª edición, L. G. Copping, ed., British Crop Protection Council, Farnham, Surrey, Reino Unido, 2001.

En ciertos casos, las combinaciones con otros compuestos de control de plagas de invertebrados o agentes que tengan un espectro de control similar, pero un modo de acción diferente, serán particularmente ventajosas para la gestión de la resistencia. Así, las composiciones descritas en la presente pueden comprender además una cantidad biológicamente eficaz de al menos un agente o compuesto de control de plagas de invertebrados adicional que tenga un espectro de control similar, pero un modo de acción diferente. Poner en contacto una planta genéticamente modificada para que exprese un compuesto de protección de plantas (por ejemplo, una proteína), o el locus de la planta, con una cantidad biológicamente eficaz de un compuesto descrito en la presente también puede proporcionar un espectro más amplio de protección a las plantas y ser ventajoso para la gestión de la resistencia.

Así, los métodos descritos en la presente emplean un herbicida o una combinación de herbicidas y pueden comprender además el uso de insecticidas y/o fungicidas y/u otros productos químicos agrícolas, tales como fertilizantes. El uso de dichos tratamientos combinados puede ampliar el espectro de actividad contra más especies de hierbas adventicias y suprimir la proliferación de cualquier biotipo resistente.

Los métodos descritos en la presente pueden comprender también el uso de reguladores del crecimiento vegetal, tales como aviglicina, N-(fenilmetil)-1H-purin-6-amina, etefona, epocoleona, ácido giberélico, giberelina A4 y A7, proteína de horquilla, cloruro de mepiquat, prohexadiona calcio, prohidrojasmona, nitrofenolato de sodio y trinexapaco-metilo, y organismos modificadores del crecimiento vegetal, tales como *Bacillus cereus* cepa BP01.

Las realizaciones de la invención se definen más a fondo en los siguientes ejemplos. Debe entenderse que estos ejemplos se ofrecen solo como ilustración.

Ejemplo 1:

60 Material genético utilizado para producir el acontecimiento DP-305423-1

El acontecimiento DP-305423-1 de soja (*Glycine max*) se produjo mediante cobombardo de partículas con fragmentos PHP19340A (figura 1; SEQ ID NO:1) y PHP17752A (figura 2; SEQ ID NO:2). Un resumen de los elementos y su posición sobre el fragmento PHP19340A se presenta en la tabla 3, y para el fragmento PHP17752A en la tabla 4. Estos fragmentos se obtuvieron mediante la digestión con *Asc I* de un plásmido fuente. El fragmento PHP19340A se obtuvo del plásmido PHP19340 (figura 3; SEQ ID NO:3) y el fragmento PHP17752A se obtuvo del plásmido PHP17752 (figura 4; SEQ ID NO:4). Un resumen de los elementos y su posición sobre cada uno de los plásmidos, PHP19340 y PHP17752, se describe en las tablas 5 y 6, respectivamente.

El fragmento PHP19340A contiene un módulo con un fragmento de 597 pb del gen 1 de omega-6 desaturasa microsómica de soja (*gm-fad2-1*) (Heppard *et al.*, 1996). La presencia del fragmento de *gm-fad2-1* en el módulo de expresión actúa para suprimir la expresión de omega-6 desaturasas endógenas, lo cual produce un aumento en el nivel de ácido oleico y una disminución en los niveles de ácido palmítico, linoleico, y linolénico. Cadena arriba del fragmento de *gm-fad2-1* se encuentra la región de promotor del gen 3 del inhibidor de tripsina de Kunitz (KTI3) (Jofuku y Goldberg, 1989; Jofuku *et al.*, 1989), que regula la expresión de la transcripción. El promotor KTI3 es muy activo en embriones de soja y es 1000 veces menos activos en tejido foliar (Jofuku y Goldberg, 1989). La región no traducida 3' del gen KTI3 (terminador KTI3) (Jofuku y Goldberg, 1989) termina la expresión de este módulo.

El fragmento PHP17752A contiene un módulo con una versión modificada del gen de la acetolactato sintasa de soja (*gm-hra*) que codifica la proteína GM-HRA con dos restos aminoácidos modificados con respecto a la enzima endógena y cinco aminoácidos adicionales en la región N-terminal de la proteína derivados de la traducción de la región no traducida 5' del gen de la acetolactato sintasa de soja (Falco y Li, 2003). El gen *gm-hra* codifica una forma de acetolactato sintasa, que es tolerante a los herbicidas de la clase de la sulfonilurea. La proteína GM-HRA está formada por 656 aminoácidos y tiene un peso molecular de aproximadamente 71 kDa.

La expresión del gen *gm-hra* está controlada por la región de promotor 5' del gen de S-adenosil-L-metionina sintetasa (SAMS) de la soja (Falco y Li, 2003). Esta región 5' consiste en un promotor constitutivo y un intrón que interrumpe la región no traducida SAMS 5' (Falco y Li, 2003). El terminador para el gen *gm-hra* es el terminador de acetolactato sintasa de soja endógeno (terminador *gm-als*) (Falco y Li, 2003).

Tabla 3

Descripción de los elementos genéticos en el fragmento PHP19340A			
Localización sobre el fragmento de ADN (posición de pares de bases)	Elemento genético	Tamaño (pares de bases)	Descripción
1 a 18	región de policonector	15	Región requerida para la clonación de elementos genéticos
19 a 2102	promotor KTI3	2084	Región de promotor del gen 3 del inhibidor de tripsina de Kunitz de soja (Jofuku y Goldberg, 1989; Jofuku <i>et al.</i> , 1989).
2103 a 2113	región de policonector	11	Región requerida para la clonación de elementos genéticos
2114 a 2710	fragmento de <i>gm-fad2-1</i>	597	Fragmento del gen de omega-6 desaturasa microsómica (Heppard <i>et al.</i> , 1996)
2711 a 2720	región de policonector	10	Región requerida para la clonación de elementos genéticos
2721 a 2916	terminador KTI3	196	Región del terminador del gen 3 del inhibidor de tripsina de Kunitz de soja (Jofuku y Goldberg, 1989; Jofuku <i>et al.</i> , 1989)
2917 a 2924	región de policonector	8	Región requerida para la clonación de elementos genéticos

Tabla 4

Descripción de los elementos genéticos en el fragmento PHP17752A			
Localización sobre el fragmento de ADN (posición de pares de bases)	Elemento genético	Tamaño (pares de bases)	Descripción
1 a 25	región de policonector	25	Región requerida para la clonación de elementos genéticos
26 a 76	FRT1	51	Sitio de recombinación de F1p recombinasa (GenBank ID: AY737006.1)
77 a 222	región de policonector	145	Región requerida para la clonación de elementos genéticos
223 a 867	promotor de SAMS	645	Porción de promotor de la región reguladora del gen SAMS (Falco y Li, 2003)
868 a 926	UTR-5' de SAMS	59	Región no traducida 5' del en SAMS (Falco y Li, 2003)
927 a 1517	intrón de SAMS	591	Intrón dentro de la 5'-UTR del gen SAMS (Falco y Li, 2003).
1518 a 1533	UTR-5' de SAMS	16	Región no traducida 5' del en SAMS (Falco y Li, 2003)
1534 a 3504	gen <i>gm-hra</i>	1971	Versión modificada del gen de la acetolactato sintasa de soja con 15 nucleótidos adicionales en el extremo 5' (1534 a 1548) derivados del 5' UTR de als y dos cambios de nucleótidos dentro de la secuencia codificadora (Falco y Li, 2003).
3505 a 4156	terminador als	652	Terminador nativo del gen de la acetolactato sintasa de soja (Falco y Li, 2003).
4157 a 4231	región de policonector	75	Región requerida para la clonación de elementos genéticos
4232 a 4282	FRT1	51	Sitio de recombinación de F1p recombinasa (GenBank ID: AY737006.1)
4283 a 4396	región de policonector	114	Región requerida para la clonación de elementos genéticos
4397 a 4447	FRT6	51	Sitio de recombinación de la F1p recombinasa (94% de homología con GenBank ID: AY737006.1)
4448 a 4512	región de policonector	65	Región requerida para la clonación de elementos genéticos

Tabla 5

Descripción de los elementos genéticos del plásmido PHP19340				
Región	Localización sobre el plásmido (posición de pares de bases)	Elemento genético conocido	Tamaño (pares de bases)	Descripción
Fragmento PHP19340A	2725 a 5438 1 a 210		2924	Véase la tabla 3 para los elementos y la descripción del fragmento (hebra complementaria)
Construcción de plásmido	211 a 2724	incluye los siguiente elementos	2514	Vector de ADN de diversas fuentes para la construcción y replicación del plásmido
	228 a 351	Terminador T7	124	Terminador derivado del genoma del fago de la enterobacteria T7 (GenBank V01146; Dunn y Studier, 1983) (hebra complementaria)
	376 a 1326	<i>Hyg</i>	951	Gen de resistencia a la higromicina de <i>Trypanosoma brucei</i> (GenBank AL671259; Gritz y Davies, 1983) (hebra complementaria)
	1404 a 1487	Promotor T7	84	Promotor derivado del genoma del fago de la enterobacteria T7 (GenBank V01146; Dunn y Studier, 1983) (hebra complementaria)
	1561 a 1930	Ori	370	Fragmento <i>Hae</i> II que contiene el origen de la replicación bacteriano (derivado de colE1) (Tomizawa <i>et al.</i> , 1977)

Tabla 6

Descripción de los elementos genéticos del plásmido PHP17752				
Región	Localización sobre el plásmido (posición de pares de bases)	Elemento genético conocido	Tamaño (pares de bases)	Descripción
Fragmento PHP17752A	2528 a 7026 1 a 13		4512	Véase la tabla 4 para los elementos y la descripción del fragmento (hebra complementaria)
Construcción de plásmido	14 a 2527	incluye los siguiente elementos	2514	Vector de ADN de diversas fuentes para la construcción y replicación del plásmido
	31 a 154	Terminador T7	124	Terminador derivado del genoma del fago de la enterobacteria T7 (GenBank V01146; Dunn y Studier, 1983) (hebra complementaria)

Descripción de los elementos genéticos del plásmido PHP17752				
Región	Localización sobre el plásmido (posición de pares de bases)	Elemento genético conocido	Tamaño (pares de bases)	Descripción
	179 a 1129	<i>Hyg</i>	951	Gen de resistencia a la higromicina de <i>Trypanosoma brucei</i> (GenBank AL671259; Gritz y Davies, 1983) (<i>hebra complementaria</i>)
	1207 a 1290	Promotor T7	84	Promotor derivado del genoma del fago de la enterobacteria T7 (GenBank V01146; Dunn y Studier, 1983) (<i>hebra complementaria</i>)
	1364 a 1733	Ori	370	Fragmento <i>Hae</i> II que contiene el origen de la replicación bacteriano (derivado de colE1) (Tomizawa <i>et al.</i> , 1977)

Referencias bibliográficas

Dunn, J. J. y Studier, F. W., 1983, Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 DNA and the locations of T7 genetic elements, *J. Mol. Biol.*, 166(4): 477-535.

5 Falco, C.S. y Li, Z., 2003, S-adenosyl-L-methionine Synthetase Promoter and Its Use in Expression of Transgenic Genes in Plants, solicitud de patente de EEUU: 2003/0226166.

Gritz, L. y Davies, J., 1983, Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *E. coli* and *Saccharomyces cerevisiae*, *Gene*, 25:179-188.

Heppard, E.P., Kinney, A.J., Stecca, K.L., y Miao, G.-H., 1996, Developmental and Growth Temperature Regulation of Two Different Microsomal omega-6 Desaturase Genes in Soybeans, *Plant Physiol.*, 110:311-319.

10 Jofuku, K.D. y Goldberg, R.B., 1989, Kunitz Trypsin Inhibitor Genes Are Differentially Expressed during the Soybean Life Cycle and in Transformed Tobacco Plants, *Plant Cell*, 1:1079-1093.

Jofuku, K.D. y Schipper, R.D., y Goldberg, R.B., 1989, A Frameshift Mutation Prevents Kunitz Trypsin Inhibitor mRNA Accumulation in Soybean Embryos, *Plant Cell*, 1:427-435.

15 Tomizawa, J-I., Ohmori, H., y Bird, R. E., 1977, Origin of replication of colicin E1 plasmid DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74(5):1865-1869.

Ejemplo 2:

Método de transformación y selección del acontecimiento DP-305423-1 de soja

20 Para la transformación de tejido de soja, una porción lineal de ADN, que contiene la secuencia de gen *gm-fad2-1* y los componentes reguladores necesarios para la expresión, se corta del plásmido PHP19340 empleando la enzima de restricción *Asc* I y se purifica utilizando una electroforesis en gel de agarosa. Una porción lineal de ADN, que contiene las secuencias del gen *gm-hra* y los componentes reguladores necesarios para la expresión, se corta del plásmido PHP17752 empleando la enzima de restricción *Asc* I y se purifica utilizando una electroforesis en gel de agarosa. La porción lineal de ADN que contiene el gen *gm-fad2-1* se denomina inserción PHP19340A y tiene un tamaño de 2924 pb. La porción lineal de ADN que contiene el gen *gm-hra* se denomina inserción PHP17752A y tiene un tamaño de 4511 pb. El único ADN introducido en el acontecimiento de transformación DP-305423-1 es el ADN de las inserciones descritas anteriormente.

30 Las plantas transgénicas del acontecimiento DP-305423-1 se obtuvieron mediante bombardeo de microproyectiles empleando la pistola de partículas Biolistics™ PDS-1000He fabricada por Bio-Rad, fundamentalmente como se describe en Klein *et al.* ("High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells", *Nature*, 327:70-73 (1987)). Las dianas para la transformación fueron agrupaciones de embriones somáticos secundarios derivados de explantes de semillas de soja inmaduras pequeñas. Los embriones somáticos secundarios se cortaron de los explantes inmaduros después de varias semanas en medio de inicio del cultivo de soja. Las agrupaciones embriogénicas, que se habían cortado de los explantes, se trasladaron a un medio de mantenimiento de cultivo de soja líquido y se subcultivaron a intervalos regulares hasta que estuvieron preparadas para el bombardeo.

Los cultivos embriogénicos somáticos de soja se emplearon en los experimentos de transformación de 2-4 meses después del inicio. En el día de la transformación, partículas de oro microscópicas se revistieron con una mezcla del ADN de los dos fragmentos purificados, PHP19340A y PHP17752A, y se aceleraron en los cultivos de soja embriogénicos, tras lo cual los ADN insertados se incorporaron en algunos cromosomas de las células. Solo se emplearon PHP19340A y PHP17752A, y no se incorporó otro ADN (por ejemplo, ADN vehículo) en el proceso de transformación. Después del bombardeo, el tejido de soja bombardeado se trasladó a matraces de medio de mantenimiento de cultivo líquido fresco para la recuperación. Después de unos pocos días, el medio de cultivo líquido en cada matraz de cultivo de soja embriogénico bombardeado se cambió a un medio de mantenimiento del cultivo suplementado con clorsulfurona como agente de selección. Los matraces individuales de tejido en medio selectivo líquido se mantuvieron físicamente separados durante el cultivo, y la mayoría de las agrupaciones embriogénicas somáticas dentro de cada matraz murieron en el medio selectivo líquido.

Después de varias semanas en el medio de mantenimiento del cultivo suplementado con clorsulfurona, resultaron visibles pequeñas islas de tejido verde sano resistente a la clorsulfurona, que crecían a partir de trozos de tejido embriogénico somático moribundo. Las agrupaciones embriogénicas resistentes se cortaron de los trozos asociados de tejido muerto o moribundo, y se les asignaron códigos de identificación exclusivos que representan acontecimientos de transformación putativos. Los acontecimientos putativos individuales se sometieron a cambios regulares a un medio de selección líquido fresco hasta el inicio del proceso de regeneración. Se tomaron muestras de tejido embriogénico para el análisis molecular para confirmar la presencia de los transgenes *gm-fad2-1* y *gm-hra* mediante un análisis Southern. Se regeneraron plantas a partir del tejido derivado de cada acontecimiento exclusivo y se trasladaron al invernadero para la producción de semillas.

Ejemplo 3:

Análisis Southern de las plantas que contienen el acontecimiento DP-305423-1

Materiales y métodos: El ADN genómico se extrajo de tejido foliar de soja congelado de plantas individuales de las generaciones T4 y T5 de DP-305423-1 y del control (variedad: Jack) empleando un método de tampón de extracción de urea convencional. El ADN genómico se cuantificó en un espectrofluorómetro empleando el reactivo Pico Green® (Molecular Probes, Invitrogen). Aproximadamente 4 µg de ADN por muestra se digirió con *Hind* III o *Nco* I. Para las muestras de control positivo, se añadieron aproximadamente 3 pg (2 equivalentes de copia del genoma) del plásmido PHP19340 o PHP17752 al ADN genómico de soja control antes de la digestión. Las muestras de control negativo consistieron en ADN genómico de soja no modificado (variedad: Jack). Los fragmentos de ADN se separaron según el tamaño empleando una electroforesis en gel de agarosa.

Después de la electroforesis en gel de agarosa, los fragmentos de ADN separados se despurinaron, se desnaturalizaron, se neutralizaron *in situ*, y se trasladaron a una membrana de nailon en 20x tampón SSC empleando el método descrito para el sistema TURBOBLOTTER™ Rapid Downward Transfer System (Schleicher & Schuell). Después de la transferencia a la membrana, el ADN se unió a la membrana mediante reticulación por UV.

Las sondas de ADN para *gm-fad2-1* y *gm-hra* se marcaron con digoxigenina (DIG) mediante PCR empleando el kit de síntesis de sondas PCR DIG (Roche).

Las sondas marcadas se hibridaron con el ADN diana sobre las membranas de nailon para la detección de los fragmentos específicos empleando la disolución DIG Easy Hyb (Roche) fundamentalmente como describe el fabricante. Los lavados de posthibridación se realizaron a alta rigurosidad. Las sondas marcadas con DIG que se hibridaron a los fragmentos unidos se detectaron empleando el sistema de detección de ácidos nucleicos quimioluminiscentes CDP-Star (Roche). Las transferencias se expusieron a una película de rayos X a temperatura ambiente durante uno o más momentos del tiempo para detectar los fragmentos de hibridación.

Resumen del análisis Southern de DP-305423-1: Los mapas esquemáticos de los plásmidos PHP19340 (SEQ ID NO:3) y PHP17752 (SEQ ID NO:4) empleados como controles positivos en estas transferencias se presentan en las figuras 3 y 4, respectivamente. Estos plásmidos son la fuente de los fragmentos PHP19340A (figura 1; SEQ ID NO:1) y PHP17752A (figura 2; SEQ ID NO:2). Los fragmentos se aislaron mediante una digestión con *Asc* I del correspondiente plásmido fuente. El DP-305423-1 se obtuvo mediante transformación con cobombardeo de partículas empleando los fragmentos PHP19340A y PHP17752A.

El ADN genómico aislado a partir de tejido foliar de soja de plantas individuales de DP-305423-1 (generación T5 y T4) y del control no modificado (Jack) se digirió con *Hind* III y se sondó con la sonda del gen *gm-fad2-1* (figura 5; tabla 7). Se digirieron y se cargaron en cada carril aproximadamente 2 µg de ADN genómico. Los controles de número de copias de los genes incluyeron al plásmido PHP19340 y PHP17752 con el número de copias de genes aproximado indicado y 2 µg de ADN control no modificado. Los tamaños de los marcadores de peso molecular DIG VII se indican adyacentes a la imagen de la transferencia en kilopares de bases (kb). En la tabla 7 se presenta una descripción de cada carril.

Tabla 7

Análisis de la transferencia Southern del acontecimiento DP-305423-1; digestión con Hind III, sonda gm-fad2-1				
Carril	Muestra		Carril	Muestra
1	2 copias PHP19340 + control		11	DP-305423-1/T38 (generación T4)
2	DIGVII		12	DP-305423-1/T39 (generación T4)
3	control		13	DP-305423-1/T40 (generación T4)
4	DP-305423-1/T8 (generación T5)		14	DP-305423-1/T41 (generación T4)
5	DP-305423-1/T9 (generación T5)		15	DP-305423-1/T42 (generación T4)
6	DP-305423-1/T10 (generación T5)		16	DP-305423-1/T43 (generación T4)
7	DP-305423-1/T11 (generación T5)		17	DP-305423-1/T44 (generación T4)
8	DP-305423-1/T12 (generación T5)		18	Control
9	DP-305423-1/T13 (generación T5)		19	DIGVII
10	DP-305423-1/T14 (generación T5)		20	2 copias PHP17752 + control

5 El ADN genómico aislado a partir de tejido foliar de soja de plantas individuales de DP-305423-1 (generación T5 y T4) y del control no modificado (Jack) se digirió con *Nco* I y se sondó con la sonda del gen *gm-fad2-1* (figura 6; tabla 8). Se digirieron y se cargaron en cada carril aproximadamente 2 µg de ADN genómico. Los controles de número de copias de los genes incluyeron al plásmido PHP19340 y PHP17752 con el número de copias de genes aproximado indicado y 2 µg de ADN control no modificado. Los tamaños de los marcadores de peso molecular DIG VII se indican adyacentes a la imagen de la transferencia en kilopares de bases (kb). En la tabla 8 se presenta una descripción de cada carril.

Tabla 8

Análisis de la transferencia Southern del acontecimiento DP-305423-1; digestión con Nco I, sonda gm-fad2-1				
Carril	Muestra		Carril	Muestra
1	2 copias PHP19340 + control		11	DP-305423-1/T38 (generación T4)
2	DIGVII		12	DP-305423-1/T39 (generación T4)
3	control		13	DP-305423-1/T40 (generación T4)
4	DP-305423-1/T8 (generación T5)		14	DP-305423-1/T41 (generación T4)
5	DP-305423-1/T9 (generación T5)		15	DP-305423-1/T42 (generación T4)
6	DP-305423-1/T10 (generación T5)		16	DP-305423-1/T43 (generación T4)
7	DP-305423-1/T11 (generación T5)		17	DP-305423-1/T44 (generación T4)
8	DP-305423-1/T12 (generación T5)		18	Control
9	DP-305423-1/T13 (generación T5)		19	DIGVII
10	DP-305423-1/T14 (generación T5)		20	2 copias PHP17752 + control

10 El ADN genómico aislado a partir de tejido foliar de soja de plantas individuales de DP-305423-1 (generación T5 y T4) y del control no modificado (Jack) se digirió con *Hind* III y se sondó con la sonda del gen *gm-hra* (figura 7; tabla 9). Se digirieron y se cargaron en cada carril aproximadamente 2 µg de ADN genómico. Los controles de número de copias de los genes incluyeron al plásmido PHP19340 y PHP17752 con el número de copias de genes aproximado indicado y 2 µg de ADN control no modificado. Los tamaños de los marcadores de peso molecular DIG VII se indican adyacentes a la imagen de la transferencia en kilopares de bases (kb). En la tabla 9 se presenta una descripción de cada carril.

15

Tabla 9

Análisis de la transferencia Southern del acontecimiento DP-305423-1; digestión con Hind III, sonda gm-hra				
Carril	Muestra		Carril	Muestra
1	2 copias PHP19340 + control		11	DP-305423-1/T38 (generación T4)
2	DIGVII		12	DP-305423-1/T39 (generación T4)
3	control		13	DP-305423-1/T40 (generación T4)
4	DP-305423-1/T8 (generación T5)		14	DP-305423-1/T41 (generación T4)
5	DP-305423-1/T9 (generación T5)		15	DP-305423-1/T42 (generación T4)
6	DP-305423-1/T10 (generación T5)		16	DP-305423-1/T43 (generación T4)
7	DP-305423-1/T11 (generación T5)		17	DP-305423-1/T44 (generación T4)
8	DP-305423-1/T12 (generación T5)		18	Control
9	DP-305423-1/T13 (generación T5)		19	DIGVII
10	DP-305423-1/T14 (generación T5)		20	2 copias PHP17752 + control

5 El ADN genómico aislado a partir de tejido foliar de soja de plantas individuales de DP-305423-1 (generación T5 y T4) y del control no modificado (Jack) se digirió con *Nco* I y se sondó con la sonda del gen *gm-hra*. Se digirieron y se cargaron en cada carril aproximadamente 2 µg de ADN genómico. Los controles de número de copias de los genes incluyeron al plásmido PHP19340 y PHP17752 con el número de copias de genes aproximado indicado y 2 mg de ADN control no modificado. Los tamaños de los marcadores de peso molecular DIG VII se indican adyacentes a la imagen de la transferencia en kilopares de bases (kb). En la tabla 10 se presenta una descripción de cada carril.

Tabla 10

Análisis de la transferencia Southern del acontecimiento DP-305423-1; digestión con Nco I, sonda gm-hra				
Carril	Muestra		Carril	Muestra
1	2 copias PHP19340 + control		11	DP-305423-1/T38 (generación T4)
2	DIGVII		12	DP-305423-1/T39 (generación T4)
3	control		13	DP-305423-1/T40 (generación T4)
4	DP-305423-1/T8 (generación T5)		14	DP-305423-1/T41 (generación T4)
5	DP-305423-1/T9 (generación T5)		15	DP-305423-1/T42 (generación T4)
6	DP-305423-1/T10 (generación T5)		16	DP-305423-1/T43 (generación T4)
7	DP-305423-1/T11 (generación T5)		17	DP-305423-1/T44 (generación T4)
8	DP-305423-1/T12 (generación T5)		18	Control
9	DP-305423-1/T13 (generación T5)		19	DIGVII
10	DP-305423-1/T14 (generación T5)		20	2 copias PHP17752 + control

10 Las tablas 11 y 12 resumen los resultados de los análisis de la transferencia Southern presentados en las figuras 5 a 8.

Tabla 11

<u>Resumen de los fragmentos de hibridación esperados y observados en las transferencias Southern con la sonda <i>gm-fad2-1</i> para DP-305423-1</u>				
Generación	Digestión enzimática	Tamaño esperado del fragmento ¹ (pb)	Tamaño esperado del plásmido (pb) ²	Tamaño observado del fragmento en DP-305423-1 (pb)
T4 y T5 (figura 5)	<i>Hind</i> III	1687	1687	aprox. 8600* aprox. 8000* aprox.2400 1687 ³
T4 y T5 (figura 6)	<i>Nco</i> I	>2300 (límite)	3510	>8600* 3 bandas >8600 aprox. 7400 aprox.6100 (débil) aprox. 2900 aprox. 900*

Notas:

*: La banda de hibridación también estaba presente en las muestras control. Se determina que esta banda procede de secuencias endógenas al entorno de la variedad Jack y no está relacionada con la inserción en DP-305423-1.

1: El tamaño se basa en el mapa del fragmento PHP19340A en la figura 2.

2: El tamaño se basa en el mapa del plásmido PHP19340 en la figura 1.

3: El tamaño es el mismo que el esperado debido a una migración equivalente con el plásmido de control positivo.

Tabla 12

<u>Resumen de los fragmentos de hibridación esperados y observados en las transferencias Southern con la sonda <i>gm-hra</i> para DP-305423-1</u>				
Generación	Digestión enzimática	Tamaño esperado del fragmento ¹ (pb)	Tamaño esperado del plásmido (pb) ²	Tamaño observado del fragmento en DP-305423-1 (pb)
T4 y T5 (figura 7)	<i>Hind</i> III	2418 1529	2418 1529	>8600* aprox. 8600* aprox. 7400* aprox. 5700* aprox. 4600* 2418 ³ aprox. 2300* aprox. 2100* 1529 ³ aprox. 900*

Resumen de los fragmentos de hibridación esperados y observados en las transferencias Southern con la sonda <i>gm-hra</i> para DP-305423-1				
Generación	Digestión enzimática	Tamaño esperado del fragmento ¹ (pb)	Tamaño esperado del plásmido (pb) ²	Tamaño observado del fragmento en DP-305423-1 (pb)
T4 y T5 (figura 8)	<i>Nco</i> I	>3000 (límite) >1500 (límite)	4214 2812	>8600* aprox. 8000* aprox. 6900* aprox. 6100* aprox. 5200* aprox. 4900* aprox. 4500* aprox. 3600 aprox. 2300 aprox. 1600*
<p>Notas:</p> <p>*: La banda de hibridación también estaba presente en las muestras control. Se determina que esta banda procede de secuencias endógenas al entorno de la variedad Jack y no está relacionada con la inserción en DP-305423-1.</p> <p>1: El tamaño se basa en el mapa del fragmento PHP17752A en la figura 4.</p> <p>2: El tamaño se basa en el mapa del plásmido PHP17752 en la figura 3.</p> <p>3: El tamaño es el mismo que el esperado debido a una migración equivalente con el plásmido de control positivo.</p>				

Se realizaron digestiones con *Hind* III en las muestras de ADN genómico para evaluar los fragmentos internos y la integridad de PHP19340A (figura 1; SEQ ID NO:1) y PHP17752A (figura 2; SEQ ID NO:2) a través de las generaciones T4 y T5 de DP-305423-1. Se seleccionó *Nco* I para evaluar el número de copias de los elementos *gm-fad2-1* y *gm-hra* en DP-305423-1 debido a la presencia de un único sitio de enzima de restricción en cada uno de los fragmentos de transformación. El único sitio de enzima de restricción produciría un único fragmento de límite de hibridación para cada copia insertada del elemento *gm-fad2-1* y dos fragmentos de límite de hibridación para cada copia del gen *gm-hra* (tablas 11 y 12, respectivamente). Un fragmento de límite se deriva de un sitio de restricción en la inserción y el sitio de restricción correspondiente más cercano dentro del ADN genómico vegetal adyacente. El número de fragmentos de límite observados con las sondas de *gm-fad2-1* y *gm-hra* proporciona un cálculo del número de copias del elemento dentro de la inserción de ADN de DP-305423-1.

Las sondas de *gm-fad2-1* y *gm-hra* utilizadas para los análisis Southern eran altamente homólogas con secuencias en el genoma de soja endógeno y, por tanto, se esperaban otros fragmentos de hibridación. Estas bandas de hibridación se determinaron a través de su presencia en las muestras de control negativo y se indican en las tablas 11 y 12 mediante un asterisco (*).

Para verificar la integridad de la región 3' de la inserción PHP19340A, el *gm-fad2-1* se hibridó con la transferencia de *Hind* III. Se espera un único fragmento interno de 1687 pb basándose en la presencia de sitios *Hind* III en PHP19340A (tabla 11, figura 1). Se observó la banda esperada de 1687 pb y también se observó una segunda banda de aproximadamente 2400 pb (figura 5). Además, la sonda de *gm-fad2-1* se hibridó con dos bandas más en DP-305423-1 que también estaban presentes en los controles y que no son debidas a la inserción de DP-305423-1 (figura 5). Es muy probable que la banda de 2400 pb sea debida a una copia parcial de PHP19340A que contiene la región *gm-fad2-1*. Estos resultados indican la presencia de copias intactas de PHP19340A, así como una copia parcial que contiene *gm-fad2-1* en DP-305423-1. Este patrón de hibridación es constante a través de las generaciones T4 y T5 de DP-305423-1 analizadas (tabla 11).

Para determinar el número de copias del elemento *gm-fad2-1* en DP-305423-1, la sonda de *gm-fad2-1* se hibridó con la transferencia de *Nco* I. Se espera un fragmento de límite mayor que 2300 pb para cada copia de *gm-fad2-1* (tabla 11, figura 1). La transferencia de *Nco* I hibridada con la sonda de *gm-fad2-1* mostró seis fragmentos de hibridación (figura 6). El tamaño de estos seis fragmentos de hibridación se muestra en la tabla 11. Se observaron dos bandas adicionales y se determinó que eran debidas al genoma de soja endógeno, basándose en su presencia en las muestras de control negativo (tabla 11, figura 6). La presencia de seis fragmentos de hibridación indica que existen aproximadamente seis copias insertadas de los elementos *gm-fad2-1* completos o parciales en el genoma de DP-305423-1. Este patrón de hibridación es constante a través de las generaciones T4 y T5 de DP-305423-1 analizadas (tabla 11), lo cual indica la estabilidad del ADN insertado.

La hibridación de la sonda *gm-hra* a la transferencia de *Hind* III verificaría la integridad del fragmento PHP17752A

insertado, puesto que se esperarían dos bandas internas de 1529 pb y 2418 pb, basándose en la posición de los sitios *Hind* III sobre el fragmento (tabla 12, figura 2). Estas dos bandas se observaron en la hibridación de la transferencia *Hind* III con la sonda de *gm-hra* (tabla 12, figura 7). Se observaron otras bandas de hibridación en los carriles de DP-305423-1 y control, lo cual indica que estas bandas son debidas a secuencias endógenas y no son debidas a la inserción de DP-305423-1 (tabla 12, figura 7). La presencia de solo dos de las bandas transgénicas esperadas es una indicación de que el fragmento PHP17752A se ha insertado intacto en el genoma. Ambas generaciones T4 y T5 de DP-305423-1 mostraron el mismo patrón de hibridación (tabla 12).

La hibridación de la sonda de *gm-hra* con la transferencia de *Nco* I verificaría el número de copias del elemento en DP-305423-1. Se esperarían dos fragmentos de límite, uno mayor que 1500 pb y un segundo mayor que 3000 pb, para cada copia del elemento, basándose en la posición del sitio de restricción *Nco* I dentro del gen *gm-hra* en PHP17752A (tabla 12, figura 4). Se observaron dos bandas de hibridación, una de aproximadamente 3200 pb y otra de 3600 pb (tabla 12, figura 8). Se observaron otras bandas de hibridación en los carriles de DP-305423-1 y control, lo cual indica que estas bandas son debidas a secuencias endógenas y no son debidas a la inserción de DP-305423-1 (tabla 12, figura 8). La presencia de dos bandas transgénicas indica una inserción del gen *gm-hra* en el genoma de the DP-305423-1. Este patrón de hibridación es constante a través de las generaciones T4 y T5 de DP-305423-1 analizadas (tabla 12), lo cual indica la estabilidad del ADN insertado.

En resumen, estas combinaciones de enzimas de restricción y sondas muestran unos patrones de hibridación constantes a través de todos los individuos analizados y a través de las generaciones T4 y T5 de DP-305423-1. Basándose en los análisis indicados en la presente, parece haber aproximadamente seis copias del elemento *gm-fad2-1* completo o parcial y una única copia del gen *gm-hra* en el genoma de DP-305423-1. Es probable que las copias intactas y parciales de PHP19340A y la única copia intacta de PHP17752A se hayan insertado en el genoma de DP-305423-1.

Ejemplo 4:

Confirmación del fenotipo de alto contenido en ácido oleico mediante cromatografía de gases (CG) y análisis de la transferencia Southern

Antes de plantar, se cortan pequeñas lascas de la semilla (aproximadamente 2 mg) de los cotiledones de la semilla empleando una cuchilla. Se preparan los ésteres de metilo de los ácidos grasos (FAMES) a partir de las lascas de semillas de soja maduras individuales mediante transesterificación empleando hidróxido de trimetilsulfonio (TMSH) (Butte, 1983). Se colocan las lascas de las semillas en un vial de cromatografía de gases de vidrio de 1,5 ml que contenía 50 μ l de TMSH y 0,5 ml de heptano, y se incubaba durante 10 minutos a temperatura ambiente con agitación. Se trasladan los viales a rejillas para viales en el cromatógrafo de gases. Se separan y se cuantifican los ésteres de metilo de ácidos grasos (3 μ l inyectados a partir de una capa de heptano) empleando un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 6890-2 equipado con una columna capilar de sílice fundida Omegawax 320 (Supelco Inc., Bellefonte, PA) y un detector de ionización de llama ("Flame Ionization Detector" (FID)). Se programa la temperatura de la estufa para mantenerse a 220 °C durante 5 min, aumentar hasta 240 °C a 20 °C /min y mantenerse durante un minuto más. Un generador de hidrógeno Whatman suministra el gas vehículo y suministra el hidrógeno para el FID. Los tiempos de retención se comparan con los de ésteres de metilo de patrones disponibles en el mercado (Nu-Chek Prep, Inc., Elysian, MN).

Se estudian los perfiles de aceite de todas las semillas para determinar unos niveles elevados de ácido oleico (18:1) como confirmación del fenotipo. Se espera que el nivel de ácido oleico, según se mide mediante GC, sea >70 % para las semillas de soja DP-305423-1, y de <30 % para las semillas de control.

Las plantas se estudian mediante un análisis de la transferencia Southern para confirmar la presencia del fragmento del gen *gm-fad2-1* y del gen *gm-hra* introducidos en plantas de soja DP-305423-1, y su ausencia en plantas de soja control, y estos datos se correlacionan con los resultados del ácido oleico.

Ejemplo 5:

Caracterización de la inserción y de la secuencia de límite flanqueante del acontecimiento de soja DP-305423-1

La inserción y las regiones de límite flanqueantes del ADN genómico de DP-305423-1 se aislaron mediante amplificación con PCR y mediante clonación de cósmidos. Los fragmentos de PCR se secuenciaron directamente o se clonaron en vectores plasmídicos antes de la secuenciación. Los ADN de los cósmidos se aislaron y se secuenciaron.

Se descubrió que estaban presentes copias parciales e intactas de PHP19340A y una única copia de PHP17752A en cuatro cóntigos del ADN genómico del acontecimiento DP-305423-1. Estos cuatro cóntigos se denominaron cóntigo-1 (figura 9; SEQ ID NO:5), cóntigo-2 (figura 10; SEQ ID NO:6), cóntigo-3 (figura 11; SEQ ID NO:7) y cóntigo-4 (figura 12; SEQ ID NO:82). El cóntigo-1 tiene 39.499 nucleótidos. La secuencia genómica de soja 5' consta de los nucleótidos 1-18.651; la secuencia de la inserción consta de los nucleótidos 18.652-31.579; y la secuencia genómica de soja 3' consta de los nucleótidos 31.580-39.499. El cóntigo-2 tiene 25.843 nucleótidos. La secuencia genómica de soja 5' consta de los nucleótidos 1-12.163; la secuencia de la inserción consta de los nucleótidos 12.164-14.494; y la

secuencia genómica de soja 3' consta de los nucleótidos 14.495-25.843. El cóntigo-3 tiene 12.465 nucleótidos. La secuencia genómica de soja 5' consta de los nucleótidos 1-5.750; la secuencia de la inserción consta de los nucleótidos 5.751-7.813; y la secuencia genómica de soja 3' consta de los nucleótidos 7.814-12.465. El cóntigo-4 tiene 10.058 nucleótidos. La secuencia genómica de soja 5' consta de los nucleótidos 1-2.899; la secuencia de la inserción consta de los nucleótidos 2.900-7.909; y la secuencia genómica de soja 3' consta de los nucleótidos 7.910-10.058.

Clonación del ADN genómico y diseño de los cebadores:

El ADN genómico total de la soja DP-305423-1 se digirió parcialmente con las enzimas de restricción *HindIII* y *Mbol*, y se clonó en vectores cosmidicos para construir bancos de cósmidos *HindIII* y *Mbol*. Los bancos de cósmidos se seleccionaron empleando un fragmento del promotor KTi3 como sonda. Se identificaron un total de tres clones exclusivos (51-21, 51-9, y H3IIBB19) a partir del banco de *HindIII*, y dos (mbo30 y mbo22) del banco de *Mbol*. Estos cinco clones se analizaron mediante secuenciación de inserción completa (FIS), un método de subclonación basado en transposones para facilitar la secuenciación bidireccional de una inserción clonada desde el sitio del acontecimiento de transposición (MJ Research TGS system; Happa *et al.*, 1999). El análisis de la secuencia demostró que 51-21 y mbo30 son clones solapantes que contienen la inserción idéntica del cóntigo-1, 51-9 y mbo22 son clones solapantes que contienen la inserción idéntica del cóntigo-2, y H3IIBB19 contiene el cóntigo-3 exclusivo. Se diseñaron cebadores basándose en las secuencias de los clones de cósmido. Se realizó una PCR genómica para verificar las inserciones y las regiones de límite flanqueantes en soja DP-305423-1.

Cóntigo-1 - Inserción y regiones de límite genómicas flanqueantes:

Se diseñaron cebadores basándose en la información de la secuencia obtenida de los clones de cósmido 51-21 y mbo30 que contienen la secuencia del cóntigo-1. Los productos de la PCR se amplificaron a partir del ADN genómico de la soja DP-305423-1 empleando las parejas de cebadores A (06-O-1571/06-O-1572, 7103 pb de la zona de unión del límite genómico/inserción 5'), B (06-O-1351/06-O-1367, 731 pb de la zona de unión del límite/inserción 5'), C (06-O-1357/06-O-1368, 3226 pb de la inserción), D (06-O-1357/06-O-1369, 2737 pb de la inserción), E (06-O-1356/06-O-1371, 1800 pb de la inserción), F (06-O-1360/06-O-1423, 1321 pb de la inserción), G (06-O-1363/06-O-06-O-1369, 1830 pb de la inserción), H (06-O-1421/06-O-06-O-1367, 2410 pb de la inserción), e I (06-O-1577/06-O-1578, 2991 pb de la zona de unión del límite genómico/inserción 3') (tabla 13), y se clonaron. Los productos de la PCR B, C, D, E, F, G, y H fueron directamente secuenciados para verificar la inserción, y A e I se analizaron mediante FIS para verificar las zonas de unión genómicas/inserción 5' y 3' y sus regiones de límite flanqueantes. No se amplificaron productos de la PCR cuando se empleó ADN genómico control como molde.

Para el cóntigo-1, se confirmaron 22452 pb de la secuencia genómica de DP-305423-1 (nucleótidos 11652-34103 de SEQ ID NO:5), que comprenden 7000 pb de la secuencia de límite flanqueante 5', 2524 pb de la secuencia de límite genómica flanqueante 3', y 12928 pb del ADN insertado. Se descubrió que la inserción contenía un fragmento PHP19340A intacto, un único fragmento PHP17752A intacto, y tres fragmentos PHP19340A truncados. El primer fragmento PHP19340A truncado contiene un terminador KTi3 parcial (180 pb) con una delección 3', un fragmento de *gm-fad2-1* intacto (597 pb) y un promotor KTi3 intacto (2084 pb). El segundo fragmento PHP19340A truncado contiene un fragmento de *gm-fad2-1* parcial (39 pb) con una delección 3', y un promotor KTi3 intacto (2084 pb). El tercer fragmento PHP19340A truncado contiene un promotor KTi3 parcial (245 pb) con una delección 5', y un fragmento de *gm-fad2-1* parcial (186 pb) con una delección 3'.

Para demostrar que las secuencias de límite flanqueantes 5' y 3' identificadas para el cóntigo-1 tenían un origen de soja se realizó una PCR dentro de las regiones de límite flanqueantes 5' y 3' (07-O-1889/07-O-1940, 07-O-1892/07-O-1894, respectivamente) en las muestras de ADN genómico de soja DP-305423-1 y las muestras control. Se generaron los productos de la PCR esperados (115 pb para la región genómica flanqueante 5' y 278 pb para la región genómica flanqueante 3') a partir de las muestras de soja DP-305423-1 y las muestras control, lo cual indica que las secuencias tenían un origen genómico de soja y no son específicas de la soja DP-305423-1. Estos productos de la PCR se clonaron y secuenciaron. Las secuencias del ADN de DP-305423-1 y del ADN del control genómico son idénticas.

Cóntigo-2 - Inserción y regiones de límite genómicas flanqueantes:

Se diseñaron cebadores basándose en la información de la secuencia obtenida de los clones de cósmido 51-9 y mbo22 para el cóntigo-2. Los productos de la PCR se amplificaron a partir del ADN genómico de la soja DP-305423-1 empleando las parejas de cebadores J (06-O-1588/06-O-1585, 7642 pb de la zona de unión del límite genómico/inserción 5'), K (06-O-1586/06-O-1403, 2807 pb de la zona de unión del límite genómico/inserción 5'), y L (06-O-1404/06-O-1592, 2845 pb de la zona de unión del límite genómico/inserción 3') (tabla 13), y se clonaron. Los productos de la PCR K y L fueron directamente secuenciados para verificar la inserción y la zona de unión de límite genómica/inserción 3' y su región de límite flanqueante, y J se analizó mediante FIS para verificar las zonas de unión de límite genómicas/inserción 5' y su región de límite flanqueante. No se amplificaron productos de la PCR cuando se empleó ADN genómico control como molde.

Para el cóntigo-2, se confirmaron 12667 pb de la secuencia genómica de DP-305423-1 (nucleótidos 4565-17231 de

SEQ ID NO:6), que comprenden 7599 pb de la secuencia de límite flanqueante genómica 5', 2737 pb de la secuencia de límite genómica flanqueante 3', y 2331 pb del ADN insertado. Se descubrió que la inserción contenía un fragmento PHP19340A truncado, con un promotor KTi3 parcial (1511 pb), un fragmento de *gm-fad2-1* intacto (597 pb), y un terminador KTi3 intacto (196 pb).

- 5 Para demostrar que las secuencias de límite flanqueantes 5' y 3' identificadas para el cóntigo-2 tenían un origen de soja se realizó una PCR dentro de las regiones genómicas flanqueantes 5' y 3' (parejas de cebadores 07-O-1895/07-O-1898 y 07-O-1905/07-O-1903, respectivamente) en las muestras de ADN de DP-305423-1 y las muestras de ADN genómico de soja control. Se generaron los productos de la PCR esperados (278 pb para la región de límite flanqueante 5' y 271 pb para la región de límite flanqueante 3') a partir de las muestras de soja DP-305423-1 y control, lo cual indica que las secuencia tenían un origen genómico de soja y no son específicas de la soja DP-305423-1. Estos productos de la PCR se clonaron y secuenciaron. Las secuencias del ADN de DP-305423-1 y del ADN del control genómico son idénticas.

Cóntigo-3 - Inserción y regiones de límite genómicas flanqueantes:

- 15 Se diseñaron cebadores basándose en la información de la secuencia obtenida del clon de cósmido H3IIB19 para el cóntigo-3. Los productos de la PCR se amplificaron sobre el ADN genómico de DP-305423-1 empleando las parejas de cebadores M (06-O-1669/06-O-1426, 2804 pb), N (06-O-1355/06-O-1459, 1335 pb), O (06-O-1569/06-O-1551, 1085 pb), y P (05-O-1182/06-O-1672, 2614 pb) (tabla 13), y se clonaron. Los productos de la PCR M, N, O, y P fueron directamente secuenciados para verificar la inserción, y la zona de unión genómica/inserción 5' y 3' y sus regiones genómicas flanqueantes. No se amplificaron productos de la PCR cuando se empleó ADN genómico control como molde.

- 20 Para el cóntigo-3, se confirmaron 6789 pb de la secuencia genómica de DP-305423-1 (nucleótidos 3312-10100 de SEQ ID NO:7), que comprenden 2439 pb de la secuencia de límite flanqueante 5', 2287 pb de la secuencia de borde flanqueante 3', y 2063 pb del ADN insertado. Se descubrió que la inserción contenía un fragmento PHP19340A truncado con solo un promotor KTi3 parcial (1550 pb), y un fragmento del esqueleto del plásmido de 495 pb. Este fragmento del esqueleto del plásmido es idéntico a las regiones localizadas desde 2033 pb a 2527 pb en el plásmido PHP19340, y desde 1836 pb a 2330 pb en el plásmido PHP17752, que no incluyen el origen de la replicación (ori). El *ori* en los plásmidos PHP13940 y PHP1772 se localiza desde 1561 a 1930 pb y desde 1364 a 1733 pb, respectivamente (Tomizawa *et al.*, 1977).

- 25 Para demostrar que las secuencias de límite flanqueantes 5' y 3' identificadas para el cóntigo-3 tenían un origen de soja se realizó una PCR dentro de las regiones de límite flanqueantes 5' y 3' (parejas de cebadores 07-O-1881/07-O-1882 y 07-O-1886/07-O-1884, respectivamente) en las muestras de ADN genómico de soja DP-305423-1 y las muestras control. Se generaron los productos de la PCR esperados (262 pb para la región de límite flanqueante 5' y 280 pb para la región de límite flanqueante 3') para las muestras de soja DP-305423-1 y control, lo cual indica que las secuencia tenían un origen genómico de soja y no son específicas de la soja DP-305423-1. Estos productos de la PCR se clonaron y secuenciaron. Las secuencias del ADN de DP-305423-1 y del ADN del control genómico son idénticas.

Cóntigo-4 - Inserción y regiones de límite genómicas flanqueantes:

- 30 Se emplearon bancos de plásmidos e iPCR para identificar la inserción en el interior y las regiones de límite flanqueantes del cóntigo-4. Se digirió el ADN genómico total de la soja DP-305423-1 con las enzimas de restricción Spe I y Bcl I, y se ensayaron en geles de agarosa para separar los fragmentos de ADN basándose en sus pesos moleculares. Los fragmentos de ADN sobre los geles de agarosa se trasladaron a una membrana de nailon, y se hibridaron con una sonda de *gm-fad2-1* o una sonda del promotor KTi3. Las bandas de 2,8 kb y 5,1 kb se hibridaron con la sonda de *gm-fad2-1* después de la digestión con Spe I, y las bandas de 1,5 kb y 3,3 kb se hibridaron con la sonda del promotor de KTi3 después de la digestión con Bcl I. Todas estas bandas estaban presentes solo en las plantas DP-305423-1, pero no en las plantas control. Estas cuatro bandas se clonaron en vectores plasmídicos para fabricar bancos de plásmidos. Los clones positivos se identificaron después de la selección del banco de plásmidos con la sonda de *gm-fad2-1* o la sonda del promotor de KTi3, y fueron directamente secuenciados. La secuencia del cóntigo-4 se presenta en SEQ ID NO:82.

- 35 La banda de 2,8 kb de la digestión con Spe I y la banda de 3,3 kb de la digestión con Bcl I se solapan (se denomina SpeI2.8), y contienen un fragmento PHP19340A truncado con una delección de 159 pb en el extremo 3' del promotor KTi3; y la banda de 5,1 kb de la digestión con Spe I y la banda de 1,5 kb de la digestión con Bcl I se solapan (se denomina SpeI5.1), y contienen un fragmento PHP19340A truncado con una delección de 649 pb en el extremo 3' del promotor KTi3. Puesto que existe un sitio Spe I dentro del terminador KTi3, solo se obtuvo una secuencia de terminador KTi3 de 148 pb para ambos SpeI2.8 y SpeI5.1.

- 50 Basándose en la información de la secuencia se utilizaron cebadores para una PCR inversa (iPCR) para obtener más información de secuencia en el extremo 3' del terminador KTi3. Los productos de la iPCR se secuenciaron directamente, o se clonaron y después se secuenciaron directamente. Los datos de la secuencia generados a partir de los productos de la iPCR con una digestión con *NdeI* demostraron que SpeI2.8 contenía un terminador KTi3

intacto y un terminador KTi3 de 35 pb en la orientación inversa, y que SpeI5.1 contenía un terminador KTi3 intacto y un terminador KTi3 de 34 pb en la orientación inversa, lo cual indica que los dos terminadores KTi3 de SpeI2.8 y SpeI5.1 están dispuestos como repeticiones invertidas. Los datos de la secuencia generados a partir de los productos de la iPCR con una digestión con *PacI* confirmaron que SpeI2.8 y SpeI5.1 están dispuestos como repeticiones invertidas.

Se empleó un análisis de la transferencia Southern para una posterior confirmación. Se digirió el ADN genómico total de plantas de soja DP-305423-1 y control con *Bcl* I, *Cla*I y *Xmn*I, se ensayó en un gel de agarosa, se trasladó a una membrana de nailon, y se hibridó con la sonda de *gm-fad2-1*. Las bandas con el tamaño esperado se hibridaron con la sonda de *gm-fad2-1*: una banda de aproximadamente 3,1 kb para la digestión con *Bcl* I, una banda de aproximadamente 3,9 kb para la digestión con *Cla*I, y una banda de 1,7 kb para la digestión con *Xmn*I (figura 12). Tomados conjuntamente, estos resultados sugieren que los dos terminadores KTi3 de SpeI2.8 y SpeI5.1 están dispuestos de modo invertido.

Para el cóntigo-4, se identificaron 10058 pb de la secuencia genómica de DP-305423-1 (SEQ ID NO:82), que comprenden 2899 pb de la secuencia de límite genómica flanqueante 5', 2149 pb de la secuencia de límite genómica flanqueante 3', y 5010 pb del ADN insertado. Se cree que la inserción contiene dos fragmentos PHP19340A truncados de un modo invertido. El primer fragmento PHP1930A truncado se localiza desde 2900 a 5163 pb, contiene un promotor KTi3 parcial (1442 pb) con una delección 5', un fragmento de *gm-fad2-1* intacto (597 pb) y un terminador KTi3 intacto (196 pb). El segundo fragmento PHP1930A truncado se localiza desde 5164 a 7919 pb, contiene un promotor KTi3 parcial (1934 pb) con una delección 5', un fragmento de *gm-fad2-1* intacto (597 pb) y un terminador KTi3 intacto (196 pb) (figura 12).

Para verificar las zonas de unión genómica/inserción 5' y 3' obtenidas de los bancos de plásmidos, se realizó una PCR con el ADN genómico de plantas de soja DP-305423-1 empleando la pareja de cebadores Q (HOS-A/HOS-B) para confirmar la zona de unión genómica/inserción 5', y con la pareja de cebadores R (HOS-C/HOS-D) para confirmar la zona de unión genómica/inserción 3'. Los productos esperados de la PCR se amplificaron de plantas DP-305423-1 (tabla 13), y no de plantas control; estos productos de la PCR se clonaron y secuenciaron. Se confirmó que la secuencia era la misma que la secuencia obtenida de los clones de plásmidos. Ejemplo 6: Estabilidad de la inserción del cóntigo-1

Tabla 13

PCR genómica para confirmar el ADN insertado y las regiones de límite genómicas flanqueantes en la soja DP-305423-1				
Producto de la PCR (tamaño en pb)	Pareja de cebadores	Sistema de PCR ¹	Inserción	Región amplificada
A (7103)	06-O-1571/06-O-1572	Expansión de molde largo	1	Inserción y región flanqueante 5'
B (731)	06-O-1351/06-O-1367	Alta fidelidad	1	Inserción y región flanqueante 5'
C (3226)	06-O-1357/06-O-1368	Advantage-GC-2	1	Inserción
D (2737)	06-O-1357/06-O-1369	Advantage-GC-2	1	Inserción
E (1800)	06-O-1356/06-O-1371	Alta fidelidad	1	Inserción
F (1321)	06-O-1360/06-O-1423	Advantage-GC-2	1	Inserción
G (1830)	06-O-1363/06-O-1369	Advantage-GC-2	1	Inserción
H (2410)	06-O-1421 /06-O-1367	Advantage-GC-2	1	Inserción
I (2991)	06-O-1577/06-O-1578	Extensor de alta fidelidad	1	Inserción y región flanqueante 3'
J (7642)	06-O-1588/06-O-1585	Expansión de molde largo	2	Inserción y región flanqueante 5'
K (2817)	06-O-1586/06-O-1403	Advantage-GC-2	2	Inserción y región flanqueante 5'
L (2845)	06-O-1404/06-O-1592	Advantage-GC-2	2	Inserción y región flanqueante 3'
M (2804)	06-O-1669/06-O-1426	Expansión de molde largo	3	Inserción y región flanqueante 5'

PCR genómica para confirmar el ADN insertado y las regiones de límite genómicas flanqueantes en la soja DP-305423-1				
Producto de la PCR (tamaño en pb)	Pareja de cebadores	Sistema de PCR ¹	Inserción	Región amplificada
N (1335)	06-O-1355/06-O-1459	Alta fidelidad	3	Inserción
O(1085)	06-O-1569/06-O-1551	Expansión de molde largo	3	Inserción y región flanqueante 3'
P (2614)	05-O-1182/06-O-1672	Alta fidelidad	3	Inserción y región flanqueante 3'
Q (209)	HOS-A/HOS-B	Taq polimerasa	4	Inserción y región flanqueante 5'
R (222)	HOS-C/HOS-D	Taq polimerasa	4	Inserción y región flanqueante 3'

1. Los sistemas de PCR de alta fidelidad y de expansión de molde largo se adquirieron en Roche (Mannheim, Alemania), el sistema de PCR Advantage-GC-2 se adquirió en Clontech (Palo Alto, CA), el sistema de PCR de extensor de alta fidelidad se adquirió en ABgene (Surrey, Reino Unido), y la Taq polimerasa se adquirió en Fermentas (Hanover, MD).

Ejemplo 6:

Estabilidad de la inserción del cóntigo-1

Se descubrió que la inserción en el cóntigo-1 contenía un fragmento PHP19340A intacto (módulo de supresión de *gm-fad2-1*), un único fragmento PHP17752A intacto (módulo de expresión de *gm-hra*), y tres fragmentos PHP19340A truncados. Un análisis de la transferencia Southern realizado en 100 plantas de la generación F2 de DP-305423-1 identificó una única planta que parece haber sufrido un acontecimiento de recombinación que provoca la eliminación del módulo de *gm-hra* completo, junto con porciones de dos de los múltiples fragmentos del promotor KTi3 que se encuentran en la inserción. Se analizó un gran número de plantas de generaciones segregantes mediante una reacción en cadena de polimerasa (PCR) para determinar con qué frecuencia aparece esta recombinación.

Las semillas se obtuvieron de las generaciones segregantes de soja DP-305423-1 BC1F2, BC2F2, y BC3F2. Cada generación consiste en DP-305423-1 en el entorno Elite 1 o Elite 2. Se plantaron un total de 1060 semillas (tabla 14).

Tabla 14

Semilla de soja DP-305423-1			
Generación	Entorno	Semillas plantadas	Plantas muestreadas
BC1F2	Elite 1	175	166
BC1F2	Elite 2	150	142
BC2F2	Elite 1	65	62
BC2F2	Elite 2	40	36
BC3F2	Elite 1	420	402
BC3F2	Elite 2	210	201

Se recogieron troquelados de hoja individuales y se extrajo el ADN genómico de los troquelados empleando el método de extracción de hidróxido de sodio caliente y Tris (Truett, G.E., Heeger, P., Mynatt, R.L., Truett, A.A., Walker, J.A. y Warman, M.L. (2000), Preparation of PCR-Quality Mouse Genomic DNA with Hot Sodium Hydroxide and Tris (HotSHOT), BioTechniques 29: 52-53.).

Se realizó una PCR a tiempo real en cada muestra de ADN empleando un sistema de detección de secuencias ABI PRISM® 7900HT y el software SDS adjunto (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA). Se diseñaron conjuntos de sondas y cebadores TaqMan® para detectar dos secuencias de inserción diana: (1) la región de la zona de unión 5' entre el ADN genómico y el ADN de la inserción en el cóntigo-1, que se empleó como marcador para el módulo de supresión de *gm-fad2-1* (SEQ ID NO:89, 90 y 91), y (2) la región en la inserción del cóntigo-1 que abarca el promotor de SAMS y *gm-hra* (SEQ ID NO:92, 93 y 94). Además, se empleó un conjunto de sonda y cebador TaqMan® para el gen endógeno de soja de referencia para confirmar la presencia de un ADN amplificable en cada reacción. El

análisis consistió en la determinación con PCR a tiempo real cuantitativa de los callos positivos/negativos cualitativos. El ADN extraído se ensayó empleando concentraciones de cebador y sonda validadas y optimizadas en la mezcla de reacción de PCR Extract-N-Amp™ que contenía un tinte de referencia pasivo Rox (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Después de unas incubaciones iniciales a 50 °C durante 2 minutos y después a 95 °C durante 3 minutos se realizaron 40 ciclos como sigue: 95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 1 minuto. La determinación positiva o negativa para cada diana de inserción se basó en la comparación del C_T (ciclo umbral) de la PCR de la diana de inserción con la de la diana endógena.

Se analizó un total de 1009 plantas de tres generaciones segregantes diferentes (BC1F2, BC2F2 y BC3F2) y dos entornos diferentes (Elite 1 y Elite 2) mediante una PCR a tiempo real cualitativa para la zona de unión 5' del cóntigo-1 y las dianas del promotor de SAMS::*gm-hra*. Cada reacción contiene ADN amplificable basándose en el control de gen endógeno. De las 1009 plantas en las seis poblaciones segregantes, 745 fueron positivas y 264 fueron negativas para ambos ensayos de PCR. No se identificaron plantas en las que los resultados de la PCR fueran positivos para una diana y negativos para la otra. Por consiguiente, en este grupo de muestras de 1009 plantas no se detectó recombinación dentro de la inserción del cóntigo-1 que elimine selectivamente el módulo del promotor de SAMS::*gm-hra*. En la tabla 15 se ofrece un resumen de los resultados.

Tabla 15

Resultados del análisis de PCR cualitativo a tiempo real según la generación y el entorno						
Generación	Entorno	Resultados de la PCR de la zona de unión 5' del cóntigo-1		Resultados de la PCR del promotor de SAMS:: <i>gm-hra</i>		Total de plantas
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	
BC1F2	Elite 1	125	41	125	41	166
	Elite 2	108	34	108	34	142
BC2F2	Elite 1	39	23	39	23	62
	Elite 2	27	9	27	9	36
BC3F2	Elite 1	297	105	297	105	402
	Elite 2	149	52	149	52	201
Total		745	264	745	264	1009

Ejemplo 7:

Niveles de ácidos grasos en granos de soja

Se midieron los niveles de 25 ácidos grasos en granos de soja DP-305423-1 y control. Los niveles de diez ácidos grasos estuvieron por debajo del límite inferior de cuantificación (LLOQ) para el ensayo: ácido caprílico (C8:0), ácido cáprico (C10:0), ácido láurico (C12:0), ácido miristoleico (C14:1), ácido pentadecanoico (C15:0), ácido pentadecenoico (C15:1), ácido γ -linolénico (C18:3), ácido eicosatrienoico (C20:3), ácido araquidónico (C20:4), y ácido erúxico (C22:1). Por tanto no se realizaron análisis estadísticos con estos ácidos grasos y no se muestran esos datos. Los resultados del análisis de los 15 ácidos grasos restantes se presentan en la tabla 16.

Los valores promedio para el ácido oleico (C18:1) y el ácido linoleico (C18:2) se encontraron fuera de los intervalos de tolerancia y/o los intervalos de la bibliografía combinados para variedades de soja convencionales. Tal como se esperaba, el nivel promedio del ácido oleico en la soja DP-305423-1 se encontró por encima del límite superior del intervalo de tolerancia estadística para las líneas de soja de referencia y del intervalo de la bibliografía para las variedades de soja convencionales. El nivel promedio del ácido oleico en la soja DP-305423-1 fue estadística y significativamente diferente de el de la soja control cercana a la isolínea (valor P ajustado <0,05). El nivel promedio del ácido linoleico (C18:2) en la soja DP-305423-1 se encontró por debajo del límite inferior del intervalo de tolerancia estadística para las líneas de soja de referencia y del intervalo de la bibliografía para las variedades de soja convencionales. También fue estadística y significativamente diferente de el de la soja control cercana a la isolínea (valor P ajustado <0,05). El aumento en el contenido en ácido oleico y la disminución en el contenido en ácido linoleico en la soja DP-305423-1 son efectos deseados logrados mediante la introducción del fragmento del gen *gm-fad2-1*. Estos cambios se han indicado previamente para una soja con alto contenido en ácido oleico transgénica (OECD identificador DD-Ø26ØØ5-3, base de datos AGBIOS) generada por la introducción del gen *FAD2-1* (Kinney y Knowlton, 1997; Glancey *et al.*, 1998; Knowlton, 1999).

Aunque están dentro de los intervalos de la bibliografía y/o los intervalos de tolerancia estadística, los valores promedio para el ácido palmítico (C16:0) y el linolénico (C18:3) fueron estadística y significativamente diferentes (menores) en la soja DP-305423-1, comparado con el control cercano a la isolínea (valor P ajustado <0,05). El ácido linolénico se produce directamente de la conversión del ácido linoleico y, por tanto, se espera que la disminución en

el contenido en ácido linoleico afecte al contenido en ácido linolénico en la soja DP-305423-1. La disminución en el contenido en ácido palmítico y en ácido linolénico se ha indicado previamente para una soja con alto contenido en ácido oleico transgénica (OECD identificador DD-026005-3, base de datos AGBIOS) generada por la introducción del gen *FAD2-1* (Kinney y Knowlton, 1997; Glancey *et al.*, 1998; Knowlton, 1999).

5 Se detectó el isómero (9,15) del ácido linoleico (ácido cis-9, cis-15-octadecadienoico) en la soja DP-305423-1 a la concentración promedio de 0,341% de los ácidos grasos totales, mientras que las variedades de referencia convencionales no contienen concentraciones mensurables de este analito. Esto fue un descubrimiento esperado, puesto que el isómero del ácido 9,15-linoleico ya se ha observado previamente en aceite de soja con alto contenido en ácido oleico en menos del 1% del contenido en ácidos grasos totales (Kinney y Knowlton, 1997). Este isómero también se ha encontrado, en concentraciones que varían del 0,02% al 5,4% de ácidos grasos totales, en muchas fuentes comestibles de grasas, que incluyen grasa de mantequilla, queso, sebo de vaca y cordero, aceites vegetales parcialmente hidrogenados, leche humana y pulpa de mango (Kinney y Knowlton, 1997, y las referencias en este documento). Es probable que el isómero del ácido 9,15-linoleico sea el resultado de la actividad de la ácido graso desaturasa codificada por el gen *FAD3* que normalmente inserta un doble enlace d-15 en el ácido 9,12-linoleico para producir ácido 9,12,15-linolénico. En la soja DP-305423-1, el contenido en ácido 9,12-linoleico está significativamente reducido (tabla 16), de modo que la desaturasa codificada por *FAD3* probablemente crea una pequeña cantidad del isómero del ácido 9,15-linoleico mediante la desaturación del abundante sustrato de ácido 9-oleico en la posición d-15. Esta opinión resulta apoyada por los resultados del cruzamiento de soja con alto contenido en ácido oleico (OECD identificador DD-026005-3, base de datos AGBIOS) con soja que contiene el gen *FAD3* silenciado. En la progenie resultante, el isómero de ácido 9,15-linoleico se encuentra reducido o se ha eliminado (Kinney y Knowlton, 1997).

Los valores promedio de dos ácidos grasos secundarios, el ácido heptadecanoico (C17:0) y el ácido heptadecenoico (C17:1), en la soja DP-305423-1 estaban por encima del límite superior de los intervalos de tolerancia estadística y de los intervalos de la bibliografía de las variedades de soja convencionales. Los valores promedio de C17:0 y C17:1 fueron estadística y significativamente diferentes de los de la soja control cercana a la isolínea. Sin embargo, los niveles de ácido heptadecanoico y heptadecenoico en general aún son muy bajos; cada uno representa menos del 1,2% del contenido en ácidos grasos totales en la soja DP-305423-1.

El aumento detectado en el ácido heptadecanoico (C17:0) y el ácido heptadecenoico (C17:1) en la soja DP-305423-1 no es inesperado, puesto que es probable que la expresión de la proteína GM-HRA produzca un ligero desplazamiento en la disponibilidad de los sustratos enzimáticos de GM-HRA, piruvato y 2-cetobutirato. Estos dos compuestos también son sustratos para el complejo enzimático que inicia la biosíntesis de aceite.

Los valores promedio para el ácido mirístico (C14:0), ácido palmitoleico (C16:1), ácido esteárico (C18:0), ácido araquídico (C20:0), ácido eicosenoico (C20:1), ácido behénico (C22:0) y ácido lignocérico (C24:0) para la soja DP-305423-1 estaban dentro de los intervalos de tolerancia estadística y/o los intervalos de la bibliografía combinados para estos ácidos grasos en diferentes variedades de soja. Con la excepción del ácido behénico, los valores promedio para estos ácidos grasos fueron estadística y significativamente diferentes, tanto por encima (ácidos palmitoleico, araquídico, eicosenoico, y lignocérico) como por debajo (ácidos mirístico y esteárico), de los del control cerca de la isolínea. Los ácidos mirístico, palmitoleico, araquídico, eicosenoico, behénico, y lignocérico son ácidos grasos secundarios, y cada uno comprende del 0,05-0,5% de ácidos grasos totales en la soja DP-305423-1; el ácido esteárico comprende menos del 4,5% en la soja DP-305423-1. Estos ácidos grasos son constituyentes habituales de los aceites vegetales y productos alimentarios habituales, y están presentes a unos niveles similares a los observados en la soja DP-305423-1 (USDA Nutrition Database, edición 19).

El ácido eicosadienoico (C20:2) resultó indetectable en la soja DP-305423-1. De modo similar, las variedades de soja de referencia también carecen de concentraciones mensurables de este ácido graso. Un nivel muy bajo de ácido eicosadienoico resultó detectable en la soja control cercana a la isolínea; sin embargo, esta diferencia con la soja DP-305423-1 no resultó estadísticamente significativa (valor P ajustado <0,05).

Tabla 16

Principales ácidos grasos en granos de soja					
Ácidos grasos (% del total)		Control (segregante nulo)	Soja 305423	Intervalo de tolerancia ¹	Intervalos de la bibliografía combinados ²
Ácido mirístico (C14:0)	Promedio ³	0,0742	0,0451	0-0,174	0,0710-0,238
	Intervalo ⁴	0,0676-0,0807	0,0419-0,0522		
	Valor P ajustado ⁵		0,0007 ⁷		
	Valor P ⁶		0,0001		

ES 2 582 552 T3

Principales ácidos grasos en granos de soja					
Ácidos grasos (% del total)		Control (segregante nulo)	Soja 305423	Intervalo de tolerancia ¹	Intervalos de la bibliografía combinados ²
Ácido palmítico (C16:0)	Promedio	10,3	6,28	2,93-19,6	7,00-15,8
	Intervalo	9,77-10,7	5,71-7,27		
	Valor P ajustado		0,0007 ⁷		
	Valor P		0,0001		
Ácido palmitoleico (C16:1)	Promedio	0,0860	0,0946	0,0110-0,177	0,0860 - 0,194
	Intervalo	0,0751-0,0948	0,0835-0,105		
	Valor P ajustado		0,0248 ⁷		
	Valor P		0,0053		
Ácido heptadecanoico (C17:0)	Promedio	0,113	0,798	0,0722-0,131	0,0850-0,146
	Intervalo	0,0993-0,127	0,703-0,890		
	Valor P ajustado		0,0007 ⁷		
	Valor P		0,0001		
Ácido heptadecenoico (C17:1)	Promedio	0,0614	1,19	0,0351-0,0732	0,0730-0,0870
	Intervalo	0,0513-0,0762	1,01-1,51		
	Valor P ajustado		0,0007 ⁷		
	Valor P		0,0001		
Ácido esteárico (C18:0)	Promedio	4,98	4,36	0,852-8,34	2,00-5,88
	Intervalo	4,36-5,89	3,90-5,01		
	Valor P ajustado		0,0007 ⁷		
	Valor P		0,0001		
Ácido oleico (C18:1)	Promedio	21,1	76,5	11,3-32,6	14,3-34,0
	Intervalo	18,0-24,1	68,7-79,4		
	Valor P ajustado		0,0007 ⁷		
	Valor P		0,0001		
Ácido linoleico (C18:2)	Promedio	52,5	3,62	41,7-64,3	42,3 - 60,0
	Intervalo	50,2-54,3	1,53-8,98		
	Valor P ajustado		0,0007 ⁷		
	Valor P		0,0001		
Ácido linoleico (C18:2), isómero (9,15)	Promedio	0,247	0,341	NA ⁸	NR ⁹
	Intervalo	0-0,532	0,143-0,456		
	Valor P ajustado		0,1787		
	Valor P		0,0699		

Principales ácidos grasos en granos de soja					
Ácidos grasos (% del total)		Control (segregante nulo)	Soja 305423	Intervalo de tolerancia ¹	Intervalos de la bibliografía combinados ²
Ácido linolénico (C18:3)	Promedio	9,35	5,39	1,15-14,7	2,00-12,5
	Intervalo	7,83-11,2	4,03-7,32		
	Valor P ajustado		0,0007 ⁷		
	Valor P		0,0001		
Ácido araquídico (C20:0)	Promedio	0,396	0,450	0,103-0,619	0-1,00
	Intervalo	0,348-0,479	0,393-0,528		
	Valor P ajustado		0,0007 ⁷		
	Valor P		0,0001		
Ácido eicosenoico (C20:1)	Promedio	0,170	0,347	0,0549-0,319	0,140-0,350
	Intervalo	0,135-0,201	0,290-0,394		
	Valor P ajustado		0,0007 ⁷		
	Valor P		0,0001		
Ácido eicosadienoico (C20:2)	Promedio	0,0225		NA ⁸	0,0770-0,245
	Intervalo	0-0,0502	0-0		
	Valor P ajustado		0,0928		
	Valor P		0,0298		
Ácido behénico (C22:0)	Promedio	0,414	0,427	0,188-0,458	0,277-0,595
	Intervalo	0,349-0,566	0,382-0,546		
	Valor P ajustado		0,5468		
	Valor P		0,3779		
Ácido lignocérico (C24:0)	Promedio	0,114	0,143	0-0,310	NR ⁹
	Intervalo	0,0845-0,139	0,115-0,173		
	Valor P ajustado		0,0017 ⁷		
	Valor P		0,0003		

¹ Los límites de tolerancia negativos se ajustaron a cero.

² Los intervalos de la bibliografía se han tomado de la bibliografía publicada para la soja (OECD, 2001; ILSI 2004).

³ Promedio de mínimos cuadrados.

⁴ El intervalo indica el valor individual menor y mayor a través de las localizaciones.

⁵ Valor P ajustado a la tasa de descubrimientos falsos (FDR).

⁶ Valor P no ajustado.

⁷ Diferencia estadísticamente significativa; valor P ajustado <0,05.

⁸ El análisis estadístico no está disponible (NA), debido a la falta de concentraciones mensurables detectadas para este analito.

⁹ Los intervalos del analito no se han indicado (NR) en las referencias de la bibliografía publicadas.

El artículo "el/la" se emplea en la presente para indicar uno o más de un (es decir, al menos un) objeto gramatical del artículo. Como ejemplo, "un elemento" significa uno o más elementos.

Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas del nivel de los expertos en la técnica a la cual pertenece esta invención.

Listado de Secuencias

- <110> E. I. du Pont de Nemours and Company
 - 5 <120> Acontecimiento de soja DP-305423-1 y composiciones y métodos para su identificación y/o detección
 - <130> BB1594USNA
 - <150> US 60/863721
 - <151> 31-10-2006
 - 10 <150> US 60/942676
 - <151> 08-06-2007
 - <160> 94
 - <170> PatentIn version 3.3
 - <210> 1
 - 15 <211> 2924
 - <212> ADN
 - <213> Artificial
 - <220>
 - <223> fragmentO PHP19340A
 - <400> 1
- | | | |
|----|---|------|
| | cgcgccaagc ttggatcctc gaagagaagg gttaataaca cactttttta acatttttaa | 60 |
| | cacaaatttt agttatttaa aaatttatta aaaaatttaa aataagaaga ggaactcttt | 120 |
| | aaataaatct aacttacaaa atttatgatt ttaataagt tttcaccaat aaaaaatgtc | 180 |
| | ataaaaatat gttaaaaagt atattatcaa tattctcttt atgataaata aaaagaaaaa | 240 |
| | aaaataaaa gttaagtgaa aatgagattg aagtgacttt aggtgtgtat aaatatatca | 300 |
| | accccgccaa caatttattt aatccaaata tattgaagta tattattcca tagcctttat | 360 |
| | ttatttatat atttattata taaaagcttt atttgttcta ggttgttcat gaaatatttt | 420 |
| | tttggtttta tctccgttgt aagaaaatca tgtgctttgt gtcgccactc actattgcag | 480 |
| | ctttttcatg cattggtcag attgacggtt gattgtattt ttgtttttta tggttttgtg | 540 |
| | ttatgactta agtcttcatc tctttatctc ttcacaggt ttgatggta cctaatatgg | 600 |
| | tccatgggta catgcatggt taaattaggt ggccaacttt gttgtgaacg atagaatttt | 660 |
| | tttttatatt aagtaaacta tttttatatt atgaaataat aataaaaaaa atattttatc | 720 |
| | attattaaca aaatcatatt agttaatttg ttaactctat aataaaagaa atactgtaac | 780 |
| | attcacatta catggtaaca tctttccacc ctttcatttg ttttttgttt gatgactttt | 840 |
| | tttcttgttt aaatttattt cccttctttt aaatttggaa tacattatca tcatatataa | 900 |
| | actaaaatac taaaaacagg attacacaaa tgataaataa taacacaaat atttataaat | 960 |
| | ctagctgcaa tatatttaa ctagctatat cgatattgta aaataaaact agctgcattg | 1020 |
| 20 | atactgataa aaaaatatca tgtgctttct ggactgatga tgcagtatac ttttgacatt | 1080 |

ES 2 582 552 T3

gccttt|at|tt t|at|ttttcag aaaagctttc ttagttctgg gttcttd|att atttg|ttcc 1140
catctccatt gtgaattgaa tcatttgctt cgtgtcacia atacatttag ctaggtacat 1200
gcattggtca gattcacggt ttattatgtc atgacttaag ttcattggtag tacattacct 1260
gccacgcatg cattatattg gttagatttg ataggcaaat ttggttg|tca acaatataaa 1320
tataaataat gtttttatat tacgaaataa cagtgatcaa aacaaacagt tttatcttta 1380
ttaacaagat tttg|ttttg tttgatgacg ttttttaatg tttacgcttt ccc|cttctt 1440
ttgaatttag aacactttat catcataaaa tcaaatacta aaaaaattac atatttcata 1500
aataataaca caaatat|ttt taaaaaatct gaaataataa tgaacaatat tacatattat 1560
cacgaaaatt cattaataaa aatattatat aaataaaatg taatagtagt tatatgtagg 1620
aaaaaagtac tgcacgcata atatatacaa aaagattaaa atgaactatt ataaataata 1680
acactaaatt aatggtgaat catatcaaaa taatgaaaaa gtaaataaaa tttgtaatta 1740
acttctatat gtattacaca cacaaataat aaataatagt aaaaaaatt atgataaata 1800
tttaccatct cataaagata tttaaaataa tgataaaaat atagattatt ttttatgcaa 1860
ctagctagcc aaaaagagaa cacgggtata tataaaaaga gtacctttaa attctactgt 1920
acttcttta ttcttgacgt ttttatatca agtggacata cgtgaagatt ttaattatca 1980
gtctaaatat ttcattagca c|ttaatactt ttctgtttta ttctatcct ataagtagtc 2040
ccgattctcc caacattgct tattcacaca actaactaag aaagtcttcc atagcccccc 2100
aagcggccgc tgagtgattg ctcacgagtg tggtcaccat gccttcagca agtaccaatg 2160
ggttgatgat gttgtgggtt tgacccttca ctcaacactt ttagtccctt atttctcatg 2220
gaaaataagc catcgccgcc atcactcaa cacaggttcc cttgaccgtg atgaagtgtt 2280
tgtcccaaaa ccaaaatcca aagttgcatg gttttccaag tacttaaca accctctagg 2340
aagggtgtt tctcttctcg tcacactcac aatagggtgg cctatgtatt tagccttcaa 2400
tgtctctggt agaccctatg atagttttgc aagccactac cacccttatg ctcccatata 2460
ttctaaccgt gagaggcttc tgatctatgt ctctgatggt gctttg|ttt ctgtgactta 2520
ctctctctac cgtgttgcaa ccctgaaagg gttggtttg|g ctgctatgtg tttatgggg|t 2580
gcctttgctc attgtgaacg gttttctt|gt gactatcaca t|ttttgcagc acacacactt 2640
tgccttg|cct cattacgatt catcagaatg ggactggctg aagg|gagctt tggcaactat 2700
ggacagagat aagcggccgc gacacaagtg tgagagtact aaataaatgc tttggttgta 2760
cgaaatcatt aactaaata aaataatcaa agcttatata tgccttccgc taaggccgaa 2820
tgcaaagaaa ttggttcttt ctogttatct tttgccactt ttactagtac gtattaatta 2880
ctacttaatc atctttg|ttt acggctcatt atatccgtcg acgg 2924

ES 2 582 552 T3

<211> 4512
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 5 <223> Fragmento PHP17752A

<400> 2
 cgcgccaagc ttggatcccc cctcgaggtc gacggtatcg ataagcttct gcaggaattc 60
 tgagctagcg aagttcctat tccgaagttc ctattcttca aaaagtatag gaacttcaga 120
 cgtcctcgag tccgtcctgt agaaacccca acccgtgaaa tcaaaaaact cgacggcctg 180
 tgggcattca gtctggatcg cgaaaactgt ggaattgatc cagaattcgc tagcgaagtt 240
 cctattccga agttcctatt ctctagaaag tataggaact tcagatccag aattcgggtcc 300
 gggccatcgt ggcctcttgc tcttcaggat gaagagctat gtttcgcgcc aagcttggat 360
 cctagaacta gaaacgtgat gccacttggt attgaagtgc attacagcat ctattctggt 420
 ttactattta taactttgcc atttctgact tttgaaaact atctctggat ttcggtatcg 480
 ctttgtgaag atcgagcaaa agagacgttt tgtggacgca atggtccaaa tccgttctac 540
 atgaacaaat tggtcacaat ttccactaaa agtaaataaa tggcaagtta aaaaaggaat 600
 atgcatttta ctgattgcct aggtgagctc caagagaagt tgaatctaca cgtctaccaa 660
 ccgctaaaaa aagaaaaaca ttgaatatgt aacctgattc cattagcttt tgacttcttc 720
 aacagattct ctacttagat ttctaacaga aatattatta ctagcacatc attttcagtc 780
 tcactacagc aaaaaatcca acggcacaat acagacaaca ggagatatca gactacagag 840
 atagatagat gctactgcat gtagtaagtt aaataaaagg aaaataaaat gtcttgctac 900
 caaaactact acagactatg atgctacca caggccaaat cctgcaacta ggacagcatt 960
 atcttatata tattgtacaa aacaagcatc aaggaacatt tgggtctaggc aatcagttacc 1020
 tcgttctacc atcacctca gttatcacat ccttgaagga tccattactg ggaatcatcg 1080
 gcaacacatg ctctgatgg ggcacaatga catcaagaag gtaggggcca ggggtgtcca 1140
 acattctctg aattgcoget ctaagctctt ccttctctgt cactcgcgct gccggtatcc 1200
 cacaagcatc agcaaacttg agcatgtttg ggaatatctc gctctcgcta gacggatctc 1260
 caagataggt gtgagctcta ttggacttgt agaacctatc ctccaactga accaccatac 1320
 ccaaagctg attgttcaac aacaatatct taactgggag attctccact cttatagtgg 1380
 ccaactcctg aacattcatg atgaaactac catccccatc aatgtcaacc acaacagccc 1440
 cagggttagc aacagcagca ccaatagccg caggcaatcc aaaacccatg gctccaagac 1500
 cccctgaggt caaccactgc ctcggtctct tgtacttgta aaactgcgca gccacattt 1560
 gatgctgccc aaccocagta ctaacaatag catctccatt agtcaactca tcaagaacct 1620

ES 2 582 552 T3

cgatagcatg	ctgCGGagaa	atCGcgtcct	ggaatgtctt	gtaaccaat	ggaaacttgt	1680
gtttctgcac	attaatctct	tctctccaac	ctccaagatc	aaacttacce	tccactcctt	1740
tctcctccaa	aatcatatta	attcccttca	aggccaactt	caaatccgcg	caaaccgaca	1800
cgtgCGcctg	cttgttcttc	ccaatctcgg	cagaatcaat	atcaatgtga	acaatcttag	1860
ccctactagc	aaaagcctca	agcttcccag	taacacggtc	atcaaacctt	accccaaagg	1920
caagcaacaa	atcactattg	tcaacagcat	agttagcata	aacagtacca	tgcatacca	1980
gcatctgaag	ggaatattca	tcaccaatag	gaaaagttcc	aagaccatt	aaagtgctag	2040
caacgggaat	accagtgagt	tcaacaaagc	gcctcaattc	agcactggaa	ttcaaactgc	2100
caccGCCgac	gtagagaacg	ggcttttggg	cctccatgat	gagtctgaca	atgtgttcca	2160
attgggcctc	ggcggggggc	ctgggcagcc	tggcgaggta	accggggagg	ttaacgggct	2220
CGtcccaatt	aggcacggcg	agttgctgct	gaacgtcttt	gggaatgtcg	atgaggaccg	2280
gaccggggcg	gccggagggtg	gcgacgaaga	aagcctcggc	gacgacgCGg	gggatgtcgt	2340
cgacgtcgag	gatgaggtag	ttgtgcttcg	tgatggatct	gctcacctcc	acgatcgggg	2400
tttcttgaa	ggcgtcgggtg	ccgatcatcc	ggcgggcgac	ctggccgggtg	atggcgacga	2460
ctgggacgct	gtccattaaa	gcgtcggcga	ggccgctcac	gaggttgggtg	gcgccggggc	2520
cggaggtggc	aatgcagacg	ccggggaggc	cggaggaacg	cgcgtagcct	tcggcggcga	2580
agacGCCgcc	ctgctcgtgg	cgcgggagca	cgttgcggat	ggcggcggag	cgcgtgagcg	2640
cctggtggat	ctccatcgac	gcaccgccgg	ggtacgcgaa	caccgtcgtc	acgccctgcc	2700
tctccagcgc	ctccacaagg	atgtccgcgc	ccttgcgagg	ttcgccggag	gcgaaccgtg	2760
acacgaaggg	ctccgtggtc	ggcgttctct	tggtgaaggg	cgccgccgtg	gggggtttgg	2820
agatggaaca	tttgattttg	agagcgtggt	tgggtttggt	gagggtttga	tgagagagag	2880
ggagggtgga	tctagtaatg	cgtttgggga	aggtgggggtg	tgaagaggaa	gaagagaatc	2940
gggtggttct	ggaagcgggtg	gccgccattg	tgttgtgtgg	catggttata	cttcaaaaac	3000
tgcaacaaca	gcctagagtt	agtacctaaa	cagtaaattt	acaacagaga	gcaaagacac	3060
atgcaaaaat	ttcagccata	aaaaaagtta	taatagaatt	taaagcaaaa	gtttcatttt	3120
ttaaacatat	atacaacaa	actggatttg	aaggaaggga	ttaattcccc	tgctcaaagt	3180
ttgaattcct	attgtgacct	atactcgaat	aaaattgaag	cctaaggaat	gtatgagaaa	3240
caagaaaaca	aaacaaaact	acagacaaac	aagtacaatt	acaaaattcg	ctaaaattct	3300
gtaatcacca	aaccccatct	cagtcagcac	aaggcccaag	gtttattttg	aaataaaaaa	3360
aaagtgattt	tatttctcat	aagctaaaag	aaagaaaggc	aattatgaaa	tgatttcgac	3420
tagatctgaa	agtcaaacgc	gtattccgca	gatattaaag	aaagagtaga	gtttcacatg	3480

ES 2 582 552 T3

gatcctagat ggacccagtt gaggaaaaag caaggcaaag caaaccagaa gtgcaagatc 3540
 cgaaattgaa ccacggaatc taggatttgg tagagggaga agaaaagtac cttgagaggt 3600
 agaagagaag agaagagcag agagatatat gaacgagtgt gtcttggctc caactctgaa 3660
 gcgatacgag tttagagggg agcattgagt tccaatttat agggaaaccg ggtggcaggg 3720
 gtgagttaat gacggaaaag cccctaagta acgagattgg attgtgggtt agattcaacc 3780
 gtttgcattc gcggcttaga ttggggaagt cagagtgaat ctcaaccgtt gactgagttg 3840
 aaaattgaat gtagcaacca attgagccaa cccagcctt tgcctttga ttttgatttg 3900
 tttgttgcatt actttttatt tgtcttctgg ttctgactct ctttctctcg tttcaatgcc 3960
 aggttgctta ctcccacacc actcacaaga agattctact gttagtatta aatatttttt 4020
 aatgtattaa atgatgaatg cttttgtaaa cagaacaaga ctatgtctaa taagtgtctt 4080
 gcaacatttt ttaagaaatt aaaaaaata tatttattat caaaatcaaa tgtatgaaaa 4140
 atcatgaata atataatttt atacattttt ttaaaaaatc ttttaatttc ttaattaata 4200
 tcttaaaaat aatgattaat atttaacca aaataattag tatgattggg aaggaagata 4260
 tccatgttat gtttggatgt gagtttgatc tagagcaaag cttactagag tcgaccgatc 4320
 cgtcgacggc gcgcgccct ctagttgaag acacgttcat gtcttcatcg taagaagaca 4380
 ctcagtagtc ttcggccaga atggcccga ccgaagcttc tgcaggaatt ctgagctagc 4440
 gaagttccta ttccgaagtt cctattctct agaaagtata ggaacttcag atccactagg 4500
 atccgtcgac gg 4512

<210> 3
 <211> 5438
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Vector de expresión PHP19340

<400> 3
 ggccgcgaca caagtgtgag agtactaaat aatgctttg gttgtacgaa atcattacac 60
 taaataaaat aatcaaagct tatatatgcc ttccgctaag gccgaatgca aagaaattgg 120
 ttctttctcg ttatcttttg ccacttttac tagtacgtat taattactac ttaatcatct 180
 ttgtttacgg ctattatat ccgtcgacgg cgcgcccgat catccggata tagttcctcc 240
 tttcagcaaa aaaccctca agaccctgtt agaggcccca aggggttatg ctagttattg 300
 ctcagcgggtg gcagcagcca actcagcttc ctttcgggct ttgttagcag ccggatcgat 360
 ccaagctgta cctcactatt cctttgccct cggacgagtg ctggggcgtc ggtttccact 420
 atcggcgagt acttctacac agccatcggg ccagacggcc gcgcttctgc gggcgatttg 480
 tgtacgcccg acagtcccgg ctccggatcg gacgattgag tcgcatcgac cctgcgcccc 540

ES 2 582 552 T3

agctgcatca tcgaaattgc cgtcaaccaa gctctgatag agttgggtcaa gaccaatgcg 600
 gagcatatac gcccggagcc gcggcgatcc tgcaagctcc ggatgcctcc gctcgaagta 660
 gcgcgtctgc tgctccatac aagccaacca cggcctccag aagaagatgt tggcgacctc 720
 gtattgggaa tccccgaaca tcgcctcgct ccagtcaatg accgctgtta tgcggccatt 780
 gtccgtcagg acattgttg agccgaaatc cgcgtgcacg aggtgccgga cttcggggca 840
 gtcctcggcc caaagcatca gctcatcgag agcctgcgcg acggacgcac tgacgggtgc 900
 gtccatcaca gtttgccagt gatacacatg gggatcagca atcgcgcata tgaaatcacg 960
 ccatgtagtg tattgaccga ttccttgccg tccgaatggg ccgaaccgcg tcgtctggct 1020
 aagatcggcc gcagcgatcg catccatagc ctccgcgacc ggctgcagaa cagcgggcag 1080
 ttcggtttca ggcaggctctt gcaacgtgac accctgtgca cggcgggaga tgcaataggt 1140
 caggctctcg ctgaattccc caatgtcaag cacttccgga atcgggagcg cggccgatgc 1200
 aaagtgccga taaacataac gatctttgta gaaaccatcg gcgcagctat ttaccgcgag 1260
 gacatatcca cgcctccta catcgaagct gaaagcacga gattcttcgc cctccgagag 1320
 ctgcatcagg tcggagacgc tgtcgaactt ttcgatcaga aacttctcga cagacgtcgc 1380
 ggtgagttca ggtttttcca tgggtatatac tccttcttaa agttaaacia aattatttct 1440
 agagggaaac cgttgtggtc tccctatagt gagtcgtatt aatttcgcg gatcagagatc 1500
 tgatcaacct gcattaatga atcggccaac gcgcggggag aggcgggttg cgtattgggc 1560
 gctcttccgc ttcctcgtc actgactcgc tgcgctcggg cgttcggctg cggcgagcgg 1620
 tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggg tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa 1680
 agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc gcggttctgg 1740
 cgtttttcca taggctccgc ccccctgacg agcatcacia aaatcgacgc tcaagtcaga 1800
 ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcgtt tccccctgga agctccctcg 1860
 tgcgctctcc tgttccgacc ctgcgctta ccggatacct gtcgccttt ctccctcgg 1920
 gaagcgtggc gctttctcaa tgctcacgct gtaggtatct cagttcgggtg taggtcgttc 1980
 gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg 2040
 gtaactatcg tcttgagtcc aaccggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca 2100
 ctggtaacag gattagcaga gcgaggatg taggcgggtgc tacagagttc ttgaagtgg 2160
 ggcctaacta cggctacact agaagaacag tatttggat ctgcgctctg ctgaagccag 2220
 ttacctcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg 2280
 gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc 2340
 ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaaacga aaactcacgt taagggattt 2400

ES 2 582 552 T3

tggatcatgac attaacctat aaaaataggc gtatcacgag gccctttcgt ctgcgcggtt 2460
 tccgtgatga cggtgaaaac ctctgacaca tgcagctccc ggagacggtc acagcttgtc 2520
 tgtaagcggga tgccgggagc agacaagccc gtcagggcgc gtcagcgggt gttggcgggt 2580
 gtcggggctg gcttaactat gcggcatcag agcagattgt actgagagtg caccatattg 2640
 acatattgtc gttagaacgc ggctacaatt aatacataac cttatgtatc atacacatac 2700
 gatttaggtg aactataga acggcgcgcc aagcttgat cctcgaagag aagggttaat 2760
 aacacacttt tttaacattt ttaacacaaa ttttagttat ttaaaaattt attaaaaaat 2820
 ttaaaaataag aagaggaact ctttaaataa atctaactta caaaatttat gatttttaat 2880
 aagttttcac caataaaaaa tgcataaaa atatgttaa aagtatatta tcaatattct 2940
 ctttatgata aataaaaaga aaaaaaaaaat aaaagttaag tgaaaatgag attgaagtga 3000
 ctttaggtgt gtataaatat atcaaccccg ccaacaattt atttaacca aatatattga 3060
 agtatattat tccatagcct ttatttattt atatatttat tatataaaag ctttatttgt 3120
 tctaggttgt tcatgaaata tttttttggt tttatctccg ttgtaagaaa atcatgtgct 3180
 ttgtgtcgcc actcactatt gcagcttttt catgcattgg tcagattgac ggttgattgt 3240
 atttttgttt tttatggttt tgtgttatga ctttaagtct catctcttta tctcttcac 3300
 aggtttgatg gttacctaata atggtccatg ggtacatgca tggttaaatt aggtggccaa 3360
 ctttgttgtg aacgatagaa ttttttttta tattaagtaa actattttta tattatgaaa 3420
 taataataaa aaaaatattt tatcattatt aacaaaatca tattagttaa tttgttaact 3480
 ctataataaa agaaactg taacattcac attacatggt aacatcttc caccctttca 3540
 tttgtttttt gtttgatgac tttttttctt gtttaaattt atttcccttc ttttaaattt 3600
 ggaatacatt atcatcatat ataaactaaa atactaaaaa caggattaca caaatgataa 3660
 ataataacac aaatatttat aaatctagct gcaatatatt taaactagct atatcgatat 3720
 tgtaaaaataa aactagctgc attgatactg ataaaaaat atcatgtgct ttctggactg 3780
 atgatgcagt atacttttga cattgccttt attttatttt tcagaaaagc tttcttagtt 3840
 ctgggttctt cattatttgt ttcccatctc cattgtgaat tgaatcattt gcttcgtgtc 3900
 acaaatacat ttagctaggt acatgcattg gtcagattca cggtttatta tgtcatgact 3960
 taagttcatg gtagtacatt acctgccacg catgcattat attggttaga tttgataggc 4020
 aaatttggtt gtcaacaata taaatataaa taatgttttt atattacgaa ataacagtga 4080
 tcaaaacaaa cagttttatc tttattaaca agattttggt tttggttgat gacgtttttt 4140
 aatgtttacg ctttccccct tcttttgaat ttagaacact ttatcatcat aaaatcaaat 4200
 actaaaaaaa ttacatattt cataaataat aacacaaata tttttaaaaa atctgaaata 4260
 ataataaaca atattacata ttatcacgaa aattcattaa taaaaatatt atataataa 4320

ES 2 582 552 T3

aatgtaatag tagttatatg taggaaaaaa|gtactgcacg cataatatat aaaaaaagat 4380
 taaaatgaac tattataaat aataacacta aattaatggt gaatcatatc aaaataatga 4440
 aaaagtaaat aaaatttgta attaacttct atatgtatta cacacacaaa taataataa 4500
 tagtaaaaaa aattatgata aatatttacc atctcataaa gatatttaa ataatgataa 4560
 aatatatagat tattttttat gcaactagct agccaaaaag agaacacggg tatatataa 4620
 aagagtacct ttaaattcta ctgtacttcc tttattcctg acgtttttat atcaagtga 4680
 catacgtgaa gattttaatt atcagtctaa atatttcatt agcacttaat acttttctgt 4740
 tttattccta tcctataagt agtcccgatt ctccaacat tgcttattca cacaactaac 4800
 taagaaagtc ttccatagcc cccaagcgg ccgctgagtg attgctcacg agtgtggtca 4860
 ccatgccttc agcaagtacc aatgggttga tgatgttggt ggtttgacc ttcactcaac 4920
 acttttagtc ccttatttct catggaaaat aagccatcgc cgccatcact ccaacacagg 4980
 ttcccttgac cgtgatgaag tgtttgtccc aaaacaaaa tccaaagttg catggttttc 5040
 caagtactta aacaaccctc taggaagggc tgtttctctt ctgctcacac tcacaatagg 5100
 gtggcctatg tatttagcct tcaatgtctc tggtagacc tatgatagtt ttgcaagcca 5160
 ctaccacct tatgctcca tatattctaa ccgtgagagg cttctgatct atgtctctga 5220
 tgttgctttg ttttctgtga cttactctct ctaccgtgtt gcaaccctga aagggttggt 5280
 ttggctgcta tgtgtttatg ggggtgcctt gctcattgtg aacggttttc ttgtgactat 5340
 cacatatttg cagcacacac actttgcctt gcctcattac gattcatcag aatgggactg 5400
 gctgaagggg gctttggcaa ctatggacag agataagc 5438

<210> 4
 <211> 7026
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Vector de expresión PHP17752

<400> 4
 gatccgtcga cggcgcgcc gatcatccgg atatagttcc tcctttcagc aaaaaacccc 60
 tcaagacccg tttagaggcc ccaaggggtt atgctagtta ttgctcagcg gtggcagcag 120
 ccaactcagc ttcctttcgg gctttgtag cagccggatc gatccaagct gtacctcact 180
 attcctttgc cctcggacga gtgctggggc gtgggtttcc actatcggcg agtacttcta 240
 cacagccatc ggtccagacg gccgcgcttc tgccggcgat ttgtgtacgc ccgacagtcc 300
 cggctccgga tcggacgatt gcgtcgcac gaccctgcgc ccaagctgca tcatcgaaat 360
 tgccgtcaac caagctctga tagagttggt caagaccaat gcggagcata tacgcccgga 420

ES 2 582 552 T3

gccgcggcga tccctgcaagc tccggatgcc tccgctcgaa gtagcgcgtc tgctgctcca 480
 tacaagccaa ccacggcctc cagaagaaga tgttggcgac ctcgatttgg gaatccccga 540
 acatcgcctc gctccagtca atgaccgctg ttatgcggcc attgtccgtc aggacattgt 600
 tggagccgaa atccgcgtgc acgaggtgcc ggacttcggg gcagtcctcg gccc aaagca 660
 tcagctcatc gagagcctgc gcgacggacg cactgacggt gtcgtccatc acagtttgcc 720
 agtgatacac atggggatca gcaatcgcgc atatgaaatc acgccatgta gtgtattgac 780
 cgattccttg cggtcogaat gggccgaacc cgctcgtctg gctaagatcg gccgcagcga 840
 tcgcatccat agcctccgcg accggctgca gaacagcggg cagttcggtt tcaggcaggt 900
 cttgcaacgt gacaccctgt gcacggcggg agatgcaata ggtcaggctc tcgctgaatt 960
 ccccaatgtc aagcacttcc ggaatcggga gcgcggccga tgcaaagtgc cgataaacat 1020
 aacgatcttt gtagaacca tcggcgcagc tatttaccog caggacatat ccacgccctc 1080
 ctacatcgaa gctgaaagca cgagattctt cgcctccga gagctgcatc aggtcggaga 1140
 cgctgtcgaa cttttcgatc agaaacttct cgacagacgt cgcggtgagt tcaggctttt 1200
 ccatgggtat atctccttct taaagttaa caaaattatt tctagagga aaccgttgtg 1260
 gtctccctat agtgagtcgt attaatttcg cgggatcgag atctgatcaa cctgcattaa 1320
 tgaatcggcc aacgcgcggg gagagggcgt ttgcgtattg ggcgctcttc cgcttcctcg 1380
 ctactgact cgctgcgctc ggtcgttcgg ctgcggcgag cggtatcagc tcaactaaa 1440
 gcggtaatac ggttatccac agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa 1500
 ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc 1560
 cgccccctg acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaaccggaca 1620
 ggactataaa gataccaggc gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tccctgttccg 1680
 accctgccgc ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct 1740
 caatgctcac gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgctccaa gctgggctgt 1800
 gtgcacgaac ccccgttca gcccgaccgc tgcgccttat ccggtacta tcgctttgag 1860
 tccaaccggg taagacacga cttatcgcca ctggcagcag ccaactggtaa caggattagc 1920
 agagcggagg atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac 1980
 actagaagga cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga 2040
 gttggtagct cttgatccgg caaacaaacc accgctggta gcggtggttt ttttgtttgc 2100
 aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg 2160
 gggctctgacg ctcaagtggaa cgaaaactca cgttaagggga ttttgggtcat gacattaacc 2220
 tataaaaata ggcgtatcac gaggcctttt cgtctcgcgc gtttcgggtga tgacggtgaa 2280
 aacctctgac acatgcagct cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc ggatgccggg 2340

ES 2 582 552 T3

agcagacaag cccgtcaggg cgcgtcagcg ggtggtggcg ggtgtcgggg ctggcttaac 2400
 tatgcggcat cagagcagat tgtactgaga gtgcaccata tggacatatt gtcgtagaa 2460
 cgcggctaca attaatacat aaccttatgt atcatacaca tacgatttag gtgacactat 2520
 agaacggcgc gccaaagcttg gatccccct cgaggtcgac ggtatcgata agcttctgca 2580
 ggaattctga gctagcgaag ttcctattcc gaagttccta ttcttcaaaa agtataggaa 2640
 cttcagacgt cctcgagtcc gtctgtaga aacccaacc cgtgaaatca aaaaactcga 2700
 cggcctgtgg gcattcagtc tggatcgca aaactgtgga attgatccag aattcgtag 2760
 cgaagttcct attccgaagt tcctattctc tagaaagtat aggaacttca gatccagaat 2820
 tcggtccggg ccatcgtggc ctcttgctct tcaggatgaa gagctatggt tcgcgccaag 2880
 cttggatcct agaactagaa acgtgatgcc acttggtatt gaagtcgatt acagcatcta 2940
 ttctgtttta ctatttataa ctttgccatt tctgactttt gaaaactatc tctggatttc 3000
 ggtatcgctt tgtgaagatc gagcaaaaaga gacgttttgt ggacgcaatg gtccaaatcc 3060
 gttctacatg aacaaattgg tcacaatttc cactaaaagt aaataaatgg caagttaaaa 3120
 aaggaatatg cattttactg attgcctagg tgagctccaa gagaagttga atctacacgt 3180
 ctaccaaccg ctaaaaaaag aaaaacattg aatatgtaac ctgattccat tagcttttga 3240
 cttcttcaac agattctcta cttagatttc taacagaaat attattacta gcacatcatt 3300
 ttcagtctca ctacagcaa aaatccaacg gcacaataca gacaacagga gatatcagac 3360
 tacagagata gatagatgct actgcatgta gtaagttaaa taaaaggaaa ataaaatgct 3420
 ttgctaccaa aactactaca gactatgatg ctcaccacag gccaaatcct gcaactagga 3480
 cagcattatc ttatatatat tgtacaaaac aagcatcaag gaacatttgg tctaggcaat 3540
 cagtacctcg ttctaccatc accctcagtt atcacatcct tgaaggatcc attactggga 3600
 atcatcggca acacatgctc ctgatggggc acaatgacat caagaaggta ggggccaggg 3660
 gtgtccaaca ttctctgaat tgccgcteta agctcttctt tcttcgtcac tcgctgctcc 3720
 ggtatcccac aagcatcagc aaacttgagc atgtttggga atatctcgtc ctgctagac 3780
 ggatctccaa gataggtgtg agctctattg gacttgtaga acctatctc caactgaacc 3840
 accataccca aatgctgatt gttcaacaac aatatcttaa ctgggagatt ctccactctt 3900
 atagtggcca actcctgaac attcatgatg aaactacat ccccatcaat gtcaaccaca 3960
 acagccccag ggtagcaac agcagacca atagccgcag gcaatccaaa acccatggct 4020
 ccaagacccc ctgaggtcaa ccactgcctc ggtctcttct acttgtaaaa ctgctgagcc 4080
 cacatttgat gctgccaac ccagtacta acaatagcat ctccattagt caactcatca 4140
 agaacctoga tagcatgctg cggagaaatc gcgtcctgga atgtcttgta acccaatgga 4200

ES 2 582 552 T3

aacttggtgtt	tctgcacatt	aatctcttct	ctccaacctc	caagatcaaa	cttaccctcc	4260
actcctttct	cctccaaaat	catattaatt	cccttcaagg	ccaacttcaa	atccgcgcaa	4320
accgacacgt	gcgctgctt	gttcttccca	atctcggcag	aatcaatata	aatgtgaaca	4380
atcttagccc	tactagcaaa	agcctcaagc	ttcccagtaa	cacggtcatc	aaaccttacc	4440
ccaaaggcaa	gcaacaaatc	actattgtca	acagcatagt	tagcataaac	agtaccatgc	4500
ataccagca	tctgaagga	atattcatca	ccaataggaa	aagttccaag	accattaaa	4560
gtgctagcaa	cggaataacc	agtgagttca	acaaagcgcc	tcaattcagc	actggaattc	4620
aaactgccac	cgccgacgta	gagaacgggc	ttttgggcct	ccatgatgag	tctgacaatg	4680
tgttccaatt	gggcctcggc	ggggggcctg	ggcagcctgg	cgaggtaacc	ggggaggtta	4740
acgggctcgt	cccaattagg	cacggcgagt	tgctgctgaa	cgtctttggg	aatgtcgatg	4800
aggaccggac	cgggcgggcc	ggaggtggcg	acgaagaaag	cctcggcgac	gacgcggggg	4860
atgtcgtcga	cgtcgaggat	gaggtagttg	tgcttcgtga	tggatctgct	cacctccacg	4920
atcggggttt	cttggaaaggc	gtcggtgccg	atcatccggc	gggcgacctg	gccggtgatg	4980
gcgacgactg	ggacgctgtc	cattaaagcg	tcggcgaggc	cgctcacgag	gttggtggcg	5040
ccggggcccg	aggtggcaat	gcagacgccg	gggaggccgg	aggaacgcgc	gtagccttcg	5100
gcggcgaaga	cgccgccctg	ctcgtggcgc	gggagcacgt	tgcggatggc	ggcggagcgc	5160
gtgagcgcct	ggtggatctc	catcgacgca	ccgcgggggt	acgcgaacac	cgtcgtcacg	5220
ccctgcctct	ccagcgcctc	cacaaggatg	tccgcgccct	tgcgaggttc	gccggaggcg	5280
aaccgtgaca	cgaagggctc	cgtggtcggc	gcttccttgg	tgaagggcgc	cgccgtgggg	5340
ggtttggaga	tggaacattt	gattttgaga	gcgtggttgg	gtttggtgag	ggtttgatga	5400
gagagagga	gggtggatct	agtaatgcgt	ttggggaagg	tggggtgtga	agaggaagaa	5460
gagaatcggg	tggttctgga	agcggtgccc	gccattgtgt	tgtgtggcat	ggttatactt	5520
caaaaactgc	acaacaagcc	tagagttagt	acctaaacag	taaatttaca	acagagagca	5580
aagacacatg	caaaaatttc	agccataaaa	aaagttataa	tagaatttaa	agcaaaagtt	5640
tcatttttta	aacatatata	caaacaaact	ggatttgaag	gaagggatta	attcccctgc	5700
tcaaagtttg	aattcctatt	gtgacctata	ctcgaataaa	attgaagcct	aaggaatgta	5760
tgagaaacaa	gaaaacaaaa	caaaactaca	gacaaacaag	tacaattaca	aaattcgcta	5820
aaattctgta	atcaccaaac	cccatctcag	tcagcacaag	gcccagggtt	tattttgaaa	5880
taaaaaaaa	gtgattttat	ttctcataag	ctaaaagaaa	gaaaggcaat	tatgaaatga	5940
tttcgactag	atctgaaagt	caaacgcgta	ttccgcagat	attaaagaaa	gagtagagtt	6000
tcacatggat	cctagatgga	cccagttgag	gaaaaagcaa	ggcaaagcaa	accagaagtg	6060
caagatccga	aattgaacca	cggaatctag	gatttggtag	agggagaaga	aaagtacctt	6120

ES 2 582 552 T3

gagaggtaga agagaagaga agagcagaga gatatatgaa cgagtgtgtc ttggtctcaa 6180
ctctgaagcg atacgagttt agaggggagc attgagttcc aatttatagg gaaaccgggt 6240
ggcaggggtg agttaatgac ggaaaagccc ctaagtaacg agattggatt gtgggttaga 6300
ttcaaccggt tgcacccgcg gcttagattg gggaaagtcag agtgaatctc aaccggtgac 6360
tgagttgaaa attgaatgta gcaaccaatt gagccaaccc cagcctttgc cctttgattt 6420
tgatttgttt gttgcatact ttttatttgt cttctggttc tgactctctt tctctcgttt 6480
caatgccagg ttgcctactc ccacaccact cacaagaaga ttctactggt agtattaat 6540
atTTTTtaat gtattaatg atgaatgctt ttgtaaacag aacaagacta tgtctaataa 6600
gtgtcttgca acattTTTTa agaaattaa aaaaatatat ttattatcaa aatcaaagt 6660
atgaaaaatc atgaataata taattttata cattTTTTta aaaaatcttt taatttctta 6720
attaatatct taaaaataat gattaatatt taacccaaaa taattagtat gattggaag 6780
gaagatatcc atgttatggt tggatgtgag tttgatctag agcaaagctt actagagtcg 6840
accgatccgt cgacggcgcg cgcgcctcta gttgaagaca cgttcatgtc ttcacgtaa 6900
gaagacactc agtagtcttc ggccagaatg gcccggaccg aagcttctgc aggaattctg 6960
agctagcgaa gttcctattc cgaagttcct attctctaga aagtatagga acttcagatc 7020
cactag 7026

- <210> 5
- <211> 39499
- <212> ADN
- <213> Artificial

5

- <220>
- <223> Cántigo-1

<400> 5
tccccaaaaca agcttgcaag tatttgtggt ggtacctgtc tgctgccttt tatttctctt 60
acttttgttt ctattgattc ttttatttag tctaacttta agtttagtta gtgaacttac 120
ttttgttttt attggttctt ttaatttagt ccaactttaa ctttaattat tgattagtga 180
tgctcacacg gagtttggtc ttttcgtttt accacatata cttccacgta acaactttca 240
cttttcacat tgcagttttc gtcctttcac atctaaattt tgaaattcta gttaatatta 300
attaagcctc tgtgatcgac agaaaagaga atcactaatc attgtacatg gtttgagacc 360
atgagtttat aaactaattt tgaggaaatt ttttcatcat tgtacatggt ttgtgacat 420
gagttcaacc ctacctttac gtttaactac atgaccacat gagcgaactc gtaaattatt 480
atattttatt ttattatcat catgcactac atgaaaaaag agaattaacg ggagttttat 540
tttttaacgt tttattggtg atataataat atacatatca actagttaa ttagtttta 600

ES 2 582 552 T3

aattattagt ttctt[|]aaaag gattttaaaa ttgtgacttt ataaaatcgg taacaataaa 660
tcagtcattc ttgaca[|]aatat gacacaatta ttacaatgac aattttataa aattatgatt 720
gaat[|]ttt[|]gtg taccagctaa aacatttaac ctttatttcg tttagtaaac aataat[|]ttta 780
tatgtgcttt acataaaaaga ataaaaaaat aatttaattt gatgtattta gttacattga 840
tttcactagt tgtaagagtt caagtaataa aaattgcata tcttatccct tgaagtgaga 900
aataaaaagt aaaaaaaatt ctgagtgatt ctaaaagaaa tgatttttta aatcatg[|]tta 960
atgaataaga taatacaaac aaaaataaaa acaaaaacgt aatattataa aaaatgtcat 1020
atgaacatta ttattt[|]aaaa cgcacaaata atgtctcaat ggagttgagt tggagggatt 1080
gtctcttctt tatatttctc ttattgtgat gtagagggag tgtgctcttt cttctacttc 1140
ttttatatga tgcaatgtcc atgtgaaagc ttgaatgttc ataagtttta ttataagttt 1200
tatgtttctt tcttctccag ctaaacaacc catgttcaca gtactcttac caattttacc 1260
taatatttag gtactgaaca taactt[|]acat taagctcctg ctattttact attgcttttc 1320
attaaaataa tttaagagaa atcatagtaa attttaacaa gtgaaaatat ttatatg[|]tta 1380
tgaaccaatt aataattata ataaatataa tctttaagat aagttttaat tatagttttg 1440
atccctaatt aatatt[|]taat tttt[|]gtattt aattttataa taaatatttc ttttaogact 1500
ttagagtc[|]at taaaaaaatt attataactt taaagttgta tttaaaaaaa tgaaaaaaa 1560
tataaaagtt ataatttttt tcacgatttt agtgtaaaaa aacatgttac aaccttttag 1620
aatattaatt taaattttat cctcatattg taaatttgac aaaaaattc ttgattgg[|]tc 1680
atttggcccc tttgggtctc atgtggtccc aaaagctttt ataccgtgtc agtttgattt 1740
tgtgttcgat aattgatttt aaattt[|]aaaa ttgattttga atatatttct actt[|]gtttgg 1800
tttgatg[|]tta gagaagaatt cataattaat tttgagttca taatttctag ttaggttgaa 1860
gtaactttga ataggttttg tattggatcc aaaattttat attgaatttt aatttatttt 1920
taacttaatt ttataataaa atattt[|]aaac ataagacaca ttaattcaaa attaat[|]ttta 1980
atcaaaatca attttactaa cacccaacca aacacacttg aacaatccat ccctcatgca 2040
aaccaacatt cattttttta ccctttcgt[|]a tctcaggttg tgcccagtat tcatttgaat 2100
taaattggaa ctctctccaa acatgattta tttgattttt ctacttcatg tatcaatttt 2160
attg[|]tttttag tttttctott taaaatgcat tttgtaattt gtaaaaaact tcatacttct 2220
gtgaagggga taatcagttt tagcaagtag ttgtatggaa tgaaataata ttaataaact 2280
aaataatttg ccaatt[|]aaaa aagaatacac taatagaatt atatagttta tataatttag 2340
aacttacata tataattgg[|]t atgtgtatcc ccaaaagttt agaaatcata atcgcattaa 2400
attagccaaa gaaatcttgc aatgagttt g[|]ttaattggg ttgattataa tttgcttatt 2460
tattagtata aaacaaagca aatatcatca atggagagaa tgagagggat agaaagtatg 2520

ES 2 582 552 T3

ttgtgggtga gtagaggttt ctttagccaa aaagtttgac acaaagtttc caattttcta 2580
 cccgtgcaaa acgttgctat agtgtctttt gttttgcatt gacttggaag tcaatttatg 2640
 caaagatgga ttcaactacc ttccaatag cgcagaaatt aagtgcattg agagtgagag 2700
 acaagcactc ctcaacttca aacatggcct catagatgac tctggcatgc tgtctacatg 2760
 gagggacgat ggcaataaca gagactgttg caaatggaaa gacattcaat gcaacaatca 2820
 aactggatcat gttgagatgc ttcatctccg tggatcatgat acacaatatt tgataggtgc 2880
 aatcaatata tcttcattga ttgcccttga aaatattgaa cacttgatc tcagctataa 2940
 tgattttgaa gtgagtttga tttatgctat tgaacacttg caatcaatat ctcttcattg 3000
 attttgaaca cttgaaaaat tccgtcattt ttactacaag cttctgggct gatgctctct 3060
 gaaaataatt tttcagattt gttttcattc ttatgtgacc aaagcacagc ttcaaatttg 3120
 gcaactttag atgtatcacg caatcaaata aaggggcaac tgccagattg ttggaaatca 3180
 gtaaagcaat tactgttcct tgatttaagc agcaataaat tgtcaggga gattcctatg 3240
 tccatgggcg cccttgtaa tatggaagcc ttggttttac gaaacaatgg tttaatgggt 3300
 gagttgcctt ctctcttgaa gaattgcagc agtttattta tgctggacct gagtgaaaat 3360
 atgttgctcg gtccaatacc atcatggatt ggagaaagta tgcatacaatt gataatcttg 3420
 aacatgagag gaaatcacct ctcaggaaat gtaccattc atctctgta tttgaaccgt 3480
 attcaattgt tgggatctt caaggaataa cttgtcaagc ggaaattcca tcatgcttaa 3540
 agaatttcac tgcaatgtct gaacagagca tcaactcaag tgacactatg tctcgtatat 3600
 attggtataa taacacttat catgatattt atggtgttta ctcatcogga ggttatagc 3660
 ttgacataac atggatgtgg aaaggtgtgg aacgggggtt caagaatcca gagttagagc 3720
 tcaagagcat tgatctttcc agtaacaatt taatgggtga aatacacaag gaggtcggat 3780
 atttgcttgg gttagtttct ttgaatctat caagaaaca tttgagtgga gaaattcctt 3840
 ctcggattgg gaatttaag tcaactagaat cacttgactt gtcaagaaat cacatctctc 3900
 ggagaattcc ttctctctt tctgaaattg attatttgca aaaattagac ttgtcacaca 3960
 actctctgtc tggaagaatc ccatcaggaa gacattttga aacctttgaa gcctctagtt 4020
 ttgaaggaaa cattgatctt tgtggtgaac aacttaaca aacttgcct ggggatggag 4080
 atcagacaac agaagagcat caagaaccac cagtcaaagg tgatgattca gttttctatg 4140
 agggattata catcagcttg gggattggat acttcactgg attttggggc ttattagggc 4200
 cactactact gtggcctcct tggagaattg cttacatcag gtttctgaac agattaacag 4260
 actatttata tgtatgctta ttgtgaatgt ggggaattgt gctgatcgct ccaaggcaaa 4320
 aatgtatggt ctagatttat ttgtcaattt catggtttat gttctgactt tgttttat 4380

ES 2 582 552 T3

tacatatatc	aagaaattgc	ttcactgatc	aaaaagagca	atatggattt	cacttagagg	4440
aggccaagaa	taataataat	aatttaatct	aattattatt	taacttgaat	tttttttata	4500
ttttttacaa	agaaaaaata	tacaactata	ttaagcataa	aacattact	atctaattaa	4560
ttttatcatt	tatatgaaaa	taaataaata	atTTTTTTTat	tcctaaatac	tagaaacata	4620
aactctttca	aatatattat	tagacatttg	tagaagaaac	aatagatgc	atTTTTTaaa	4680
atgattttcc	ataattataa	atgtacactt	acacattaca	aatattttat	tattatcttt	4740
aatttctttt	tatctcactt	tttactatca	cattatatta	cctattatac	atacacttct	4800
ctttcttttt	ttttcttttt	gtctccttaa	gtgtcaacta	agatgacatg	tattatTTTT	4860
caatattttt	tttcataaat	tttaagggga	cogtaattct	tttaacatgg	tattttaatt	4920
acactttgtg	aaaaaacttg	ggggccatgg	tccttgcacg	tatacttcca	ttttcaattt	4980
tatatgaaaa	aatataattc	tgtttatatc	ttgtaattaa	tcagcacat	taattgttgt	5040
acaaaaaat	gctgattggt	gcagatgtgc	tgcaogcttc	tgatcagaga	agaaaccatt	5100
gttggcagct	acaaatgoga	gataattctt	tagtatagga	gtttacattg	ttttgtattt	5160
aagtaatgaa	ctgcaaaatc	ttgtttccag	aaacttagta	tgctattgct	gtattttattg	5220
tataatatat	ttgtaatgct	gtttgttttt	cattattgtg	cttagatctg	taatattctaa	5280
aatttcacca	cttcatattc	atcttcaaca	atgctttcta	ctatattctg	ctagtgcagc	5340
tatacgttac	tgtgaatcaa	atTTTgtgat	gagaagaaga	atgcaagata	ccctattttgt	5400
tcctagttac	taccagtatg	tttgcacact	tgtgttagac	cccttctgta	catgcactta	5460
tgttttgcca	aaagtagcaa	gcagagcatt	aaaaattgca	tcaagctagt	gttaggttgc	5520
tggtcttatac	acattttatc	tatttatctc	acaattatca	cgaagataga	aaaggggtaca	5580
tctgtaaatac	aaattcacac	aatgaatgct	aatttgaaat	tctctctctt	ccgtagcacc	5640
aatatgagag	tgccaattag	atcccatcat	ctagtcctta	tttttaggaat	aagtttcgta	5700
agaaaaggga	aaggatcata	ggtagtctca	aacacaactt	catttcatgc	agttttgcca	5760
tttcttttgc	aattttcatt	tttttatttg	tattctgcca	tttaaattga	tacacttttc	5820
taaatagttgt	aaactatcaa	acttctagtt	ttataagaag	tctgtctgca	ataaatggta	5880
tcattagtaa	ttagtacata	ttctcactgg	tatcactgaa	aatatctctt	ggagactaac	5940
ttttcaagat	aggagtggac	cacgtatggg	tcatcatggg	cttagcctgt	caaatcatga	6000
tcatgattcg	ttgaaggttc	accacaagta	tttacaataa	atctattgca	atactaattt	6060
ttcttttttc	tgcagcttta	ggcgaagtct	ccctaattta	ggaataaatg	ccttaattct	6120
aatcactagt	tagcaattac	tctatcatca	ccatccatct	tatatctttt	gtattctcta	6180
ttctctttcg	ttttatttaa	agagattctc	aatcctaaaa	tagtgttctc	catctctagt	6240
cttcatattt	ttctctatat	tcaatgagat	ttcgggtaaa	gccagttgaa	tacatttata	6300

ES 2 582 552 T3

aactaaatgt	caatgttggt	agtcctaat	ttaggagatc	gtggtgat	tt	tgaggttgc	6360
atztatgtga	ccacatggag	gaattgatgg	tggtatacgc	agcaatattt	gtttcctaga		6420
cagtagacac	tatcctcaat	cacctactga	agacgtttga	accaaagat	ttttcaaaaa		6480
aatggatatt	aatcaactca	acttatttat	aattatgcta	ctatTTTTT	aacattcatt		6540
tttataaaat	tgatgttaaa	ataatgacat	taaatgtata	ttttctagt	ttatagaaag		6600
ggttcgacaa	gctagattga	gagaaattca	gaatctgact	tgctatttca	ttgatcaagg		6660
gtcctatcat	cttggtcat	cggtatgctt	ctctcattta	aatattcag	aatatgtctt		6720
tacctaaaa	tattaattaa	tatgtgacac	ttacacccaa	ctaagaatag	taaatttgtc		6780
gaagtgcttt	gcacacttga	aaaataaaat	tattagagac	attataaag	acatgacaat		6840
ataatgaatt	aatggttgtt	tgtagtccc	tgataaaatt	gagtggagct	tcgagaccaa		6900
taagtatatt	acaggaaatt	agttaaaaga	atctctcaat	caattatata	gttgagaatt		6960
tgatTTTTT	ttgagtctaa	taataataga	atatgaatat	tgtaaattgtt	atagttatat		7020
aataatgata	tatataataa	taattagaca	aattatagtg	tttattatat	ttatactaat		7080
tgtatgagta	tgaataatg	atattTTTTgt	attataatat	aaagattata	ttttaaaaa		7140
atagcctata	aattataatt	ttttaaaatt	ttcacatgt	attaaaatat	attagtactt		7200
ttaaataatg	ataaaaaaaaa	tgatattgtc	gtctTTTTTg	ttttctaact	cctttaatgg		7260
gtagaaaaat	taaacataca	atcacatcca	aatttaaaag	taaaaccaat	gtataaaactt		7320
tgaattatt	agtctttgtg	gaaattttat	atcaagacaa	attaattaag	tttacatttt		7380
ctgctcttta	gccaaatgac	aatgatatt	tattcatctt	agttcttagt	agatttttca		7440
cataatgata	tcaaccctag	aaagacttgg	aaatactcta	acctgcaagg	actTTTTTat		7500
ttattgggga	caagtgcaaa	gattgtgcaa	aaacattagt	gtaaagataa	attagtattg		7560
cattcctgat	actttgacaa	aataacactt	catattTTTTg	gtgggtttaa	ataattgttt		7620
tttgtcctta	taaaattaag	gattTTTTTta	ctttaatata	taaagatttt	tttatatatt		7680
ttagtcttg	taattttaat	atTTgaattt	attgTTTgct	atcaactatc	aataggttac		7740
tgattatgta	agagtgatgt	tggtagttca	ttgtcctctc	gacaatatca	atagtttgac		7800
atggtattat	atgtaaagt	tttggtaaat	tgaattatta	cattttcata	tgTTTaaat		7860
aattgatgat	gtagattaa	ccgatgagaa	atTTaaaaa	acataattta	ctaaaaataa		7920
ttgcatatta	tttattgtta	aaattTTTTat	aagTTaatta	acggTTaatg	taattccatg		7980
ttatgtcgtc	aattaatatt	tttacttgac	aataaaaaact	aattTTTTT	tttagtttg		8040
accagcacta	aaataaaaaa	ctttgaaaaa	ctaaagcaga	aaacacacta	atTTtatagta		8100
gctaaaatga	tgTTtaagcc	ttgTTTgtgt	tagTTTtaca	tagactTTTT	ctaagcatgg		8160

ES 2 582 552 T3

tgctcgtaa agtgacaaaac tcaaatacct tttatgggca cctcacgtgt catttaatga 8220
 cattacaaaa attcccttga taatgtaaaa atagaatcat atttatattt tttatttatt 8280
 aaatTTTTaa catcattttt ttgtcgaatt atctgatgaa attttagtta ttacaacatg 8340
 ttgctacaat atgaagtata tcttcatgaa cctgtaatta atataggaaa tcattttatt 8400
 acacaattat ataattagat tttttttaat tttaaattct aatTTTTtC ttgaagaatg 8460
 gtaagatttt gtaagagtaa ttttttaaaa accatgtctt aattaaagaa aaaaaatcaa 8520
 atcacaacat ataagaaaat atttattaga cgtgattgat taacatggca gtatcaaatg 8580
 aaacaagaat ggtttccctc tcatattttt cttttaaaaa atttatatat acaggttaat 8640
 taatTTTTta tataaaatat agttatgaaa tttcttaatt aacataattt tgtatgttta 8700
 agcttgttat tattttactc ctccactgct tattttctgg atatgttcat gttaattaat 8760
 ccctattaaa tattttaatc cccagcatat gaacacggaa gattccagcc aaaagatata 8820
 attgaacaca gggaatacca cttttttttt ttttttggtc tagaagaata ccacctgttt 8880
 aagagaagat gcatctacaa gttattggtg gttttttctt cttottatga tagcatagaa 8940
 gaatattatt gtgaaaattc agaagttaat ttgtcgtatc acatgaaagt ttgaggacac 9000
 aatTTctgcc caaaacataa gctcccatca ctatctactt catcaacaga ctacatatat 9060
 gtgatatgat tctaaaaaca aaacacttat aaacagccag ttcagttaaa tccaagcaat 9120
 tgttttccaa gtctgccaac ccttgaaata tgggtagaa aacacgtcca caaaaatatt 9180
 taaatcaaaa gaaaattaaa ggaaactcac gctgatacat tagtttgtgg aaaaattctg 9240
 tcttcacttt ttccatacta gggtcogttg actgatacat cagctaatoG ctatcaagtt 9300
 tccaatatat caaccaataa ttgagataaa tgccacaaaa taaaaaataa aaaagaaccc 9360
 gtgcatttac attatctgaa attctttgaa tggatctgg tccaagagaa aattccaaaa 9420
 gcaaagaact cttagagctt caatagtcac tttcatgagg ttaatcgta ctgcaatagt 9480
 ctttcaatag tctttctctc attttgtgtt tctccacat gttagccttt ccctcaagcg 9540
 gaagtcattt tcaatccaag aatatttcat ggtgaccctt agagcttaat cgttactgcc 9600
 cccggcttgt ctagccattg ccacaatatg ttctagtatc ttgtactatt gcaacacctg 9660
 caactctgct acctgacatt catgcatgaa ttcaccogtc agaaagactt ttgatgcaaa 9720
 gaactctata tccatgaatc catcaacgcc atcttactog tctaagctag tcaactaagtc 9780
 aatcattga ctctgatatc aaatTTTTt gaaaaatcca agagagtaaa taatagagaa 9840
 attttccaca ataggtcacc aaacaaatta cataagtaaa cttgatatca tatcttagag 9900
 ttccaacact tatttttgaa taaaaaaact gtaggtggat tctagaataa ttttaatagc 9960
 ataagagata ggcaaaacca aaacatagtt ttagttcaca tgtctatcct gagactgctc 10020
 agcaccagat acccacttat gaaggcatat ggcagcagag taatttgaac cacatgcaat 10080

ES 2 582 552 T3

atatttcaca tgtctatcct ttaatgcttc aaccaaagcc ggtgttttac gatcttcaat 10140
atctccatga cccagtctcc catttgccacc tttccccca gtataaactt catttttggga 10200
tgtaataca gctacatgat atgctccaca agcaatttct tcaatcgatt ccctggcaat 10260
cttgtctccg accaagcatg gaacctttcc gtcagattga ggattcccaa gctgaccata 10320
aacagtactt cccatagtga aaacacgtcc agattttgtc aggcctgctg tcaaactgtg 10380
cccacaagca attttatgaa aattggaatc aataagtga gccacacaag ttggtttaag 10440
gogtgcctcc ttgtcccat gtccaaggcg atttttgtct ccatcaccoc aagtaaaaa 10500
tttacctgat gatatgcttg tactggagtg tgttgagata acctctaca cagctgcagt 10560
atgccacact ccacaagcaa cagctattgt tctcaacccc aataaggatt ctacttctct 10620
aggatatgaa acattttgcc tatctccatg gcccaagaca ccgaatgttc catcaccaaa 10680
tgtaaacagc tgcctgttg aagttaccaa ggctgtgtgc catggaccac aagcaaaaa 10740
tgcaatttga agtccctcta atggaccagc aattctcttt ggtatccaat gactgacatc 10800
actgccatga ccaagaagcc cagcattatg ggtaccatca ccccatgtat atagttcccc 10860
agccattgta acagcacagg aatggaactc accacaggca acaaatcaa cagttgtaga 10920
agtcaatgct tcaactagac gaggttgaac cacattcttc ccaacacat gaccaaggca 10980
tctctctgat tcttcgcccc atgtaaaaac ttcaccttgc ctagtgacta gagaagcatg 11040
tctaacacca catgctatat gatgtacatc taaaactag ctggattcca tggtctggy 11100
gagaagtaca tctgccctgg ggctgacata atttacattt ttatcagcac caactttaac 11160
attttcacag gtaacctctc cccatagtga tacatcccc aaagcatcac agtcatcagg 11220
tgcagatcca tgactagatg tacttggggc actggaaaca ctgacacgaa atacatctga 11280
agcagatcct ttcacttgca tgtttggtg gtctggtggc gcatgtgacc tttcagaaat 11340
tgtattgtca gaccgaaagg actttggtga agtatttggga agagtcacag aatgtcagg 11400
agaacaaatg cctcgtgacg tgctagccaa acttacactt ggattatttg atgttaagtc 11460
tctgctatcc tgatattatt tgagacacag agaattgtaa gcaacttatc atgtatttca 11520
tcagtagcta tggaagcata atggcaacag caaaggtaca ggaattagga aagcttgtat 11580
aaaatcagtt caccttttca caaaaaaatc acatcatata aaataaaacc ataataca 11640
caatcaccaa ttagcaaccg aagcagagaa tgagtgagag gtaatctctt tcagatataa 11700
ataaatatat aaaataaaac cacaatttat atcctttcag gttaagctgc gatctgagaa 11760
aataaatact agttttcctt agaggaaaca acaataatc aatcttataa tggagcaaat 11820
aagttctctc cattttgatt ggttcaaaat atacactcta ttgtagcatt ttggtgtgca 11880
gacagaaaaa agaattgaaa aaacagaaca aatgaaatg attccgcttt attttgttct 11940

ES 2 582 552 T3

tggtaccacc	atcttttagta	gaacccaaaat	gtaccacttc	ttaacctcat	gtctaatacc	12000
attccgtttt	taaaatgcac	aatacataga	acaacaccca	tatgttctcc	cattcccttc	12060
tagcatgcct	atcaaatgct	gcctaaggaa	aatggcatga	cgactattaa	cctaagacta	12120
agatctatca	cctttccagc	ttatagaagt	agaacaactt	acaagaaaca	taatgtgacc	12180
aaaatgaatt	taactacaaa	aaccacaagt	tagtatattt	acattaagaa	tgagaccccc	12240
atcactccat	ccatcaattt	tggaccgacc	accttgacca	gaagctatca	gtgctttgag	12300
gccagcaatc	cacacttctg	cctcaacttt	atctctgcaa	atctgaatag	caatacacag	12360
aaattattat	aataatgaaa	atacagaaaa	tgaaaagaaa	taatgattta	gtgatgcatg	12420
aatcacata	atttgccact	aaccaaata	agcgatcgct	ttccgttact	gtaaataagt	12480
gaaaaagaca	aatagtcctt	ctcaggacgc	aagtaacggt	ggaaaacagc	ctgccaaaag	12540
attaagggaa	tgaaaacaag	aacaagtaag	agtaagtttg	tgaaacaatt	tttagatcac	12600
tttattaata	acagagaatg	tcaaggtatc	atatgcaatt	agatttttaa	gggaagaaat	12660
ctcacagttc	tttgtccagg	aataattcta	gagacagaag	atagcttcag	atctctttct	12720
ccactacttg	taatccagat	taaggatgat	tcatcctgca	gtttacagat	aacgtttata	12780
catagaata	actcaagagt	ttaaaatttc	aagcctacta	tatataaatg	ttcaactctt	12840
agtctacaat	caaggaagaa	tagaaaagat	gcatttttat	tagcattttt	gaatttataa	12900
atacaaccgt	aaaggcatac	accaaataag	aaatatgttt	tccagcgata	aagctacact	12960
acctctactt	gttagcagta	gcactaatta	ctaaaataag	aaaactcagc	atggatatta	13020
ataaaaatct	atgcaaaatc	ataaagatct	ggatagtaat	aataactaatt	aacctgaatt	13080
gtgccactat	aatgcagtga	accagagaa	ttcgcagtgc	caactcaggt	aagtaccaat	13140
tttagccaca	cagtgaattt	taagtggcat	ataagtaaaa	gtaaaatact	tcaaggtgca	13200
gtcatctatt	tcctatgcat	taagaagttg	cagaaaatag	gtataaaaag	tttaggaggc	13260
tatacaatac	agtcaacaca	cgaaagttag	ttagagatta	caatttaaag	ggaactccct	13320
actacaaagt	gtcgaaattt	caatcccgat	aaagaacaaa	atgacacctc	atcggacgta	13380
gggcatataa	aataaggaca	atacaaatta	acagtctttc	catactatat	tgctcatata	13440
gttatagcat	aaaaaacatg	caatatcagc	tatttgtcat	gagcacataa	tcaatcaaga	13500
actgtccaac	caggcagtta	acaaagatgt	gatgtagaga	atccaaaaac	actcttgaaa	13560
aggctttcag	ttaacttaca	tgggaaagtc	taaatggaca	aaacttgggc	tttcttttac	13620
gaccatattt	aagaagttga	gcaccctttt	tcaaagcaat	caatacctgc	acaatgaaaa	13680
gttacaatat	aaacaccagt	aaagatcaaa	cagacacagc	agtatatata	gtcaaatgaa	13740
actaaatatg	agtaacaagt	taaaaaatct	atattgataa	ccaagatttg	tatattcccc	13800
ttcatatgat	gatgagtcac	gagccttaca	aaaaaatact	caaaggcatc	atctttataat	13860

ES 2 582 552 T3

ctaagcactt tctcttctta caaaagatcc caaaacagga taaattgtta tgttttggaa 13920
 cgagtgtttg caaacttgat tttaggtaat cttaattgtg tagaattggt tttgttaaaa 13980
 ttgattttga aataaagtga tttgtggttt aatggctggt ttatacgtg gtttaatggc 14040
 aattaagctt ctaagtacta gagggcctg ccttcaatcc cttgctagac caaaatttct 14100
 ctcttgaggg cgagccctgg tgcagcggta aagtgtgtcc ttggtgacct gttggtcatg 14160
 ggttogaatc cggaaacagc ctctttgcat atgcaagggt aaggctgctg acaatatccc 14220
 tccccatac cttcgcatac cgaagagcct ctgggcaatg gggtagaag tgtggtttat 14280
 gtttgaaagt tttattgcaa aagcaaattt acagtgaac ttaatgttaa tgctaaagct 14340
 acctttttca attctagtca aacacatatt ttagtgtggt tggaaacctg tttgcacct 14400
 tttaaacgga agtttagagc ttccaatacc aaagggtgga gcaatctaaa gggtagattg 14460
 acgttacatt gaaacaacag atttctaaat acactttggt gttggttaag gtggtttgaa 14520
 tatttgcaaa agtcactaga agaaacaata aggagagcat attgtataca ctttgttttt 14580
 tagccctgtg aaaaagggtg gaaggaaacc aagaaggaca aatagaggaa attgttaaga 14640
 agaatctcat ggggaataat attctggaga atttggtctt taaccaaacc caatggtctt 14700
 gtgcaacctg tgcaactgac ctcacctaata gggataaggc tttagttggt gcagtcaaat 14760
 acacttttag gagaaaactt tatttttagat agcggaaatc aaataaggca aataattggt 14820
 aatattttta catgattttt tgtgagtgtt aaagaaatga ttttttgtaa agtaaattac 14880
 tcttttgtgc cttgagaaaa tgtttaaatt acaccccccc cccccccct cctatcattt 14940
 taaaatactc ttctcgctta aaagtgtata caatatgctc tacatttgggt cattttcaat 15000
 gtaaacaaac ctcttaaaag tggtaaataa ttaagaatgt gcctccaat gatattttct 15060
 cttcttttac aactttttgc gtcaccacca actaatattg actatcctat tataaacttt 15120
 agtattttta aggatagaat gaagttttaa aaacatttat tattggcttt gaaatttcac 15180
 ctaatatctt tatttcatat tctaaagcta caagatttgt attagatggt taaaattaac 15240
 tattaatcat gttgagcaca aaagggaaaa aaatctctaa aaagctcatt tacattaanaa 15300
 tagactcaaa tgaaacacat ttatctttca agggagggaa gcgtatcttt taaaaaaga 15360
 ctggaggaga atgtaatata agcatgtacc aagagaagtg aatataattt acattttttt 15420
 taagtattag tgcctttga ttgccagcc atatggaaga attgactcaa gtgtgtacgc 15480
 tgaatttttt taaaattttt tttaattcga tacataatga ttaatgtcca acacatgaca 15540
 taaaatgtca gtgttggag catgccccaa catgtttata aaacttgca gtaaactcct 15600
 atagttgaat gggtttactt ttccacatgg atgaaatgag ttgaattgca tgaaaactca 15660
 ttggttagta gacttgggtg gaattaggta aacttgggtt atacattggc gagtttgaga 15720

ES 2 582 552 T3

ttttgctgga tcacattagt ttttcccaaa ccaaaatgca acatttttag cttaaaatgc 15780
 tttggccaac tttggtaaaa tgatttttat atgcttcacc tttaagtgta gaagctagcc 15840
 caaaaacaca aatcaatctg cctcattcat tggttccttg tcatcactgt tttggtttgc 15900
 tttgacataa aattagaatg attgaatatt tacaatgcat atggcattaa attatgtttt 15960
 aatactttta taggcattat aatattatt tatttattag gcatactctt gtgagttag 16020
 aagtaagggt tacaaaagct tcacaagttt acataatctc tcgagtttga caacattgat 16080
 tcccagttta gaaactccaa cacctcaagc agaagtgtcc atatttcaaa ctccgcaaga 16140
 aatatagcag atagggagga atgataatgt aagccacctt atactataag ttatgtgaaa 16200
 atccataaga aatccagtac atcccaacat tgattcaatt tctatgagaa gcctatctct 16260
 cttcttaata ttttgaccca aattacaggt tagagatggt gtagtaacta cagatatttc 16320
 taggtacaca gtacctgtta gtgttgtcca aaaaataaat aaacagtggc tgcgggctaa 16380
 atttcactag atgaattttg atttagtcag cttctattta gaactagatc ataaaatggt 16440
 tggtcagtac aatcaaccct gtgcacaaaa gattctatga agatttaagg tactaaaaga 16500
 tattaanaat aaataacatt gatgcaagct tcaatttcct gcttgaaacg atccaagaca 16560
 actataanaat gctgcactat caagatatta tctctaaaac atggtctcaa aaggcatcca 16620
 ctgactaagc tgttaataat tcaaaaacaa gtcaccctc cattcaaaca caaacatgca 16680
 tgcaatcata tctccaattt ccatattcca cagagcatta actcgttag tcaactaac 16740
 cctacaaggt tcgaaaatca cacttcttat tcacaagatg aaaatgtcaa aaaaaaaaa 16800
 caacgacaat acacaagtat atctctcctc tccctccaaa caaagaaaag aaacacacac 16860
 gcatgatcat aattcataac cttgagcctc tccaaaggta caatcaaggt ggagttgctt 16920
 aactcacttt tgatggactc tataatgtca cttgagattt aagaacttca acaagttttc 16980
 tccaatggtg caattcttaa gaacttaaaa taggttctac aattgttctg cgattcttac 17040
 caactgttaa aaacagttgt taatataagc aaaactacga catcaattac tccaagggtg 17100
 aaattacata agaactggtt ctcaaattga agaacctcag aagcaacttc cattgaagat 17160
 gctcttaacc accacaaagc aatttaacaa aaaaaaaaaa aaaaaagcat ttcccacatt 17220
 agaacaaaaa ctaatacaaa caatcaaat ttgaggaaaa aaattgtaac ttgccaccaa 17280
 acttataact tccaacatag agaaagagag agacagagag aaagaaagaa ataccgtact 17340
 tgttgttcaa tgtcaaggta ggcttcccg tagctagcaa gatctgccat tccatgtgag 17400
 agattcaccg acgcgccacc accctctccg atcactcgcc gcagttccgg tcatcataga 17460
 aaactccaac ctctctctct ctccacaacc attcacctc acatgaaaac caaaacctct 17520
 ctctctctct ctaaaaaac aacaaagccc acttcgtatt ctctctctag aaccttctg 17580
 gatccgcacc tottgcgaga acccaaaaaa aaatccctc aactccactc acggttccaa 17640

ES 2 582 552 T3

gtcaaagacc aaaccagttt tcccgaatcg |ggaaaaaac cggactttcg agcttgttga 17700
 acagggctct caaaagggtc gcggtggctc gcaacggaag agcagcttca gaaaggaaac 17760
 accggcgacg aaagtgggct ccggcgggga gacagaggag agagagagaa aaaaaact 17820
 gaaaggtgaa gagagagaga atcggaggat gtaaagtaca cctagtcaaa gattaagaaa 17880
 gacggaaaat tgttaaaata ataaaattaa taatttagaa taatttagac ttgcgacttg 17940
 gaatatgcat gcggtaaaaa aatcaatata aatcaaaaaa acatttttcg agtttatttt 18000
 tttttatatt tttagtgtcc gttaattttt ttaaaaaaag gtattcattt tctaaaaaac 18060
 tatataaaga aatattttct ataaaaatat ttatttatca attatattct tatataaaag 18120
 ttgtgcatat attcaaaatt tatgtttata attttaataa aatcaaaatt gttaaatattt 18180
 attaaagga taaattaaat ttttacttaa taaatcatgt aacattaaa aaattattcc 18240
 tggtgacaag tacttgttta tttttatata tttttctttt ggtgaaatca tgcttacttt 18300
 tgtgatggga ccatttcgga tgaaaataat aattttattt atttatctat ccaatactag 18360
 caaaagaaaa agaaattata cggaacaatg aaaaattgta gttgaaaaag aaaccagata 18420
 acattttcta aaatacaact ctgacttttt cttttaaaac tatcagttga ttaaaaagtg 18480
 acataatttt gaaagatgat taatgaacaa gtaattacta gtgtgaacca agaaaaagta 18540
 cttgatattg gtgatgtcac attacaagtg agatgtcatc acacaactct gacttagtta 18600
 atcacaagta ctaaataaat taatccaagc ttggtactaa catacgaaat cattaagtag 18660
 taattaatac gtactagtaa aagtggcaaa agataacgag aaagaaccaa tttctttgca 18720
 ttcggcctta gcggaaggca tatataagct ttgattattt tatttagtgt aatgatttcg 18780
 tacaaccaa gcatatttt agtactctca cacttgtgtc gcggccgctt atctctgtcc 18840
 atagttgcca aagctccctt cagccagtcc cattctgatg aatcgtaatg aggcaaggca 18900
 aagtgttgt gctgcaata tgtgatagtc acaagaaaac cgttcacaat gagcaaaggc 18960
 acccataaa cacatagcag ccaaaccaac cctttcaggg ttgcaacacg gtagagagag 19020
 taagtcacag aaaacaaagc aacatcagag acatagatca gaagcctctc acggttagaa 19080
 tatatgggag cataaggtg gtagtggctt gcaaaactat cataggtctt accagagaca 19140
 ttgaaggcta aatacatagg ccaccctatt gtgagtgtga cgagaagaga aacagccctt 19200
 cctagagggg tgtttaagta cttggaaaac catgcaactt tggattttgg ttttgggaca 19260
 aacacttcat cacggtcaag ggaacctgtg ttggagtgat ggcgccgatg gcttattttc 19320
 catgagaaat aagggactaa aagtgttgag tgaaggtca aaccacaac atcatcaacc 19380
 cattggctact tgctgaaggc atggtgacca cactcgtgag caatcactca gcggccgctt 19440
 ggggggctat ggaagacttt cttagttagt tgtgtgaata agcaatgttg ggagaatcgg 19500

ES 2 582 552 T3

gactacttat aggataggaa taaaacagaa aagtattaag tgctaatagaa atatttagac 19560
tgataattaa aatcttcacg tatgtccact tgatataaaa acgtcaggaa taaaggaagt 19620
acagtagaat ttaaaggtag tctttttata tatacccgtg ttctcttttt ggctagctag 19680
ttgcataaaa aataatctat atttttatca ttattttaaa tatctttatg agatggtaaa 19740
tatttatcat aatttttttt actattattt attatttgtg tgtgtaatac atatagaagt 19800
taattacaaa ttttatttac tttttcatta ttttgatag attcaccatt aatttagtgt 19860
tattatttat aatagttcat tttaatcttt ttgtatata tatgcgtgca gtactttttt 19920
cctacatata actactatta cattttattt atataatatt tttattaatg aattttcgtg 19980
ataatatgta atattgttca ttattatttc agatttttta aaaatatttg tgttattatt 20040
tatgaaatat gtaatttttt tagtatttga ttttatgatg ataaagtgtt ctaaattcaa 20100
aagaaggggg aaagcgtaaa cattaaaaaa cgtcatcaaa caaaaacaaa atcttgtaa 20160
taaagataaaa actgtttggt ttgatcactg ttatttcgta atataaaaac attatttata 20220
tttatattgt tgacaaccaa atttgcctat caaatctaac caatataatg catgcgtggc 20280
aggtaatgta ctaccatgaa ctttaagtcac gacataataa accgtgaatc tgaccaatgc 20340
atgtacctag ctaaagtgtat ttgtgacacg aagcaaatga ttcaattcac aatggagatg 20400
ggaaacaaat aatgaagaac ccagaactaa gaaagctttt ctgaaaaata aaataaaggc 20460
aatgtcaaaa gtatactgca tcatcagtc agaaagcaca tgatattttt ttatcagtat 20520
caatgcagct agttttattt tacaatatcg atatagctag tttaaatata ttgcagctag 20580
atttataaat atttgtgta ttatttatca tttgtgtaat cctgttttta gtattttagt 20640
ttatatatga tgataatgta ttccaaattt aaaagaaggg aaataaattt aaacaagaaa 20700
aaaagtcac aaacaaaaaa caaatgaaag ggtggaaaga tgttaccatg taatgtgaat 20760
gttacagtat ttcttttatt atagagttaa caaattaact aatatgattt tgttaataat 20820
gataaaatat tttttttatt attatttcat aatataaaaa tagtttactt aatataaaaa 20880
aaaattctat cgttcacaac aaagttggcc acctaattha accatgcatg taccatgga 20940
ccatattagg taaccatcaa acctgatgaa gagataaaga gatgaagact taagtcataa 21000
cacaaaacca taaaaaacia aaatacaatc aaccgtcaat ctgaccaatg catgaaaaag 21060
ctgcaatagt gagtggcgac acaaagcaca tgattttctt acaacggaga taaaacaaa 21120
aaaatatttc atgaacaacc tagaacaat aaagctttta tataataaat atataataa 21180
ataaaggcta tggaataata tacttcaata tatttggatt aaataaattg ttggcgggg 21240
tgatatattt atacacacct aaagtcactt caatctcatt ttcactaac ttttattttt 21300
ttttctttt tatttatcat aaagagaata ttgataatat actttttaac atatttttat 21360
gacattttt attggtgaaa acttattaaa aatcataaat tttgtaagtt agatttattt 21420

ES 2 582 552 T3

aaagagttcc tcttcttatt ttaaattttt taataaattt ttaaataact aaaatttgtg 21480
 ttaaaaatgt taaaaaagtg tgttattaac ccttctcttc gaggatccaa gcttggcgcg 21540
 ccgtcgacgg atataatgag ccgtaaacia agatgattaa gtagtaatta atacgtacta 21600
 gtaaaagtgg caaaagataa cgagaaagaa ccaatttctt tgcattcggc cttagcggaa 21660
 ggcatatata agctttgatt attttattta gtgtaatgat ttcgtacaac caaagcattt 21720
 atttagtact ctcacacttg tgtcgcggcc gcttatctct gtccatagtt gccaaagctc 21780
 ccttcagcca gtcccattct gatgaatcgt aatgaggcaa ggcaaagtgt gtgtgctgca 21840
 aatatgtgat agtcacaaga aaaccgttca caatgagcaa aggcacccca taaacacata 21900
 gcagccaaac caacccttc agggttgcaa cacggtagag agagtaagtc acagaaaaca 21960
 aagcaacatc agagacatag atcagaagcc tctcacgggtt agaatatatg ggagcataag 22020
 ggtggtagtg gcttgcaaaa ctatcatagg gtctaccaga gacattgaag gctaaataca 22080
 taggccaccc tattgtgagt gtgacgagaa gagaaacagc ccttcctaga gggttgttta 22140
 agtacttggg aaaccatgca actttggatt ttggttttgg gacaaacact tcatcacggt 22200
 caaggggaacc tgtggttgag tgatggcggc gatggcttat tttccatgag aaataagga 22260
 ctaaaagtgt tgagtgaagg gtcaaaccca caacatcacc aaccattgg tacttgctga 22320
 aggcatggtg accacactcg tgagcaatca ctcagcggcc gcttgggggg ctatggaaga 22380
 ctttcttagt tagttgtgtg aataagcaat gttgggagaa tcgggactac ttataggata 22440
 ggaataaaac agaaaagtat taagtgctaa tgaaatattt agactgataa ttaaatctt 22500
 cacgtatgtc cacttgatat aaaaacgtca ggaataaagg aagtacagta gaatttaag 22560
 gtactctttt tatatatacc cgtgttctct ttttggctag ctagtgtcat aaaaaataat 22620
 ctatattttt atcattattt taaatatctt tatgagatgg taaatattta tcataatttt 22680
 ttttactatt atttattatt tgtgtgtgta atacatatag aagttaatta caaattttat 22740
 ttactttttc attattttga tatgattcac cattaattta gtgttattat ttataatagt 22800
 tcattttaat ctttttgtat atattatgcg tgcagtactt ttttctaca tataactact 22860
 attacatttt atttatataa tatttttatt aatgaatttt cgtgataata tgtaatattg 22920
 ttattatta tttcagattt tttaaaaata tttgtgttat tatttatgaa atatgtaatt 22980
 tttttagtat ttgattttat gatgataaag tgttctaaat tcaaaagaag ggggaaagcg 23040
 taaacattaa aaacgtcat caaacaaaaa caaatcttg ttaataaaga taaaactgtt 23100
 tgttttgatc actgttattt cgtaataataa aaacattatt tatatttata ttgttgacaa 23160
 ccaaatttgc ctatcaaatc taaccaatat aatgcatgcg tggcaggtaa tgtactacca 23220
 tgaacttaag tcatgacata ataaaccgtg aatctgacca atgcatgtac ctactaaat 23280

ES 2 582 552 T3

gtatttgtga cacgaagcaa atgattcaat tcacaatgga gatgggaaac aaataatgaa 23340
 gaaccagaa ctaagaaagc ttttctgaaa aataaaataa aggcaatgtc aaaagtatac 23400
 tgcacatca gtccagaaag cacatgatat tttttatca gtatcaatgc agctagtttt 23460
 attttacaat atcgatatag ctagtttaaa tatattgcag ctagatttat aaatatttgt 23520
 gttattattt atcatttgtg taatcctggt tttagtattt tagtttatat atgatgataa 23580
 tgtattccaa atttaaaaga agggaaataa atttaaacaa gaaaaaaagt catcaacaa 23640
 aaaacaaatg aaaggggtgga aagatgttac catgtaatgt gaatgttaca gtatttcttt 23700
 tattatagag ttaacaaatt aactaatatg attttgttaa taatgataaa atattttttt 23760
 tattattatt tcataatata aaaatagttt acttaatata aaaaaaatt ctatcgttca 23820
 caacaaagtt ggccacctaa ttttaacctg catgtacca tggaccatat taggtaacca 23880
 tcaaacctga tgaagagata aagagatgaa gacttaagtc ataacacaaa accataaaaa 23940
 acaaaaatac aatcaaccgt caatctgacc aatgcatgaa aaagctgcaa tagtgagtgg 24000
 cgacacaaag cacatgattt tcttacaacg gagataaaac caaaaaata tttcatgaac 24060
 aacctagaac aaataaagct tttatataat aaatatataa ataaataaag gctatggaat 24120
 aatatacttc aatatatttg gattaaataa attggtggcg gggttgatat atttatacac 24180
 acctaaagtc acttcaatct cattttcoact taacttttat ttttttttc tttttattta 24240
 tcataaagag aatattgata atatactttt taacatattt ttatgacatt ttttattggt 24300
 gaaaacttat taaaaatcat aaattttgta agttagattt atttaaagag ttcctcttct 24360
 tattttaaat tttttaataa atttttaaat aactaaaatt tgtgttaaaa atgttaaaaa 24420
 agtgtgttat taacccttct cttoaggat ccaagcttgg cgcgccgtcg acggatccta 24480
 gtggatctga agttcctata ctttctagag aataggaact tcggaatagg aacttcgcta 24540
 gctcagaatt cctgcagaag cttcggctcg ggccattctg gccgaagact actgagtgtc 24600
 ttcttacgat gaagacatga acgtgtcttc aactagaggc gcgcgcgcgcg tcgacggatc 24660
 ggtcgactct agtaagcttt gctctagatc aaactcacat ccaaacataa catggatatc 24720
 ttcttacca atcactactaa ttattttggg ttaaataata atcattattt ttaagatatt 24780
 aattaagaaa ttaaagatt ttttaaaaa atgtataaaa ttatattatt catgattttt 24840
 catacatttg attttgataa taaatatatt ttttttaatt tcttaaaaaa tgttgcaaga 24900
 cacttattag acatagtctt gttctgttta caaaagcatt catcatttaa tacattaaaa 24960
 aatatttaat actaacagta gaatcttctt gtgagtgggtg tgggagtagg caacctggca 25020
 ttgaaacgag agaaagagag tcagaaccag aagacaaata aaaagtatgc aacaaacaaa 25080
 tcaaaatcaa agggcaaagg ctgggggttg ctcaattggt tgctacattc aattttcaac 25140
 tcagtcaacg gttgagattc actctgactt cccaatcta agccgcggat gcaaacgggt 25200

ES 2 582 552 T3

gaatctaacc cacaatccaa tctcgttact taggggcttt tccgtcatta actcaccctt 25260
 gccaccocgtt ttcctataa attggaactc aatgctcccc tctaaactcg tatcgtttca 25320
 gagttgagac caagacacac tcgttcatat atctctctgc tcttctcttc tcttctacct 25380
 ctcaaggtac ttttcttctc cctctaccaa atcctagatt ccgtggttca atttcggatc 25440
 ttgcacttct ggtttgcttt gccttgcttt ttctcaact gggtcctatct aggatccatg 25500
 tgaaactcta ctctttcttt aatatctgcg gaatacgcgt ttgactttca gatctagtcg 25560
 aatcatttc ataattgcct ttctttcttt tagcttatga gaaataaaat cacttttttt 25620
 ttatttcaaa ataaaccttg ggccttgctc tgactgagat ggggtttggt gattacagaa 25680
 ttttagcgaa ttttgtaatt gtacttgctt gtctgtagtt ttgttttggt ttcttgcttc 25740
 tcatacattc cttaggcttc aattttattc gagtataggc cacaatagga attcaactt 25800
 tgagcagggg aattaatccc ttccttcaaa tccagtttgt ttgtatata gtttaaaaaa 25860
 tgaaactttt gcttttaatt ctattataac tttttttatg gctgaaattt ttgcatgtgt 25920
 ctttgctctc tgttgtaaat ttactgttta ggtactaact ctaggcttgt tgtgcagttt 25980
 ttgaagtata accatgccac acaacacaat ggcggccacc gcttccagaa ccaccgatt 26040
 ctcttcttcc tcttcacacc ccacctccc caaacgcatt actagatcca ccctccctct 26100
 ctctcatcaa accctcacca aaccaacca cgtctcaaa atcaaatggt ccatctcaa 26160
 accccccacg ggggcgcctt tcaccaagga agcgcgcacc accggagcct tcgtgtcacg 26220
 gttcgcctcc ggcgaacctc gcaagggcgc ggacatcctt gtggaggcgc tggagaggca 26280
 gggcgtgacg acggtgttcg cgtaccccg ggtgctgcg atggagatcc accagcgcct 26340
 cacgcgctcc gccgccatcc gcaacgtgct cccgcgccac gagcagggcg gcgtcttcgc 26400
 cgccgaaggc tacgcgcgctt cctccggcct ccccggcgct tgcattgcca cctccggccc 26460
 cggcgccacc aacctcgtga gcggcctcgc cgacgcttta atggacagcg tcccagtcgt 26520
 cgccatcacc ggccaggtcg cccgccgat gatcggcacc gacgccttcc aagaaacccc 26580
 gatcgtggag gtgagcagat ccatcacgaa gcacaactac ctcatcctcg acgtcgacga 26640
 catccccgcg gtcgtcgcgg aggctttctt cgtcgcacc tccggccgcc ccggtccggt 26700
 cctcatcgac attcccaaag acgttcagca gcaactcgcc gtgcctaatt gggacgagcc 26760
 cgtaaacctc cccggttacc tcgccaggct gccagggccc cccgccgagg cccaattgga 26820
 acacattgtc agactcatca tggaggccca aaagcccgtt ctctacgtcg gcggtggcag 26880
 tttgaattcc agtgctgaat tgaggcgtt tgttgaactc actggtattc ccgttgctag 26940
 cactttaatg ggtcttgaa cttttcctat tggatgaa tattcccttc agatgctggg 27000
 tatgcatggt actgtttatg ctaactatgc tgttgacaat agtgatttgt tgcttgcctt 27060

ES 2 582 552 T3

tggggaagg tttgatgacc gtgttactgg gaagcttgag gcttttgcta gtagggctaa 27120
 gattgttcac attgatattg attctgccga gattgggaag aacaagcagg cgcacgtgtc 27180
 ggtttgccgg gatttgaagt tggccttgaa ggaattaat atgattttgg aggagaaagg 27240
 agtggagggt aagtttgatc ttggagggtg gagagaagag attaatgtgc agaaacacaa 27300
 gtttccattg ggttacaaga cattccagga cgcgatttct ccgcagcatg ctatcgagggt 27360
 tcttgatgag ttgactaatg gagatgctat tgttagtact ggggttgggc agcatcaaat 27420
 gtgggctgcg cagttttaca agtacaagag accgaggcag tggttgacct caggggggtct 27480
 tggagccatg ggttttggat tgcctgccc tattggtgct gctgttgcta accctggggc 27540
 tgttgtggtt gacattgatg gggatggtag tttcatcatg aatgttcagg agttggccac 27600
 tataagagtg gagaatctcc cagttaagat attggtgttg aacaatcagc atttgggtat 27660
 ggtggttcag ttggaggata ggttctacaa gtccaataga gctcacacct atcttgagaa 27720
 tccgtctagc gagagcgaga tattcccaaa catgctcaag tttgctgatg cttgtgggat 27780
 accggcagcg cgagtgacga agaaggaaga gcttagagcg gcaattcaga gaatgttga 27840
 cacccttggc ccctaccttc ttgatgtcat tgtgccccat caggagcatg tgttgccgat 27900
 gattcccagt aatggatcct tcaaggatgt gataactgag ggtgatggtg gaacgaggta 27960
 ctgattgcct agaccaaagt ttccttgatg cttgttttgt acaatatata taagataatg 28020
 ctgtcctagt tgcaggattt ggctgtggt gagcatcata gtctgtagta gttttggtag 28080
 caagacattt tattttcctt ttatttaact tactacatgc agtagcatct atctatctct 28140
 gtagtctgat atctcctggt gtctgtattg tgccgttggg ttttttgctg tagtgagact 28200
 gaaaatgatg tgctagtaat aatatttctg ttagaaatct aagtagagaa tctgttgaag 28260
 aagtcaaaag ctaatggaat caggttacat attcaatggt tttctttttc tagcggttgg 28320
 tagacgtgta gattcaactt ctcttgagc tcacctaggc aatcagtaaa atgcatattc 28380
 cttttttaac ttgccattta tttactttta gtggaaattg tgaccaattt gttcatgtag 28440
 aacggatttg gaccattgcg tccacaaaac gtctcttttg ctgatcttc acaaagcgat 28500
 accgaaatcc agagatagtt ttcaaaagtc agaaatggca aagttataaa tagtaaaaca 28560
 gaatagatgc tgtaatcgac ttcaataaca agtggcatca cgtttctagt tctaggatcc 28620
 aagcttggcg cgaaacatag cttatcatcc tgaagagcaa gaggccacga tggcccggac 28680
 cgaattctgg atctgaagtt cctatacttt ctagagaata ggaacttcgg aataggaact 28740
 tcgctagcga attctggatc aattccacag ttttcgcatg ccagactgaa tgcccacagg 28800
 ccgtcgagtt ttttgatttc acgggttggg gtttctacag gacggactcg aggacgtctg 28860
 aagttcctat actttttgaa gaataggaac ttcggaatag gaacttcgct agctcagaat 28920
 tcctgcagaa gcttatcgat accgtcgacc tcgagggggg atccaagctt ggaagtatgt 28980

ES 2 582 552 T3

atacatgtac aat|attgctg aaggcatggt gaccacactc gtgagcaatc act|agcggc 29040
 cgcttggggg gctatggaag actttcttag ttagttgtgt gaataagcaa tgttgggaga 29100
 atcgggacta cttataggat aggaataaaa cagaaaagta ttaagtgcta atgaaatatt 29160
 tagactgata attaaaatct tcacgtatgt ccacttgata taaaaacgtc aggaataaag 29220
 gaagtacagt agaatttaaa ggtactcttt ttatatatac ccgtgttctc tttttggcta 29280
 gctagttgca taaaaaataa tctatatttt tatcattatt ttaaataatct ttatgagatg 29340
 gtaaataatt atcataattt tttttactat tatttattat ttgtgtgtgt aatacatata 29400
 gaagttaatt acaaatttta tttacttttt cattattttg atatgattca ccattaattt 29460
 agtgttatta ttataatag ttcattttaa tctttttgta tatattatgc gtgcagact 29520
 tttttcctac atataactac tattacattt tatttatata atatttttat taatgaattt 29580
 tcgtgataat atgtaatatt gttcattatt atttcagatt ttttaaaaat atttgtgta 29640
 ttatttatga aatatgtaat ttttttagta tttgatttta tgatgataaa gtgttctaaa 29700
 ttcaaaagaa gggggaaagc gtaaacatta aaaaacgta tcaaacaaaa acaaatctt 29760
 gttaataaag ataaaactgt ttgttttgat cactgttatt tcgtaatata aaaacattat 29820
 ttatatttat attgttgaca accaaatttg cctatcaaat ctaaccaata taatgcatgc 29880
 gtggcaggta atgtactacc atgaacttaa gtcatgacat aataaacctg gaatctgacc 29940
 aatgcatgta cctagctaaa tgtatttgtg acacgaagca aatgattcaa ttcacaatgg 30000
 agatgggaaa caaataatga agaaccaga actaagaaag cttttctgaa aaataaaata 30060
 aaggcaatgt caaaagtata ctgcatcatc agtccagaaa gcacatgata tttttttatc 30120
 agtatcaatg cagctagttt tattttacaa tatcgatata gctagtttaa atatattgca 30180
 gctagattta taaatatttg tgttattatt tatcatttgt gtaatcctgt ttttagtatt 30240
 ttagtttata tatgatgata atgtattcca aattttaaag aagggaata aatttaaca 30300
 agaaaaaaag tcatcaaca aaaaacaaat gaaaggggtg aaagatgta ccatgtaatg 30360
 tgaatgttac agtatttctt ttattataga gttaacaaat taactaatat gattttgta 30420
 ataatgataa aatatttttt ttattattat ttcataatat aaaaatagtt tacttaatat 30480
 aaaaaaaat tctatcgtc acaacaaagt tggccaccta atttaacat gcatgtacc 30540
 atggaccata ttaggtaacc atcaaacctg atgaagagat aaagagatga agacttaagt 30600
 cataacacaa aaccataaaa aacaaaaata caatcaaccg tcaatctgac caatgcatga 30660
 aaaagctgca atagtgagt gcgacacaaa gcacatgatt ttcttacaac ggagataaaa 30720
 ccaaaaaaat atttcatgaa caacctagaa caaataaagc ttttatataa taaatatata 30780
 aataaataaa ggctatggaa taatatactt caatatattt ggattaaata aattgttggc 30840

ES 2 582 552 T3

ggggttgata | tattataca cacctaaagt cacttcaatc tcattttcac ttaactttta 30900
 tttttttttt | ctttttattt atcataaaga gaatattgat aatatacttt ttaacatatt 30960
 tttatgacat tttttattgg tgaaaactta ttaaaaatca taaattttgt aagttagatt 31020
 tatttaaaga gttcctcttc ttattttaaa ttttttaata aatttttaaa taactaaaat 31080
 ttgtgttaaa aatgttaaaa aagtgtgtta ttaacccttc tcttcgagga tccaagcttg 31140
 gattttgggt ttgggacaaa cacttcatca cgggtcaaggg aacctgtgtt ggagtgatgg 31200
 cggcgatggc ttattttcca tgagaaataa gggactaaaa gtgttgagtg aaggggtcaaa 31260
 cccacaacat catcaaccca ttggtacttg ctgaaggcat ggtgaccaca ctctgtgagca 31320
 atcactcagc ggccgcttgg ggggctatgg aagactttct tagttagttg tgtgaataag 31380
 caatgttggg agaatcggga ctacttatag gataggaata aaacagaaaa gtattaagtg 31440
 ctaatgaaat atttagactg ataattaa tcttcacgta tgtccacttg atataaaaac 31500
 gtcaggaata aaggaagtac agtagaattt aaagggtactc tttttatata taccctgtgtt 31560
 ctctttttgg ctagctagtg tttttttctc gacttttgta tgaaaatcat ttgtgtcaat 31620
 agtttgtgtt atgtattcat tggtcacata aatcaacttc caaatttcaa tattaactat 31680
 agcagccagc ttagaaattc agaatcatgt tactctatac gcatccttta gggcatttgg 31740
 ttgagagaag aaatagatag gaaaagtagg tagatgcgaa aagaaaaaaaa aaagagaaat 31800
 aggaaaaaaaa ataaaggttt tttatagaaa aaaataaagt gaaaatgaat gaaaaatatt 31860
 tgaattaa tggtttggt tgtaaaaaaaa aaataaagaa aattatgatg aaaatacttt 31920
 taatcccttg catctgtgtg gatgattttt tgggctttta tttcaagcgg aagacaacac 31980
 ggtagctttg tgtcaacgat gcaaattttt attgctttct catcgggtta aaggtgattc 32040
 actctggggg gttgttaggt gcacccaaca ctattgctgg tgcaccagc attttacttg 32100
 aatgggtcaaa aatgtccttg ggctaatttt aaaaagaaaa agcccacca gcaacaccct 32160
 tttcttcttt ttccgcgaat gctttttctt cttcttccgc gaatgcttct tcttcttctg 32220
 cgaacgcttc ttcttcttct ccgctgggtgc tctcctctag gcttcatctt ctcgagcttt 32280
 cgggtgccatt gacgacctgc attgggtgat tttggtgctg ctccgcgctc gaggtaagtt 32340
 tattccttat tcctccattt cctttgggtgg tttttgatga tttacagatg tagggtagac 32400
 gacgtaggta gttgttcata tggatgtaat tcatccgtat ttaggattga attggtaacg 32460
 ttcatacggg tgaacttctt tcatatgaag aacacttcat tegtatgaag aaaacttcat 32520
 ctgtatgagt catacggatg aacttcaatt gtatgagtca tacgaaagaa gttcatccgt 32580
 atgattcatc cagatattgt ttgtcattta gcttaagggt attgtatatt ctggttttta 32640
 gcggtgcaaa atcacaagcg ttaggtactt gaatgggtac tggagtggaa gtttgaaagt 32700
 aaacaccact atcattgtga ataatcgatc catttggtgaaa aataaaaacc aatgtggagt 32760

ES 2 582 552 T3

tcacaatdgt ctgactgcta gtttctccca aaaatgtcat actttgttct aaaaattggg 32820
 ttgagagaga atgtgtgatt ttttagagtg ttgttggtgc tcatatatat agatgggttt 32880
 cactaatatt gcttcacttt tagaagaata gagacgcgtg cagatgcttt gtgtttgtgt 32940
 ttccaactaa accaatgtgg tgtcaagctg tatcgtgcat cagaatgtgt tgtcaagtct 33000
 gtcaatgtcg tgtcacgctc aaactttaat acgcatgcat ttgacaatgt gttatcaatt 33060
 atgacaacga tgtatcatac atacgtgac gaaagtcata ttttaactaaa tagcaatcaa 33120
 taacttcaac gaatcaaaca agacaacaat atagaggcag aggcagaggt tgggtgttgtt 33180
 cgctgagcct gagtggatga agccatttct ttgttatcat acgaacctg aactatttta 33240
 ttaacaaatc acaaaaatga ttttcaatgt caatcaattg tacaatatta ggccctccac 33300
 aacaaatttt atcacataat taataaaatt agataaacac atgtcaaagt ccataacaac 33360
 catgcatggt cagtcttcat ttatgtcgac atagtctctt ttgaacatca tgaagcttat 33420
 gtacttctgc atttactaa tatatggagc tgaccactgc tttgcctgag gatgagaatt 33480
 cctagaccat aacaatgcta gaggcgataa aggacaacgg tctttcaaat aaacctgttg 33540
 tacgtgaaca aacattatta actcaaatga acacaaatga ttgcataaat ttaaaaataa 33600
 gactaactat cttcaatgta cctaaacaaa atgatttcca aacacatgat cgacacatat 33660
 aatgcggtgc atagaagaat ctgttggtgg ttgacttcta agaggaaaa atgtcatgct 33720
 ttgttgctgg gacaatgata caaggattac attatacctt gatgcaatga catatcccat 33780
 ctccgttata tccatccacg tatccacact aacctgaatc aaacaaatat acacatcaaa 33840
 gttattttaa gttagtctt aaaaaagaaa acctaaacaa acataccttg gaaaacccat 33900
 caacaagtag ggaccgcctt aattcatcaa atctgtctgt gccaccgaag aggttgatat 33960
 agtcatccga ccatttgcca agttctttaa ccaattgggt ggcaccaac gaccaagaat 34020
 cttcgcccat acctaataaa gcggcaatgg accgatatct tcaattaccg tccgctttca 34080
 catccacaat gttgtcaatg aaaccctgta taaatggctc aaattgatcc aacatcggga 34140
 tgatccttgt tggctttggc tggtagaag atgatgtact atgcttcact gaagagttgc 34200
 tactttgaac agaatgaaaa acatcaacat acttctagta agatgggtca cgctttgttg 34260
 atctttggtt tctattcatc ggtttctttg gtgcacctt agtggtgacc tttgacggag 34320
 gaggacacat agagtttga tcagggtatg caatttctcg aagtttattc ttgagagtaa 34380
 ctttaccata aacatcaagt tcttcaaata ttttagatat ggtctcgatc tcttcttga 34440
 tggtgacttc ggcctcacat aacccttgg ctgaaaaact aagtctctc caaacatat 34500
 gtattgaatc tagagggatg ctgccaacaa catacctaca tagctcacat gcacaaggaa 34560
 gaccgtgtgt ggttctcata acacaatcac aagaagaagg attcttgcca gcataatgca 34620

ES 2 582 552 T3

catggtcaaa ctcagcaaca atctcattta aagcatacct tgaaaaccatt ccaagaagct 34680
tcttgtataa ggttttttta aatacatgtc caaccacatg tgtacttggt tcaaatgatg 34740
ctttaatttg agtgttgtag cgtgatcatg ttgttcatgg catcccaaac actatacagg 34800
tctccaagac tattatgtaa tactcttttt aaagctcaat gagcagattc aacctacat 34860
gtgaaacaca caaaaaaca taacagata caataattaa attccatgaa ttcataaacc 34920
ttactagaaa aacttgaaca ttttaatacc tgtttggtgt tgtgttgccct aagtgcacat 34980
ccttattcat ccaggctgta acaaattttt ccttgtgtgg gattatccat gttaccttaa 35040
catagtcaac gaacattagt caaggtgaac aagccatttc aaacttctga aggcactcat 35100
ggaactattg ttcaaaagga caatcaacca gactacccca gacatccatg acatactccc 35160
aagcattttt ttgaccaatt agggatttgt atttggcctt gacattcttg tcaatgtgaa 35220
acctgcacaa caagtttgta cactcgggga acacaatttc cactgcattc atcaatgcta 35280
ggtctctgtc agttacaata attacagggga ggctatcatg tcttaaaaat agacctcgaa 35340
accgtttcaa agccataca acattattaa cacgttcacc ctccagatat acaaacccaa 35400
tagagaatgt catctccgtt ggtgttacct caacaaagtc aagtagtgag agtctgtacc 35460
tgtaaatfff gtagggact gtctataaaa aacaccaaat gacatgcatt gcataacttc 35520
actacatcag ggtgacacca aaaaagatca cgtaccacta cttcatcctt taatttatgt 35580
caatgaatat attgattccg ttcaagaagt tttattagat gttgtatttc agtatcactt 35640
cctctaattg aagaacggta tgcacttctt gcattgtata tttgttttat tgttgtacaa 35700
ctattgacat tgtgttcctt caatgttagc aggatgtttc ttggtttcac cattgacttt 35760
gtcatatcag caataattgt cttctcatcc ttagtcaatc gccaacgta tggatgacca 35820
actaatgatt tcgccaattc atgattatga atcccacaaa tcaacttaac catccaacct 35880
tgccctcaa tcaactagttt cccatgaagc ttgaagggac aaccacattt tctactccta 35940
gtgctcttct aacaaattct ttcttcctat atttatactg accacccctt tcacaaccaa 36000
ttaacacaaa tgaacttctt tctctactac cagtatgtgt gtcagacatc ataatgacta 36060
caacaaattc gttttcatga gcaaccgatc gagcccactg caaaacatca tctcgggtaa 36120
caaagacctt caacacaacc cagacaattt atgttttcta caacacatac attcaatcat 36180
atgactcaaa ataatgaaca ttattaccta agaagtatta aaagcatctg aacaatcaac 36240
atgtggttca ttcacaccac attcttggtc attttcataa tccatatcaa cttcttcaga 36300
cattatatta ttatacatgc attgatcttc gtctatctta acaacaaatc aaaaatttat 36360
acatcataca caagtcattt tgttacaaaa aaaactacac aataaggact acaaaaaaaaa 36420
actaaataaa actttaggga acaactaatt taacataaga atacttcaaa taaatacaag 36480
ttttgcacct aaataatatc attttttact tatactatat ttaacatgta ataatttaat 36540

ES 2 582 552 T3

aattcctaataa taacaaaaaa aaaaattcac tatagggact acaaaaataaa atatcaaaat 36600
ctataactaa caactaattt aacatattac tacttcaaat aaatacaatt tttgtaccta 36660
aataatttaa ttttttactt aactatata caatttgaaa taaataaaca attcataatt 36720
tcataaatat aagcaataaa aatataaca tattaataat taaaacaaat ataaattatt 36780
cacaatttaa aaataaatct aaaaaaaca aaaatttatg gatgaagttc atccgtataa 36840
agcatatgga tgtactacat ctatatgctt tatacaggtg tactacatcc atatgcttta 36900
tacggatgta cttcatccgt aaggttcaaa atataacata ggatgaagta catccgtata 36960
aagcttacag atgaactaca tctgtattct ttatacgaat gaactatatt tgtatggtgt 37020
aattttgtct tacggatgta cttcattcgt atacaactta tgaatttagt tcatctgtat 37080
cttaaaaaata acagatctac tagaacacca gttacccaaa aacgtcagaa aatgtgtacc 37140
tccgccgaaa taaaaccatc actggtaaca ctttcacctc catogaaccg ctacctctct 37200
caacacttac aaaacgacca ccaacgagag aaaccagacc acaataaaca aaatcaagca 37260
ttcaacacaa aacgaacaca acaatactgg tgtaattta aagaaaaaca atgaggggca 37320
ttattgtcat ttttaaaata tgttgatgc accaacaata gtgttgatg cacctaaca 37380
gtctcttcag tgtgccgtgg gatccataga aatatcatgg ttttaaaatc tagactgggt 37440
tggccaatcc aatgatttca aaaaattgat gtgttcttaa attagcttaa aacatttaa 37500
tcggttgaaa agggtaagg gatttaatcg attttgctta aaactttttt tttacccaaa 37560
acaaaacttt caaaaagata tcatttcgat tttaaaaaa ttataactta tgagatcttt 37620
aaatgaaatt tacattttta ttactattaa tttatgcata ttatggtatt tttttcaata 37680
ttactaaaat attatattaa aatactaaaa aaatatttta tcaaaatcga ttcgatctag 37740
aataaatcat ttacccttga actagtactt ttaccgatct aataattggt ctgattataa 37800
aaatattgtg caatattcaa atattatggt cctaattcac tgctcccaaa ccgtcgaaat 37860
gcgtggaatc tcataagttt tgtgcctcaa acaaggataa agaaaattga gaaattaaaa 37920
actattaaac tataagtgat cattattaa aaaataagtg agataaaaaa gaattgtaat 37980
tttaacaaat tttagttaat aatgtgtca caagttgctt ctttattttt taacaattt 38040
tctagcataa attactttat tttaaattta atttgagtta aaattaattt tgcaaaacga 38100
aagtgacggt gaaaaacgta gattcacaag ttgtttcgag gttcacatca ttgacatcaa 38160
tgaattggat atttttgccg tcttgagtaa accgtgaaca gtcgaatatg atcaatcagc 38220
attgaagaat agaatttaa ttccatgcta actagccaac gacatgagaa aaaggtacta 38280
tttcatttat atcacaatgg tacggtggtt ttctaaccct acgaaatatt cgcctatttt 38340
ggctttagt tatgatattt tgtagcaaa acttaaagtc ttcactatta cacttctaac 38400

ES 2 582 552 T3

cttctatatt ctatcgatta gtaa atggttag aatctctgac tatacagtaa 38460
 taaaactcag tcataaacac aaaacacacc cgtttttaac aacgaggaac atggataaga 38520
 aaaatcta attaatat gtcaatttta agaaattatt ttcaccta attatattat 38580
 aatcttacca acaagggatt taacttactt aattaaacat gagagttatt ataatctttc 38640
 tcgtacttat ctctgatttt tacaatatata tttttttata atcttaccgc ttttgaaaaa 38700
 agaaaacaaa agtcctttct gagaataatt tttggatagt gtaacatgga tattggataa 38760
 tacttacgtg ggttaattga ctttgaggaa gaaaaatcac cataacttat catatttttg 38820
 gtagagtgga gaaggagaga aatagacaag aaataagata ggtctcatgt gcctctcata 38880
 ctttctacta cactttacct taatttaaac tagctttgtg tcaa atgtct ttttaagggt 38940
 ttaaatttat tttttatatt ttatatgagt atttttta atttttta attttaata 39000
 tattatta attttagttt aaatttca attttatt tagtagatat gtttaataaac 39060
 atttaaatat atttttatat acacacatca caataataac ctccataaaa atgaaaatag 39120
 aatagaaaa ggatgtcatt tgc atgacca taatgattat acatagaaga actaattcta 39180
 gggagaaaa aactaatatt aaagaaaa taatacaaat caaaacttag aggaagcaaa 39240
 aaaaatcgag agaaaatgaa atgataaaat ttatgatcaa ataagagaag agaagaaaaa 39300
 aaaggtgtgt taaaaaatgt tgataatgaa aattttcacc cacacatata taatataaat 39360
 ataaataatt atttaataaa aatatattga atatatatt ttgaatcaat caattaacat 39420
 atatatatca tattaatgaa gatttaatga aattattaac aga atgataa ataaaatatt 39480
 taattaattt gaattaatc 39499

- <210> 6
- <211> 25843
- <212> ADN
- <213> Artificial

5

- <220>
- <223> C3ntigo-2

<400> 6
 ccgggatca tgttgtgttt cttggtttg tagtgagttc caaaggggtt taagttgatg 60
 aagaaaaggt caaggctatc caagagtggc ctacacctaa aagtgtgacc gaggtgagaa 120
 tttttcatgg cctagtgagt ttttataggc gatttgtgaa ggatttttagt acctcggcag 180
 cacctttgaa tgtgataatt aagaaaaatg tagttttcaa atgggggggag aaacaagaag 240
 aagctttcaa tgctcttaag caaaagttaa ccaatgctcc cactacttgct ttgccaaaat 300
 tttcaaaatc ttttgaaatt gaatgtgatg cttcaa atgt tgggattagg gttgtattgt 360
 taaaaaagg tcatccaatt gcttatttta gtgaaaaatt aagtggcctt acccttaact 420
 attctactta tgataaggag ttgtattcct tagtgagagc gttgaaaaca tgacaacact 480

ES 2 582 552 T3

atctttatcc caaggaatth gtgatccata gtgaccatga gtcacctaaa taattaaatg 540
 gacaaggtaa gctaaacaaa aggcattcca aatagggtga atttcttaag caatttcctt 600
 atgttattaa acataaaaag ggaaaaggaa atattgttgt ggatgccttg tcaaggaggc 660
 actttttgct ttctatgctt gaaacaaaaa tgattggatt tgattgcttg aaagaaatgt 720
 atgaaggaga tgacacattt ggtgaaatct tcaaaaattg tgaaaagttt tctaaagatg 780
 gtttttatag atatgagggc taactcttca aagaaaataa attatgtgtg cccaagtgtt 840
 ctactagaaa cttgcttgtg tgtgaagccc atgaaggtgg gttgatgggg cattttgggg 900
 tccaaaagac cttagataca ttgaaagagc atttttattg gcctaacatg aagaaagatg 960
 tgcagaaatt ttatgagcat tgtattgttt gcaaaaaggc caagtcaaag gtaatgcctc 1020
 atggtttgta tacccttta ccaatttcgg attctccgta gattgattta tcaatgaact 1080
 ttgttttagg gctgcctaga acaagtaatg gtaaggattc catatttggt gttggtgata 1140
 ggttttctaa aatgactcat tttattcctt gtaggaaatt tgatgatact aatcatgtgg 1200
 cggatttggt cttcaaagaa gtggtgaaac tccatggatt accaagaagc attttttagtg 1260
 atagggactc caagttccta agccattttt ggaggacctt atggggaaaag ctgggtactg 1320
 agttactatt ttctactact tgtcaccctc aacacagatgg acaaacagag gtcataaata 1380
 gaactttggg taccttgcta aggaccgttt tgaaaaagaa tcttaaaaat tgggaagttt 1440
 gcttacttca cattgaattt gcttataata aggttgtgca taacaccact aattgttctc 1500
 cttttgaggt tatttatggt ttcaatctac taactcctct tgatttggtg ccaatgccta 1560
 atatttttgt ttttaagcat aaggaaggat aagccaaagc agactatgtg aaaaagctcc 1620
 atgaaagagt caaggcccaa attaaaaaga agaatgagag ctttgctaga caagcaaaca 1680
 aggggcacaa aaaggttggt ttccaatccg gagattgggt ttgggttcac atgagaaatg 1740
 agaggttttc ggagcaaaga aaatccaagc ttcaaccaag aggggatggt ccattttatg 1800
 tacttgaaag gataaatgag aatgcataca agaataaatt gcccggtgag tataatgtga 1860
 gtactacatt taatgtgtct gacttaactc tttttgatgt aatgaagaa gccgatttga 1920
 ggacaaatcc ttttgaagag ggagagactg atgaggacat ggcaatgact aagggcaaag 1980
 aacctttaga aggacttga ggacctatgc caagggctag aacaaagaag gccaaaggaag 2040
 ctcttcaaca agtgttatcc atgctatttg aatttaggcc caagttacaa gtggagaagc 2100
 ttcagattgt caattgcacc atgttccaag aaaagtatag ggtgccacct ttgttgagcg 2160
 gttttattag cattttgtta gttgaaataa aggcccaaac ttgtgttaaa gtggttgtca 2220
 attctctttg gattttcacc acctatgggc ttgttttaat ttaaagaaat taaggtttaa 2280
 taagggtgaaa actctaggct tgtggtgcc tcttggtga ccaagagcta tgcatttttc 2340

ES 2 582 552 T3

cacatgtttt tgtgtcttaa ttctagttta attaggtata atgacatcat caattgttgt 2400
tattggtgat catttgtcct aattctagtt ttaattaggt ataatagacac catcaattgt 2460
tgttattagt gatcatttca tcttctcact tgtgtaacca acttgatgtc attcctattt 2520
atgggttgca cattttctaa taaaaaaca gaccttgaat tgagttttaa tcaccttcta 2580
aagtatgaga gttgaagaag aaaagctatc ctaatgtttt gatgatgcca aaggaacatg 2640
cttttcaagt tttattcaag acaataatcc aagatatcca agaaattcaa gaaatatgat 2700
caagataaatt tctagagtct taggatgaaa atttcaagtt gaaacaaca aaggtttggc 2760
caaaggattt aacttaaaat gttttttaa gaattttact ctctggtaat tgattaccaa 2820
aagatgtaat cgattaccag tggatcaatgt gctttctaaa aagcttttaa atgttttaa 2880
atattttaga aagcatgtaa ttgattacca gaggtttgga acgttttaa acagccttaa 2940
agaaatttga atttaaatta caagttatgt aatcgattac aatgaattgg taatcgatta 3000
ccagtcttaa aaattcaaat ttcaaagtga agagtataa ctcttcaaat aaataattgt 3060
gtaatcgatt acaccacaat ggtaatcgat taccactgag aatttttgaa aatggttccc 3120
aacagtcaca tctttgcatt taacttttga atggccatca aaggcctata tatatgtgac 3180
ttggacatga aattttctca gagtttttac tgaccaaaaa gtcttatcct ctcaaagaa 3240
caaattgtct tatcttctaa aaattccttg gccaaaacat tttgaattca ataagaaatt 3300
atgtgagtgc ttcattgtac aatctgtctc ttgcaagaga gatttctct tctttttctt 3360
cttgctcaag aaaagtgatt aagagatcga gggctcttg ttgtaaagtg atctgaacac 3420
aaaggaaggg ttgtccttgt gtggttcgga gattgtaaat tttttttaca agatagttaa 3480
aatctcaagc gggttgcttg aggactggac gtaggcacat ggtgtggccg aatcagtata 3540
aactgagttt gcactttctc ttcccttaa cttctttatt tattgttatt tatcttttgc 3600
attaaggaag tttagtttga attgtcttat aataattcat aataagggtta cattgaaact 3660
ttcattaaag aagagtaaaa tttttaattg gggaaatagt ttgtgatatc ttaattcaac 3720
ccccccccc tcttaagata tttgagacca cttgtctaac aagagtgaat ctccatagtt 3780
acttaagtga ttcaagaaat tggtttatca aggaacacca ccttgtgtgt gacactaatt 3840
ccgaaggagt gattcttcca accactttct tcattctcct tatccattcc attttctaaa 3900
tttcatacaa aaaaaaaga aaaataaacc tttgaagatc catcctcaac tcttgtgcac 3960
atgggtttac atcatttttg tgacaccctc tatccaaca tatatataaa taataaaat 4020
atattggtaa acaaaatcac atgggtaaaa gggtcacatt cacttcaatt accaaataaa 4080
actcattaaa aacatattog gctcaaaata aggcogtcaa aatttcaaaa aatattttgg 4140
taaatcactg aggtgaaata aatatagacta acatcataaa attaacataa aaatttatat 4200
cccaatgtca catcttatca gagtgttgtg tcccgacgtc cttcaacaca atattcotta 4260

ES 2 582 552 T3

aaacagttca cctagtcatc tgctccccg | acacaaaagt tcaagatcat cacaggatcc 4320
 aaacacaaat agcaaactgg gaggtagtta tcacattcct aactaataga gaaacaagac 4380
 aactagatat acatatcata taaacaaaat aaaacttact tacacgtaat tccaccactt 4440
 tgtcattcaa agttcacttt tcatccatca atcacacttt tcaatcatca atcacattaa 4500
 acaagaatca cacgctctga tcaagacata ataacacctc aatttcataa taaacaatta 4560
 gcaagcgcat gagacaatta tgctaagact caagcctaca tgcaatgtgg taccatgtca 4620
 atgaaaaacc accatgggac gcttaggagt atataacaag acacaccaca caatggggtt 4680
 gtcaggtcac tctcactaag taagatcata gggagaccag tcagggtcac gatgttttgc 4740
 gagaatgctc caaccatatg ggatcagcat aggcttaaag gagcactcaa acccgggtgac 4800
 cccaaggcc tacactccga agagtccgctc agggcctctc ctttctaatt gaggtccaac 4860
 ccctaaaatc attttagcac acagacactg cttgtgaatt atacaatatc cacgaacctca 4920
 cactcgtgctc ttaaacacgt acaacatatt gcgctacaat ttaacactgg ttccctaaata 4980
 ggaacctaca ctttctcttt acactgcgca tttacacttt tctcaagata acactggctg 5040
 actttgatat gtaactgggg taaatgtttt tatgtcccag gttatgtctg ctttgcccac 5100
 agttgaattg gaccctccta caatttccat gacttttggc gtaaacgact cccattggc 5160
 tggctcgtgat ggctctcatg taattgggtg ttgttttgtt ttacttttac tttcttttgc 5220
 ctccctcatt tgcttctgta aaaaacattg ggttgggtat gcttctcaa tcccagttca 5280
 gaactaccct tttgttctct ttgaaggctc attctctagt ttttgcataa acagtttttt 5340
 atgtttttac ttattgggta tcttatagag taaatagact aatattgaac tttttgtagt 5400
 tgactggggg gagaattggg gaccgattga tggctgaagc tgaaaccaac ctgcataa 5460
 atgtgcttcc aggttatca gaatcattg aagttcaggg aagaggagag ctacagctgg 5520
 gtttgttcc ttttcttga aattgcatga tctgatgatc ctcaactgta ttatatgcat 5580
 ataaaaacc catgatttgc tgtgcttaca cagctgatta tggcatctt attaacaggt 5640
 attttaattg agaatatgag acgtgaaggg tttgagttat ctgtctcacc acccaaagta 5700
 atgtgagttt tcaaggactg aacaaggctc caaatattt gtctcattat cagtttttac 5760
 acaatgtggg tttgcttgcc tagtgctaca tatggatgtg gcatgctatt taaatattga 5820
 ggaaatgttt taatggaaac tttgtatgca ttatttcatg ttttaatgga agcttgaatt 5880
 tttaaactcc caagaaaact taagctatth ggtggaggct tgggttatgt atctccaaca 5940
 tgctccctct agcaagagct ctttgggctt gaataatgag tcatgaccaa tacacgtgctc 6000
 catttaccgt atactgaact cagtttatat gtaaaaaata tagactacaa gaatttaata 6060
 cttgagtgct tggatcataga agtctagat cacattagac ttctttgaaa tcatagaagt 6120

ES 2 582 552 T3

ctaatgtgat aaaaaaacta acctaataact cctatttaca aaaacactaa actattatag 6180
 gtcttgata agtctgctac ataacaatga taacataaca tattaataag actcctgaaa 6240
 ctatatgatt ctaataacaa atgcagaagt tcatgaataa catccaataa gcagtgctc 6300
 tgagcatagg tttcgaaggc atgtcattta tttttgcatt atgtgcattc attctgtatg 6360
 aaactttctt gtctaattga tcttgaaagg tctaccatt taaaatgtt gatctggcaa 6420
 attttttat aatgtttggt ggttcaatat ttctgatttt gaaatgatat attatgcatt 6480
 ttttgagttt gagctcaact acctttttca ttttctttt ttctttttat actggtttat 6540
 tgaacgtttc tatggattta ttaggtataa aactgaaaac ggtcagaagc ttgagcccgt 6600
 agaagaagtt acaattgagg taattccact tgccttcat agtatgctt ttcaagagtt 6660
 tggacttcta acatcataat ggatctattc caggtaaag atgagcatgt tggcttgata 6720
 atggaggcct tgtctcatag acgagcagag gttacagaca tgggtcctgt ctccaggaact 6780
 gttggtcgaa ctagattgtg tttgacttgt ccatcaagg tagcttggtt atctttctct 6840
 tgtattgaac ttatctctt gatttgttc cctcccagca cttaaagtt attaagttg 6900
 atattgtatt atcataggta aatatataac tatttaatgg gaatactata gatgcatgtt 6960
 tttgaagaaa tcgcattaag ttatttgtt cttattatcc tttgcctgtt ttggaggggtg 7020
 atgataacct ctttccatcc tagtggtagt ggctttctaa aataacctt ctccctagaca 7080
 atcaagaaag agaaacaaga gaataatctc taagtgcctt ttcaatttat tgacatcagt 7140
 ttaacactca attataattt ttatatagtt tttatatctc tcaaaaatag cttttggtag 7200
 cgtgattgaa tccagaaggc ataactcact aatacataat ccagatttct ggttgcttcc 7260
 gtactgtggt tggatcccag agatataaatt tctttggcat tatggttcta gtgaaatctg 7320
 atcttatgaa gcatgcaagg aatttagtaa cttccttaat gctgtttgt cagggggctg 7380
 gttgggtaca ggagcgtgt cagcagtgac acacgtggaa ctggattcat gcatcgtgct 7440
 ttccatggta tgtgttctct gcttaaaatt aatatcttt tcttccaact ggcatgtaat 7500
 gatatgcaa ttttcaatt gtttctata tgttctgcaa atcatgttta attgccccca 7560
 tgagatttta tgttagcagg gctttgttgt ttcttatttt accatccaca gtttgtttga 7620
 gcctttccct cttgcaatgc agcatagttt atcgtctgat gtctttttta agtattttat 7680
 tttttataat tgcattttat tgtaatgttg cagcatatga aaattttcga ggccctcttg 7740
 gcaatgtcag gaaaggagta ctggtatggt tgggtggtgt tattcttact taaaaggggt 7800
 taaaaataat taaattacac tgagttacta cctactcaca tgatatactt ctgtgtttca 7860
 aattatkaa cttgtattga gtgtggttct atttcttgtg gaatgctgtt tgcttaattg 7920
 aacaggtgtc aatgggtttt ggtacaatca cagctcatgc actgatgagc ttagaagctc 7980
 gagggactct ttttgtcaag ttgtattata tggcaaacia ggtcactatc tatcttctt 8040

ES 2 582 552 T3

ctgtgtcttc	cgggaagttc	aagatcaaga	attatatgag	agcataaata	gtgaagttcc	8100
actatggaaa	aaaagaacaa	agtttaatac	aagaagaaat	caacagggga	ttgtccttta	8160
ttaggtcctt	gaataattgg	caaatttggg	tgggaaagga	gcaaaaagac	agattttcca	8220
aaacgcctc	cttgtaccaa	tgaaattgta	cgtaacatta	attggcccc	aaagaaataa	8280
aagtgaatgt	ttattctttt	aaaagtcaag	cacactttag	ttacctgtt	atgatgtgac	8340
taaatttact	tttagaaaa	tgagcgagta	ataaatgggg	gtgttgaaag	agtgtattat	8400
taccgtttct	ctttgaaaa	ttatgaccac	ttttttttt	ttttataaag	tgtatgtgac	8460
caccttgg	agttatggag	taccaaggaa	agttatcgac	aagtcataaa	atttaaattc	8520
aaatcttgg	ctcaaaagga	aaaaaatgt	tgataathtt	gttgctacaa	gttaatgtaa	8580
aagtttttac	atgattaatt	aactattaaa	aaatcacgtt	aggtatatat	gtttcatcac	8640
gtaagaaact	attggattta	agttgggttc	catagttttc	catagttttc	atgtaaaaaa	8700
atttaatgag	agaaaatccg	tgtcttgaat	ttttaagtaa	tttttatggt	tttcttttag	8760
tcccaacatt	aattgggttt	catagttttc	atgtaaaaaa	atctaagag	agaagatccg	8820
tgtcttgaat	ttttaagtaa	ttttcatatt	tcctttccca	acattagttg	ggtttcatag	8880
ttttcatgta	aaaaaatcta	atgaaattta	atgagagaag	atccatatct	tgaatcaatc	8940
aaagaaagtt	caaatcatg	tttcaaactt	gaaaatggtc	aatttttcaa	aaaaagatca	9000
atgtgctata	aaagccctct	atgttggctg	ttgagttctg	tttggaatat	caatgctcag	9060
cattaataaa	agggcctata	acaaattatt	aatactatgt	ctaataatatt	cactagtcac	9120
gtatttacta	gtcatgatat	caaagtacgt	attccttgat	atacttetaa	acccgattct	9180
gctagtatcc	tctgggaag	gatctctact	tcaaatggga	gtaccacttc	cattccataa	9240
accaaggaat	acggtgttgc	cccagtagaa	gttcgtactg	aagttcggta	tccatgcaag	9300
gcaaaaaggca	acatctcatg	ccaatctttg	tatgatactg	tcaccttctg	aataattttc	9360
ttaatattct	tgttggctgc	ttccaaggct	ccgttcatct	ttggccggtg	ggcgtggag	9420
ttgtgatgct	ggattttgaa	atccgcacac	atttccttca	tcaccttgtt	attcaggttg	9480
gtgccattgc	cagtaataat	ctttgtaggg	agtccatacc	gacaaatcag	ctccttcttt	9540
atgaacctga	ccactacact	cctcgtgaca	ttggtgtaag	aagccgcctc	gaccacttg	9600
gtgaaataat	ctattgccac	gagaatgaag	cagtgaccgt	tcgaagcctt	gggctcgatg	9660
gccccgatga	catctattcc	ccacatggaa	aaaggccaag	gggtggacat	gacattcaaa	9720
ggatgtggcg	gagcattgac	attgtccgcg	aacgcttgac	acttgtggca	tttcttaca	9780
tggacgcagc	aatcaccttc	catggtgagc	cagtaataac	ctgccctcag	gatcttctctg	9840
gccatagcat	gccattggc	gtgcgttcca	aacgaacctt	cgtggacttc	ctcgatcatg	9900

ES 2 582 552 T3

tggttcgcct	ctttggcatc	cacgcatcgc	aggagagtca	tgccatggtt	tcttttatat	9960
agtatgctcc	cgctcatgaa	gaaaccgacc	gccaatctcc	tcaatgtcct	tttatcattg	10020
tcggaagcct	ctggtgggta	ctatttgctt	tcgacatatac	gcttgatatac	gaaataccaa	10080
ggcttaccgt	cccattcctc	ttccacctgg	caataatgtg	cgggtttgcc	acgacaccag	10140
aactcaatgt	atggtagatac	ctcgtgcggc	gtagctgga	acatggacgc	caaagtggca	10200
ggtgcatcag	ccatttgatt	ttcctcctgg	ggaacatgat	ggaaggagat	ctcatcaaag	10260
gaattagcca	tctccttgat	ataggctttg	taaggcatca	gcttggggtc	tttagtttcc	10320
cattcccctc	ttagctgatg	gatcaccaac	gctgagtccc	cgtacacctt	gagtagcttg	10380
acattggagt	caatcgctgc	ctggacgacc	agggcacatg	cttcatactc	agccatattg	10440
ttggtgcagt	cgaaccccag	cctggctgtg	aaaggtatac	attgattgtc	tggagagacc	10500
aatactgctc	caatgccatg	gcctagaaca	tttgacgctc	catcaaacca	cacggtccat	10560
ttgtcccggg	ccttgtctag	tttttcctca	aacaaggcca	tgatgtcctc	atccgggaat	10620
tcgggatgca	tgggctgata	gtcgttgaga	ggctgctaaa	ccaaataatc	tgctaaggcg	10680
cttcctttta	tcgccttttg	ggcgacgtaa	actatatcaa	actcggatag	caagacttgc	10740
caccgggcga	tccgtcccgt	aagagttgga	ttttcaaaga	tgtacttaac	cgggtccatc	10800
ttggatatca	accaggtggt	atggcttagc	atgtattgtc	ttaggcgatg	ggatgccag	10860
actaaagcac	aacacgttct	ttcgagcagg	aagtaattca	tttcacaggc	cgtgaacttc	10920
ttactcaagt	agtagacatac	gcgatctttc	tttccggact	tgtcatgttg	cccagcata	10980
catcccacg	actcgtccaa	aatcgtcata	tacaagatga	gaggccttcc	gggtaccggt	11040
ggcataagca	caggaggatt	catgagacac	tttttgatcc	tcccaaatgc	ctctcgacia	11100
tcctcattcc	aacggtcggg	ttggcttttg	cgtaagagtt	taaacaacgg	ctcaciaaata	11160
gcagtgagct	gtgatatgaa	tctggcaata	taattcaaac	gtcccaggaa	acctcggaca	11220
tgcctctcgg	tacgggggtc	cggcatctca	aggatgacct	tcaccttttc	ggggtctacc	11280
tctatccctt	tttggcttac	gatgaaacct	agcaatttcc	ctgatttgac	ccccaaaagtg	11340
cacttagcgg	ggttcaacct	caattgatac	ttcctaagcc	tttcgaacia	cttctgcagg	11400
ttgacaagg	gttcctcctc	ggatttagat	ttggcaatta	tgtcgtctac	atagacctca	11460
atctcttgg	gcatcatatt	gtggaacaaa	gctaccatag	cccgttgata	agttgccccg	11520
acattcttga	gtccaaagga	catcaccttg	taacataaca	ttccccacag	agtgcagga	11580
gtagtctttt	ccttatcctc	tggcgctatac	tttatctgat	tgtaaccgga	gaacctatcc	11640
atgaaggaaa	ataaatcaaa	attggccgta	ttatccacia	ggatatcgat	gtgcggcaaa	11700
ggaaagtgtg	ctttgggact	ggcccgattc	aggtcccgat	aatccacaca	cattcgcaca	11760
ttcccatcct	tcttagggac	tgatacaatg	ttggcaacct	attctgggta	ccgagcgaca	11820

ES 2 582 552 T3

gccaaaaacc cggcgtcaaa | ttgtttcttt acctcttctt ttattttcaa ggatgtctag | 11880
 ggcttcatcc ttctcagttt ctgttttacc gggggacatt cgggatttag gggtaatcgg 11940
 tgttgtaaaa tgtcagaact caaacggggc atatcttggg actaccaagc aaaaatgtct 12000
 tggtagtctc ttagcagggc tgtaattct tcacgaatgg gtgcgggcat acccgtgcct 12060
 atctttactt ccctttttcc actaccagtt cccaagtcta ctagttctgt ctcttcttga 12120
 tgagggtccca tttcttgggc ctcatgggag actatccttt ccaaatatgg tccatgggta 12180
 catgcatggt taaattagggt ggccaacttt gttgtgaacg atagaatatt tttttatatt 12240
 aagtaaaacta tttttatatt atgaaataat aataaaaaaa atattttatc attattaaca 12300
 aatcatatt agttaatttg ttaactctat aataaaagaa atactgtaac attcacatta 12360
 catggtaaca tctttccacc ctttcatttg ttttttgttt gatgactttt tttcttgttt 12420
 aaatttattt cccttctttt aaatttgga tacattatca tcatatataa actaaaatac 12480
 taaaaacagg attacacaaa tgataaataa taacacaaat atttataaat ctagctgcaa 12540
 tatatttaaa ctagctatat cgatattgta aaataaaact agctgcattg atactgataa 12600
 aaaaatatca tgtgctttct ggactgatga tgcagtatac ttttgacatt gcctttattt 12660
 ttttttcag aaaagctttc ttagttctgg gttcttcatt atttgttcc catctccatt 12720
 gtgaattgaa tcatttgctt cgtgtcacia atacatttag ctaggtacat gcattgggtca 12780
 gattcacggt ttattatgtc atgacttaag ttcatggtag tacattacct gccacgcatg 12840
 cattatattg gttagatttg ataggcaaat ttggttgca acaatataaa tataaataat 12900
 gtttttatat tacgaaataa cagtgatcaa acaaacagt tttatcttta ttaacaagat 12960
 tttgttttg tttgatgacg ttttttaatg tttacgcttt ccccttctt ttgaatttag 13020
 aacactttat catcataaaa tcaaatacta aaaaaattac atatttcata aataataaca 13080
 caaatatttt taaaaaatct gaaataataa tgaacaatat tacatattat cacgaaaatt 13140
 cattaataaa aatattatat aaataaaatg taatagtagt tatatgtagg aaaaaagtac 13200
 tgcacgcata atatatacaa aaagattaaa atgaactatt ataaataata aactaaatt 13260
 aatggtgaat catatcaaaa taatgaaaaa gtaataaaaa tttgtaatta acttctatat 13320
 gtattacaca cacaaataat aaataatagt aaaaaaatt atgataaata tttaccatct 13380
 cataaagata tttaaaataa tgataaaaat atagattatt ttttatgcaa ctagctagcc 13440
 aaaaagagaa cacgggtata tataaaaaga gtaccttaa attctactgt acttccttta 13500
 ttcctgacgt ttttatatca agtggacata cgtgaagatt ttaattatca gtctaaatat 13560
 ttcattagca cttaactt ttctgtttta ttcctatcct ataagtagtc ccgattctcc 13620
 caacattgct tattcacaca actaactaag aaagtcttcc atagccccc aagcggccgc 13680

ES 2 582 552 T3

tgagtgattg ctcacgagtg tggtcacccat gccttcagca agtaccaatg ggttgatgat 13740
 gttgtggggt tgacccttca ctcaacactt ttagtccctt atttctcatg gaaaataagc 13800
 catcgccgcc atcaactccaa cacagggtcc cttgaccgtg atgaagtgtt tgtcccaaaa 13860
 ccaaaatcca aagttgcatg gttttccaag tacttaaaaca accctctagg aagggtgtt 13920
 tctcttctcg tcacactcac aatagggtgg cctatgtatt tagccttcaa tgtctctggt 13980
 agaccctatg atagttttgc aagccactac cacccttatg ctcccatata ttctaaccgt 14040
 gagaggcttc tgatctatgt ctctgatggt gctttgtttt ctgtgactta ctctctctac 14100
 cgtgttgcaa ccctgaaagg gttggtttggt ctgctatgtg tttatgggggt gcctttgctc 14160
 attgtgaacg gttttcttgt gactatcaca tatttgcagc acacacactt tgccttgctt 14220
 cattacgatt catcagaatg ggactggctg aaggggagctt tggcaactat ggacagagat 14280
 aagcggccgc gacacaagtg tgagagtact aaataaatgc tttggttgta cgaaatcatt 14340
 aactaaata aaataatcaa agcttatata tgccttccgc taaggccgaa tgcaaagaaa 14400
 ttggttcttt ctcgttatct tttgccactt ttactagtac gtattaatta ctacttaatc 14460
 atctttgttt acggctcatt atatccgtcg acggtaactt ttacttagat aatattttct 14520
 taaaattcaa cattaaattg aaagtctatt tgacataaat ctcatatgca aaattttata 14580
 ttaatcaaaa atcattttac ttcattcata taaattaata ttgatataat ataaatattt 14640
 taaaatacac taaaatatag atcaactaat tatctattta ttgttattaa attttgataa 14700
 aatttaacat aaataatctt aataatatat agatataatt caacaactag atcaataaaa 14760
 attacatttt atattatact aagtaataat ataacagcta gatcttaata gtatattgat 14820
 atatatatat atatatatat atatatatat atatatatat atatatatat atatatatat 14880
 atatatatat aattttgaga aaaggaaaat tctgattaaa aaattgaagt tacatcttac 14940
 ttctacgttg tgagttttag cttttgattt tttttaaaca ccaaagtgt ataaatattt 15000
 taataaataa atttaattaa agaaatttaa aataatttat aataaaatct tgtattatat 15060
 tggttatcta attatcatat aatgttgacc agtcattgca aaaatcatgt catgacaatt 15120
 gttagtgatt atcgataaca tttggagggga atcagattat atatctttaa agcttcattc 15180
 taaacataga atttgctata aaaaaatta caatttaagt ttaaaatcog atattttgtg 15240
 tccaagtttc tcaaaattat agttaagata ttgttgtcaa atttgattcc aacaaattga 15300
 atactgattg aaatttactc actaattaaa tggaaactaa ttgagtccag attttaattg 15360
 attcaagcct tcaagttgaa agcgcataac tgatcattca tcacaaagaa ctcattacta 15420
 gtgattgact taagtgtctc acatataaaa tatctattgt ttgaattaaa aagaaaagtt 15480
 atctatggaa aaaaaatatt cacacaaggc taaaaacaat attcacacaa cttattcgat 15540
 tttgatagta ttatagctaa caacattttc tttcttttaa gtaatgaagg caattatata 15600

ES 2 582 552 T3

ttttttatac ataattatgt ttgatatgga tataattatt atgagaaaaa ttcttcgttt 15660
 aagtatttaa gtttggacta tctcatgtta attaattatg tgtttaatga caacaacggc 15720
 atatttaata agtttaattg tacattttac tactaacttt tattattttg taaattgtat 15780
 tatccaaact tttttcacga attgaacttt atcacccata ttttcaattt ttgtatattt 15840
 agccatgatg acatgctatt aaaaaagtta tcaattttta tgaacaaca ttgttttggt 15900
 atcaacatga tcattggctg atttagacat ttttcatggt aggggtaaga aaaaatttct 15960
 aattttttca caaattaaat tatcacaagg cactacaaaa tatataatat catgataaaa 16020
 gaaatctaca gttaaatttt tacacgttat aattgtcctc tacatatttt catattttga 16080
 aagtattcta tgattttttt attgtcaata ctaatttagt atgtgaaatg taatgtcttt 16140
 cgttaaaata attagcacta aatattattt aatcataatt tctttatata aagaacacaa 16200
 taaaagaaaa acacgtactc ctaaataat tatgccatga aagttttgaa aaggaatgta 16260
 ttttactcac ctctagaaga agtaattgag ttctttgtta tttttgtctc gatagagttt 16320
 ctttcatttt tattctttct tctcaatcct tgagaatatg aataatgtca agagaaatat 16380
 tttattttgtg tgattctaga aaaataaatg atctattctt atataaacgt tgtacttaat 16440
 ttgaaattat atctttgaga ttgaaaagg t atgtgcttta ctcacatatg gaagcaagta 16500
 attgtgttct ttattatttt tgtttcaaca aaatttcttt cctttattat ttcttctcaa 16560
 tcttagagaa actcactaat gtcaagaggg acaatttatt tgtgtgattc tagaaaaata 16620
 aatggtctat tcttatataa gtgtaatagc taatttgaaa ttatattttt gaaatttatt 16680
 taactaattt ttctttattt cttattttta ttatttttat ctgatctaat atattattat 16740
 attatagttt ttaaaaaaat aacaatataa tatattaaaa taatttaatt tatacattct 16800
 tttactaaaa tatatattta gataatcttt atctaaataa ttattaaatt atttttggga 16860
 tgttatacaa aacgggtgat tctattctat gtagtgtggg gtgttttttg ttgtgttact 16920
 gtaataatac tgaaaattga gataaatgcy ttggacttta acacgaaatt tttatattga 16980
 atggattatg tttatttgag ttttacgatt aagaaaaatc caatgaggta atatatattt 17040
 ttataggggg gatttttttt atatacatta accaataaaa aaaatatatg atgcatttac 17100
 caatgaacat gatggtaaaa ttaatgcaag aaaattgaaa acattagttg taaaattaat 17160
 gggcaaaaac ttaaatgata aaatttataa aattatgata gccaggtggt aaaatgtgaa 17220
 attaataaat aatttagttt ttaaatataa cacacactca cacatacttg tatttttagtt 17280
 agtatattgc tcatgataaa tattttttaa aaatcaaatt tataataata aatgattttg 17340
 aaagtcaaaa tgatcctgta gtagagattt ataataaata tatttgaata tatatacata 17400
 tatatattgt ttattggatt tataataatt aatttaaatt atgatataaa gttataatca 17460

ES 2 582 552 T3

actattgata attttgcttt atagatattc ttcaaattta atttaaaaat aagataaaag 17520
agagtttatt gaaaaacacc atcaattaag aagattaaat atatagataa taatagaaaa 17580
agattgtagt ttgagatact tgagagaaaa aaattctaga tagatgtgaa attattgtat 17640
aaaatacacc tccaaaaaga aaaaaaatat atagaaaata atatatatta gccctcaac 17700
atctttctct tcttttctat attaacacct ctatgaaagt atgacacaat gatcctccca 17760
aagtcgcatt taaaatatac atatcaaaat gctagtagat ttatacatga ataaatctat 17820
gatacattat tagaaaatag acttttaaca tcagttatta aagactttta atattgttta 17880
ttaattcatg ctgaaactac cgatattaaa agtatcaatg ttaataaaaa attttataaa 17940
aattgatggt gttgttttct tttcaccaac atcagttttt agaaaaatcg atggtgtcag 18000
taacaacaa catcaatttt tataaaaaatc gatgttggtt ttcacaacaa tatcaatttt 18060
tctaaaaaaa tgatattttt tgaatttttt taatataccta tccatttttt aattaccaat 18120
tctaattatt catatcaagc ttatcaatta aagttgtaaa taactctaaa aataaaccaa 18180
acttataaac aaaatatacc accaagagta catataaaca aaaatttaca gataatagta 18240
taatataatg taatttaatt acaaacaaat ccaaaataaa aaagttagaa gttgtatctg 18300
agaactcaa taccagcttg caaattttat gattgtgcaa aagtgcttca tctatttcca 18360
atctttgtag tcttctcca attattataa acaatcttgc actctgtaat cccatccaaa 18420
ttcagatagg tgaaacatac ggctttcata aatgagtaca tggactcga cacattctaa 18480
aattaacatt aaattcatct tagatatgta tatgatttta aaatttgaca tacagatgag 18540
tgtttaatta ctcaacaaat tgttgcaagt cactttatac tcactcagca ggactttaaa 18600
agtgatcaag ttaggaactt ggtggtacaa agagtgttat ttaggacaag cttttggttc 18660
agagttcctt ttaaaaatgg taaagaagaa aacactttgc ccaaaatggg tcatgattac 18720
ttgataattt acagtgagtt catagaaatc tttgagtttt gttcatccag ccaatatagt 18780
tggattcacc agatttggtt gtatgtaaca aagtgcattg tgccattact gtctacccaa 18840
tgccaagtat gctctagttc atccttgcca ttactgtcta gcagatgcca agtatgctct 18900
agttcatcct ttcattctac agaaaaagga tctactcaat tcaccataag actacgttta 18960
acaaagaaac taatataagc aaatgtgta tatcatgtca tgtttatttg aaaatagtgt 19020
tgaaatttct aacctgatcc ataatatgaa ctatgttgaa catttcatct aattttttgt 19080
taatcttcat cattgtttta gtcattttct tccaattcta ttaatcttca ctcatcattt 19140
gtaaaactcca tttacaatgt aaaagttact attaaaaata aatatatgca tccctaccta 19200
ctagtagtaa accaagacat atgagtttgg tcgagtacat accacgaagt tgaaagacac 19260
agtgcatata tctatttttg aaaatcaaga atgatattcc tattttgaaa aaaaaattgg 19320
gggcttcagg ctttggtcaaa attctcacac cagcgcaag tctcattaac aagtattttc 19380

ES 2 582 552 T3

atggttagtaa tgcgcacaaa gtctcattat cggatattgt atatccagaa aataacacat 19440
gctttcaaca acatacacag aaacaagcat tttcatgtta gtaatacgc cattaacaag 19500
aacttttcat gttagtaatg cactgaacat ttagattagt gaccgagaag attgactaac 19560
ctttatagaa acaagtatat atagaagaat aacctttcat gcccaagaat gagaatgaga 19620
gtgggtagag ctgtgagtga gagcaagaat aagagcgcga gagtaagagc gagaacaaga 19680
gagagaggggt gagagttaga gatgacgagt gtcggtgcac tgccacagag agtgcgtagag 19740
agtaagaatg agaacgagag cacgagaatg agagatgatt caaagagaaa gtgagaagag 19800
gaagaaacaa atttaattta acaaacacaa cattggtttt ttaaaaaact gacgttaaca 19860
taatttcggt aatatcagtt ttttcaaaaa ccgatgttaa catagtgatg ttatatccat 19920
tctttctagt agtggtaggt aatgtacaaa taaaatggtg attataaagc accaattaa 19980
ttaatctata tataaatgaa tataatggta tcataactaa ataaagagct ctaacactac 20040
taacaagac tacaataaca attttaaaag actttcaata atggttttga aatgatatta 20100
agatcattgt cattaaaaaat taaacacttt taatgatgat ttttaaaata ataacacctt 20160
ctatattgat tttatctaaa atcaatgtaa aaagtgtgat aaaatgttta aatatatcaa 20220
cgctctatat aagttgtgta aatattatta taaaaactaa gaattttatt caagaaaaag 20280
gaaaaaaaaat attattataa aatttagacc taatcatcaa gtgagaaacg atggaacata 20340
aaatttacia aattttattt aataatttat tggatggaat gagatatgga gaagggacta 20400
ttaaataatc aaaatgtag ctgttttact cactttttgt gggtgggtga tagacattga 20460
aactagacat gacaatgagg tgtggcgagg acaagtattg tctcccaat ccccgatttc 20520
aactctttcc caacatggtt ccatacccgt atccgatact cgatgggtta aaatttatta 20580
ttccatctcc gtactcgttg ggtatcgggt atccccgacc ccgttccgta ttagattcaa 20640
attagaaaaa taattttttt ttgtaaagaa aatattaaaa atttgatttt agaaaaata 20700
aattgattga tatacattta tttttaacta cttatatatc aataaattta ttatagtgca 20760
tgtgtctaca aaaaccatta agaaaaaat gttaaattat gtaaaaattc taaaataaaa 20820
ttaactagta ataaaaattc tatacctttt gattaaatta tgcaaaaatt caaaaattaa 20880
gtggcgggac aggtctgggt tcgaggctga ggtagacgta gtaattccat acccataccc 20940
gacttttgat tatcgagaaa aatctaaacc tgaactcata accgatcaac tcggatatta 21000
tagtgcattg gtttcaaaa atcattaaga aaaaaatggt aaattatgta aaaattttaa 21060
aataaaatta actagtaata aaaattctag gccttttgat taaattatgc aaaaattcaa 21120
aaattaagtg gcgggacggg tctgggttcg aggctgaggt agatgtagta attcaatact 21180
catacccgcac ttttgattat cgagaaaaat ccaaaaccga acacataacc gatcaactcg 21240

ES 2 582 552 T3

gatattaccc gtcaaagtcg ggaaaaatac ctacagatgc gggttttctt gtcttaaaaa 21300
agttgcattt caaatctccg gttttaacgt agttattatg ctgtaagtaa aataaaaaat 21360
aaaaaacat catcgtaatg gtttcaaatt atttgattcc actttttcct ttcgctttgt 21420
tctccgatca ccactttaac ttcctttctc tgtcgtcatt accgattctg atgatattgt 21480
cgtcgatcta ctccattctc tatctgatct cttgaaagtg aaaaatacag tcttgtcaat 21540
gcgacattac atcaagactt gatgacgcga tgaggataaa tgtcggggtg atgggtgcaaa 21600
tctctgcaa tgtagcaagg caccgaggcg aaacaaaagg tagcttgtga gtttgctgaa 21660
atggaaaagg aagaaattgg gttaagggag acacttgact taaagatggt ttaatctaaa 21720
tttaaatac aaatcttatt aatacacatg gcattggtgg gataggaaat ggacaagttt 21780
ggagacaggt gatttcatta atcccgttt tagatgttaa ttattccctg caaaacagaa 21840
atgtccttga agcaaataaa tgcaacatta ttaaggagga gggttattat ttttaaagtt 21900
gtattattct tctttatggt tttttataa tattatctta tatattgttt ttctatctct 21960
ctaggatcaa atctcacatc ttattctgct ttcgaaaaat cttaatgtct atcatatctt 22020
gggacgaatt ggggtgaaag aaagaaaaag aaaaaataa agatagataa aaataatgtg 22080
aaatagtact atgatggaaa agaacaaaga cataaaaaag aaaacaaatt aaaattaata 22140
atatgaagaa aaaagtgaac aagagaatat attaacacct caacatcttt ttcttctttt 22200
ctatatcttt tagctattaa gaaaatatca tatgaataaa tttctcttat ttttattaat 22260
aatacataat tgttgataat agcaattgaa tttttcaat aacatatttt aaatttagag 22320
tctgaatata ttcagtaaca tttacttgaa ttgagttcga ctatgacgag ttaaactcat 22380
aaatatattt aatagaattc agctttaatt atggtttaaa gtatttttat attaaaaatt 22440
aatcaaaatt agtgtcttta aagataaagt ggcaatggaa tttcgtctca cacagaccac 22500
agtctcatga aaattacaca gcattgattc acaattaata gaggtgtatt tgtttgtggg 22560
gggatgatgc cacatcaaca tgctcaaagt ggaagatgca acaagttagt ggggaagaca 22620
tagcacaat tgcttgtttg ataactttat cacgttgggg aatcaattac tgcactgtat 22680
caccgatcca tcatttgata tcagcattct cctttaagtg aatcagtggt tttggaagaa 22740
ttaataattt tattttcact taaaaaata tttttttat cactctcaat cattcacatt 22800
atccatcttt ctttatatct ctttgtggta aaaagtgtta taaaaatgaa ataagactat 22860
atattactat tattctttta aaaaaagtt taactcacta aattccattt gaagatatcc 22920
cagtttctct gattcaaact aaacgacaaa catgaacatg ctgtttcaga gcaactcaag 22980
gtgcaacatt aacaatattt aatttatttt gacactgaac ataacaggtt ttttactttg 23040
aatatcacca cgcgtcacac gaaggttagga aattccatat actctgggtg agtataatgt 23100
gagaacatga caggttagaa gaagttaata aatattgacc aaattataac aaccacaata 23160

ES 2 582 552 T3

at|tatataa gatcaaatga tcaataattt ataaatgtcc gca|taaggta gatgatttcc 23220
 aactactgag gtggagccgt ggagtatgcg tgtttatgct cctccttttg cataacctat 23280
 taagtgaggc caccaagagc ccacatgaac agatgttttt ttattgcttt ataaattgct 23340
 ccaattagac gtacatccac accaagacc ttctcgtact tgttcaatta aaaacaatga 23400
 tgaagaattt tgcctactac ttcagtcaaa aacaacaaca tcaacgtttt tgtaggtttt 23460
 tcccacacag ccttggtatc ttggttcgtt ttctagcctt ccatgtccac cccttcttta 23520
 ttcaactttg ttattttgtg attctttctc tgcttggtta cctcggctc aaggcctcca 23580
 agccaaggac ccccttaga ccaatgact tggacctctt ttacacctca gtttctgctt 23640
 ccacagtttc tagcatggta gccgttgaaa tggaggtttt ctccaattct caactaatc 23700
 tcctaacct tctcatgttt gttggtggcg aagttttcac ttccatgctc gaccttgtat 23760
 ttgctaggta taaattcacc cggagtgtcc aaaataaagt tagcaccaat cattcttacc 23820
 tgactcgaac aagattacct ccggtagatg atacttctgg tttagaccaa atttttttta 23880
 gcagcaatcc ttttttatcc acaagaagc cctcgattaa tgccaatcaa attgaacttg 23940
 gtttagtttc tattcatcac tcagaatcag aaaaccacaa accaagtgat agtaataata 24000
 ctaacgttcc aaagggcacg gtagtgcct ttaacgacag tgatagactt aagtataact 24060
 gtcttagtta cctgacttat ttagttttag gttacctgt ggtggttcaa tttggtggct 24120
 ttagttctgt gtctttgtac ataaccctgg taccgagtgc aagacaagta ctgaaaaata 24180
 aaggcattaa gattgcaacg ttttctttgt ttaccatagt ttccacgttt gctagttgtg 24240
 gtttcatccc caccaacgag aacatgatgg ttttcaagaa gaactcgggg cttcttctcc 24300
 ttgttctccc acacatcctt ctaggtaaca ccctttacc accgtgtttg aggcttgtga 24360
 taatggttct ggaaaggatt actaaaagag aggaatactc gcacttgctt aagaatttca 24420
 aagacgtggg ttatgatcac atgctttctg ctcttcattg ttgcctcctg gttgctactg 24480
 tgttgggttt taatcttata cagtttgtga tgctttgctc tatggagtgg aacacaaaa 24540
 tcatggaggg tttgaatgtg tatgagaaag tgggtggctc cttgtttcaa gttacaaacg 24600
 cgagacacgc cggatgatct gttttgatc tctcctccat ctcttcagtc atattggtac 24660
 tcttctgtgt catgatgtaa gtcactactc tatctttccc gccagaaaat attagatgat 24720
 ccagcatgtg atttatgatc ccaatcaacg tgttatcaat gtgatacata attatcaatt 24780
 cacaaatgac atgatatctc taataatttc tcctcactat atataatcca taccaattaa 24840
 tgatcgagaa tgaataatta attatactga acaatgtcag ttcaacacca caattagtat 24900
 ttaagtaata tcaactctta cattctcatg tataataggca tgaaactagt tattgaattg 24960
 gtattatfff taatatatca aaattatatt atattcacat tttcacacgt ttaaattfff 25020

ES 2 582 552 T3

actctacttt catatttcat ctttctggtt ttttttctct ctgtctttct taacataaac 25080
 ggaaggggtt aaaataatgc aacaaattaa attaagaata taaaataaat atcatttaaa 25140
 atcatatgat atgtaaagaa aataaaaatg taaaactaat gtaaagctga ctgtgaaaat 25200
 atcaaattaa ttgattaata acactttggg ttccgattga tttattaaaa attatggtat 25260
 tgaaatctat aatttttatt atttaaaaaat catgatataa tttttttatc tcatgtacaa 25320
 agaattaaaa ggacatatat tcctatttat atctatttaa taactaaaat aataataatt 25380
 aacaaactca attattttat aaaaaaactc catattattt attctaatat ctttttttat 25440
 aaatttatca agcttgatat catttgtatt aaaataatta atattatata ttttagtata 25500
 ttttatttta ttttacttgt attatttatt attcgtcaaa tgatatatat gacaaaagat 25560
 tattcaatgt tatattttgt tctataatat ttttcttctc tttgtctaata atcataattt 25620
 taacatgtat cggaattatt atgttttttt tcttaatttt tttttgctac attccttaat 25680
 atttttttca ggttgtctga taattaatta ttttaatttag taactttgtc gtcacatga 25740
 gcatggcctg gccacttct gattttccta atacatgtag tatttcctag ttgacattaa 25800
 tcacattgcg tgattggaca tgaacaacaaa ttttgtgatc cgt 25843

<210> 7
 <211> 12465
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> C3ntigo-3

<400> 7
 atgaatcatt aatttgaatg acattatggt cgaattttgt aattaagttc ctaagtttaa 60
 atttagagaa cgaaaacagt ttttaaaaaa ttatattaaa aataatcagt taaatttatt 120
 atcattaaaa attaattgtg gtttaaaactc acagataaatt tacattaata ttacaataaa 180
 aagaaaacat cacatcatag aagtactctt cataatttat aactattgga atggaaccgt 240
 ctattttgaa ggcagaaaaa tgagattcta gagcctagag gctcttggtt cggttaatta 300
 agttagaaat gttttgcata ttatactaaa aatttaaatga ataaaaataa aatcaaagaa 360
 aaaaaaata agatttttga tcctttaata aaattatfff tatttcaaaa atacatttta 420
 atcttaaaac caaacatgca caattgcaca tattcgtgga agttgctatt acaccaacca 480
 ttatactaag tagtgcatat ggccatcttt ggtcttcacc cttcgggtatc ggtctcatct 540
 ttgtcacttc cagtaatfff ataataaaac ataccaacat aatcacttc aaaatcaatt 600
 ttataaaatc aattacattt aaaattaatt ttgttaacac ccaaggagca tacacttcaa 660
 caacccatct cacacgtaa ccaacattca tttcccaacc ctttcattac gttatctctc 720
 ggtcgtgcc agtattttca tttgaattaa tttggaattc tttgcaacaa tgatttattt 780

ES 2 582 552 T3

tat t t t t t c t a c t t c a t a t t t c t a t t t t a t c g t t t t a a t t t t t c t c t t t t a a a a t g c a t t t t 840
g t a a t t t g t a a a c c t t c a g a c t t c a g t g a a g g c g g a t a a t c a a t t t t t a g c a a g t a g c t a g 900
c t g a c t g a a a t t a a a t a g c a c t g a a t a a a t t a a t a a a a c t a a a t a a t t t g t c a a t t 960
a a a a a g a a t g a a c c t t t a t t a t a g t a a t a g a g t t a t a t a g t t t t t a t c t t t t a g a a c t t 1020
a c a t g c a t a a t c g g t a t t t g t a t c c c c a a a a g t t t t g a a a t c a t a a t c g c a t a a a t t a g c 1080
c a a g a a a t c c t g c a a a t g a g t t t g t t a a t g g a t t a c t a a a a a a t t a a t t t g t t a a t g g 1140
g g t g a t t a t a a t t t a c t t a t t t a t t a g t a a a a g a c a a a g c a a a t a t c a t c t a t g g a g a g a 1200
a t g a g a g g g a t a g a a a g c g t g t a t g g g c g a g t a g a g g t t c t t t a g c a a a a g a g t t c t g 1260
a c a c a c a g t t t c c c a t t t t c t a c c c a t t c a a a c g t t a t a g t g t c t t t t g t t t t g c a t t 1320
g a c t t g g a a g t c a a t t t a t g c a a g a a g g a a c g c a g a t a t g t c a a a g a a g t t a t t a t t a a g g t 1380
t g t t a c a a c a t t g c c a t c g a a a t t g a t t t g g a g g t c a c t a t t a g a t a a t g t g t t a t t c c c 1440
a a a t t t g a a a t t t g a t t t t a t t t t a g t t t a a t t t g t t a t t g c c a a a t t t a a a t a g a g a t 1500
a g c a a t a t t t t t g t a a a a t a t t a g a a a t g a a c a a a a t t a t a t t a g g a g a t t t g t g c t c a 1560
a a t t g a g a a a c c a a t a g t t t a t c t a t a c c g t a t g t a t a c a a a t a g a t g t g c t c a c a g g t 1620
c a c t g t a c t a a c a a t t a a c t a t a t t g t c t g a t a a c a a t a a t g c g a a t c g a t t t a t a g g a 1680
t c a t g t t a a a t t c a t g c a a g a t g a a c a a g t a g a a t t t g a t c a t a a c c g c a a t a t g t t a a t 1740
a g a a t c a a a g t t a t t a g a g a a g a a c a a c t c t c a c a a t g a a g a g a a t a c t c a a a t t a t t a t 1800
c c a a a t t c a a c t t a t t c t a g t t c t c t a t t a t a t g a c t t c t t a t t t a c a a g a a g t g t c t t g 1860
t t a a c t a c t a g t a c t c t t g g a c a t t a a a t a a a a a g t a t t g c a g a a a g c a a a a c a a t a a 1920
g a t a a c g t a a a a a t t a t a a a c a a t a c a a t t t t a t t c a a t a t t t c t t t t t g t t t t t c t t t 1980
a a t t t c t t g c t t a a c a t t t t t t t c c a g c a t a g t t t a c t t t t t c t c t a t t t a t a a g a c c t 2040
t c c a a t a a a g c t a c a c c t t a a a a g a g t t t g t c a t a t g a t a t g t t t a a t t t t c a a t t c c 2100
c t t g a a t a a a t a g g a g t t a g g g a a t a a g g t g c c g t a a c a t t a c a a a a a t t t c t t t t t a a 2160
t a a a a t a t a a t a g a a a a a t t a t a t t t a a t t t a t t t a a t a a a a a t t t a a t t t c t a c a a 2220
a a t a t t a g g t t t t a a a a a g a a a a a a t t a a a t t g t t a c g a c a g t t g a c c c a a a t t a a t c 2280
c a t t a a a a t a t a a t t g a a t t g a g t g a t g g a t t t g a t t a a t c c t a c c t a a a g t g a t t t g c 2340
t t a g a c c t c t g a a t t g a a g g c a a g a g g t a c c c t g c a t t g a a a c t t c a t t t g a c c a a a t 2400
t a g g g a a c c c c g a c a a c t a c t c a a c a t t a c a t t a a t c g a t a g a g a g t a c g c t t g a t c a g t 2460
t g t a t a g g g c t g t a g a t a t c t a a a a t t g a g a a a t t t a a g t t t a t c t a t g g a a t a t a a g g g 2520
t t t t t g t c a t g a g t t g a g g t a t a t g t a c t g t t g a t c t t c t a a t c g g g c t t g t g t c t a g a a 2580
g t t t t a g t t g t t a a g a g t t g g a a g c t a t g t t t a g a t a a a g a g t g c t g c t a g g t g c a t c c 2640

ES 2 582 552 T3

aacattattg ttggtgcact caatattaat cgtaaaaaga taaaaaact ccttacggat 2700
caagttgatc tataagttaa tttttaagac ttacgaatta acttaatctg taagtctttt 2760
acagatcaag ttgattcgta agttgatttt taagacttac ggatcaacat gattcgtaag 2820
ttttttatgg atcaagttga tccgtaagaa gaaaaattag cagggacaat tttatcattt 2880
tcaaaaaata ccggatgcat ctaacaacac tcctaaataa atcctatgtc ccacccccaa 2940
ctattattca attgacagag ttttatatat atatatatat atatatatat atatatatat 3000
attcttcaat ctctgtttgt ttttgtatca tgagtttatt ttatttttgg aagataattc 3060
tctatataat gcttttacct cgcttttact aatccatcat ttttaaataa gtttattaaa 3120
tattttgttt gtcatgaatt cttttgatga taattaaagc aaattttttt tactatgaat 3180
aatgtttaat gtagcaagggt attataacgg cgatgatgaa aataataata atggagggtga 3240
tccaaaggaa aacaatctat acatatacaa agaccaacaa cttgaagcca tatattggac 3300
tatttcattt tttgtctcat gtgattgact gacttagttt tctaccgcag aaagcatgct 3360
acatatcatt cagaaaacaa aacatgtata aaccaattta gttaaaccaa acagttgttt 3420
tccgagtctt ccaaccttta aaatatgggt tagaaaatta gacactctaa tcacatcaaa 3480
agaagattaa aggatccaag cttgtctctc aatactatga aactgttcac cttcaagcct 3540
tttgtgagaa tatccactag ttgcatttca gtactgcagt agttcaagtc aagctatttt 3600
ttgctcactt tttcaciaag aaagtgaat cttgtctcta tgtgttttga ccttccgtgt 3660
gctactggat tcatggccaa gttgataatg gatttgttgt ccacatacat ttcgattggc 3720
ctatgaattt ctatcttcaa ttcttcaagt aaaaagtcta gccacagtgc ttggcatgca 3780
acatagcatg ctacaatgta ctcagcctcg caggaagata atgtcattac aggttgtttc 3840
tttgaacacc agcttattgg tgtacctagg aactttaaga gatatcccgt agtgctcttc 3900
ctttccactt tgtctccaca ccagtctgag tctgagaaac ccatcaacat agttgtagat 3960
tctgaaattc caaccaggct tgtgagagca gtttgataag attttttagg aaatagaaca 4020
ccatagctta gtgttctctc gagatatctc agaattctct tagcagtagc ccaatgaaag 4080
gctttaggat cgtccaaaaa cctactaatt agaccaactg caaaagaaat gcctggctctt 4140
gtgtttaga ggtatctcaa tgaccctaca acctgcttga atagggtagt atccactgac 4200
ttttctgact catctttcac taatctcaag cctggttcaa cttgagtgga tgttaggttg 4260
cagcacatca tctaaaatct cttcaacag tctattgcat acttctgttg gtgcataatc 4320
agaagtcctt tggcttcctt gaactcaatt ccaaggaaat aagacaatat ccccaggctc 4380
gtcatctcaa attcaagctt caaactctc ttgaatttct ctatatgaat ctgattactc 4440
cctgtgatca atagatcatc aacatacaag cacataatta tcagatcatc tttgtcactc 4500
ttctttacct aaactocata ttcttctca cacttatgga aaccttattt gacaagaaag 4560

ES 2 582 552 T3

gaatctattc tcttgttcca ggc|cccttggg gcoctgcttta ggccatacaa tgccttgtat 4620
 aaccttaaca ccttgtcttc ttcaaccttg atctcaaagc caggagggtg tttcacaaag 4680
 acctcctctt ccaaagtacc attgaggaat gtcgacttta catcaagctg gtatagggtc 4740
 caatctctac tgtgggctag agctatcacc aacottatgg tttctagcct agatactgga 4800
 gcaaacactt ctgaataatc caaactagct ctttggagga atcctcttgc aactagcctt 4860
 gttttatgct tggcaacagt tccatcaggc ttttaatttca tcaccactt cacatctatt 4920
 ggagacttgt ttggaggcaa gtcaacaagt ttccagatct gattactttc aaatgctctc 4980
 aattcctctt ccattgcagc cttccaatga tcttgttgca gtgcatctct gtgatcaatt 5040
 ggttcaatgt ctgccaaaaa ggcaaaatgc acaaaactcac ttgctttcct ctttgcttct 5100
 gccttctttt catcatctgg aactgcagct tgcccaagga tgttaggcat atcaacatga 5160
 taatctttat acttcaaagg caagtgctta tttctctatg gtttctattg cacaacagga 5220
 ggttcctcat gattagcttc tatttctggt gcttcaactga gtccagtctc attgttctct 5280
 tctccaaaca aggtgttggt agtgcacttc ctottccagt cccaggagcc atcttcatca 5340
 atcacaacat ctctgctgat gaagattttg tgagttaacg aatcatacaa cctataggca 5400
 ccagttggat gatattcaac ctgtatcata ggtacactct tgtcctgaag ctttttctc 5460
 ctctcatcag gcacattctt gaaacataat gacccaaaca ctctcaatg cttcactgga 5520
 ggcttccttt gggccatac ttcttcaagc actctatatt ttagcttctt tgtgggacac 5580
 ttattcaaaa tgtatgctgt agtggacatt gcttctccc aaaagttaa tgacaagtgc 5640
 ttctctttca acatacacct tgccatggtc atcattgttc tgttcctcca ctccagccaaa 5700
 ccattatact gaggagtata aggagcaatg atctcgtgta ttataccatg ttcgtgataa 5760
 tatgtaatat tgttcattat tatttcagat tttttaaaaa tatttgtgtt attatztatg 5820
 aaatatgtaa ttttttagt atttgathtt atgatgataa agtgttctaa attcaaaaga 5880
 agggggaaag cgtaaacatt aaaaaacgtc atcaaaacaa aacaaaatct tgttaataaa 5940
 gataaaactg tttgttttga tcaactgttat ttcgtaatat aaaacatta tttatattta 6000
 tattgttgac aaccaaattt gcctatcaaa tctaaccaat ataatgcatg cgtggcaggt 6060
 aatgtactac catgaactta agtcatgaca taataaacgg tgaatctgac caatgcatgt 6120
 acctagctaa atgtatttgt gacacgaagc aatgattca attcacaatg gagatgggaa 6180
 acaataatg aagaaccag aactaagaaa gcttttctga aaaataaaat aaaggcaatg 6240
 tcaaaagtat actgcatcat cagtccagaa agcacatgat attttttat cagtatcaat 6300
 gcagctagtt ttattttaca atatcgatat agctagttta aatatattgc agctagattt 6360
 ataaatattt gtgttattat ttatcatttg tgtaatcctg tttttagtat ttttagttat 6420

ES 2 582 552 T3

atatgatgat	aatgtattcc	aaatttaaaa	gaagggaaat	aaatttaaac	aagaaaaaaa	6480
gtcatcaaac	aaaaaacaaa	tgaaaggggtg	gaaagatggt	accatgtaat	gtgaatgtta	6540
cagtatttct	tttattatag	agttaacaaa	ttaactaata	tgattttggt	aataatgatg	6600
aaatattttt	tttattatta	tttcataata	taaaaatagt	ttacttaata	taaaaaaaaa	6660
ttctatcggt	cacaacaaag	ttggccacct	aatttaacca	tgcatgtacc	catggaccat	6720
attaggtaac	catcaaacct	gatgaagaga	taaagagatg	aagacttaag	tcataacaca	6780
aaaccataaa	aaacaaaaat	acaatcaacc	gtcaatctga	ccaatgcatg	aaaaagctgc	6840
aatagtgagt	ggcgacacaa	agcacatgat	tttcttaca	cggagataaa	accaaaaaaa	6900
tatttcatga	acaacctaga	acaataaag	cttttatata	ataaatatat	aaataaataa	6960
aggctatgga	ataatatact	tcaatatatt	tggattaaat	aaattgttgg	cggggttgat	7020
atatttatac	acacctaaag	tcacttcaat	ctcattttca	cttaactttt	attttttttt	7080
tctttttatt	tatcataaag	agaatattga	taatatactt	tttaacatat	ttttatgaca	7140
ttttttattg	gtgaaaactt	attaaaaaatc	ataaattttg	taagttagat	ttatttaaaag	7200
agttcctctt	cttattttta	attttttaat	aaatttttaa	ataactaaaa	tttgtgttaa	7260
aaatgttaaa	aaagtgtggt	attaaccctt	ctcttcgagg	atataatgat	catttttcaat	7320
tatccggtaa	ctatcgtctt	gagtccaacc	cggtaagaca	cgacttatcg	ccactggcag	7380
cagccactgg	taacaggatt	agcagagcga	ggtatgtagg	cggtgctaca	gagttcttga	7440
agtggtggcc	taactacggc	tacactagaa	gaacagtatt	tggtatctgc	gctctgctga	7500
agccagttac	cttcggaaaa	agagttggta	gctcttgatc	cggcaaaaaa	accaccgctg	7560
gtagcgggtg	tttttttgg	tgcaagcagc	agattacgcg	cagaaaaaaa	ggatctcaaa	7620
aagatccttt	gatcttttct	acggggctcg	acgctcagtg	gaacgaaaac	tcacgttaag	7680
ggattttggt	catgacatta	acctataaaa	ataggcgtat	cacgaggccc	tttcgtctcg	7740
cgcgtttcgg	tgatgacggt	gaaaacctct	gacacatgca	gctcccggag	acggctcacag	7800
cttgtctgta	agcatcaaga	ggaatcaggg	aaggcaaaat	gtatatcaac	tggaacaagt	7860
gagatgggat	tttactcttt	ttattgcttt	gtattttctt	catactttag	gggatgcttg	7920
gtttgagaag	aatgtttctt	attttcattt	ttgctttcac	ttttaattac	aaaattaaca	7980
ccttgtttcc	atcttgtttc	ttattttcaa	aagtttgat	aagtggaaac	aactttttatt	8040
gttatoctta	atatttttcc	ctttatattt	ctttctctca	gtgtgcttct	tcatcccatt	8100
gtataaaaag	caatgcatat	tggtaaaact	ctaagacatt	attttaattt	ttttaaaaaa	8160
aagacattct	aagacgggta	tttgaaaaac	cgtcttagaa	gggtaccatt	ctaagatggt	8220
ttttcaaaga	accatcttag	aatgtcttag	aaggatatca	ttctaagacg	gttttttagct	8280
aagaatcgcc	ttagaagaag	ttctctgaaa	aatcatctta	gaagaatatac	attctaagac	8340

ES 2 582 552 T3

ggttcttgta gttttct|aag acgattttta gctaacaacc gtcttaaaaa gacacccttt 8400
 tctaaaatgg tttttttggt gaaactgtca tcaaaagtct taactttcaa cgatggtgac 8460
 tacaaagacg gttcaaaatc gtctttgaat gtcttataca atcggtggtg tatatgcctt 8520
 ttgtagtagt gtataattga ttgtttttat ttcgatggtt gactagttag gttttattta 8580
 taaacaattc aacaaagtat tttgaaacat tttaccggtc aaagttgaaa aactctagtt 8640
 taactagagt tatcaattct caaaaaaaaa aaaaaactag agttattagt catattattt 8700
 ttttttaaga aaaaattatt tattaatgcc acctgagaga ctacattgtc agtaatgttt 8760
 ttcaaaaaat gttactaaag ttgtagtatt ccacacgaca ttaataatta aaaattattt 8820
 tttaaacaaa atattggttg tgatattggt tttcagcatt gattgttcca atttggta 8880
 atatctcaaa agaacatact ttggtaatta acttttaaat tttcctttgg tcaacttaat 8940
 attgctaata ctcttgtac tgtactattt gtgtggetta ataataattt tttgtcttca 9000
 tctttcacat tttcaccctt aaactataaa atttgcatat tttcactgct agaaaaacat 9060
 ttttttatga cgattatttt ggatattatg tcggttatta actgtcgta tatgatacat 9120
 cgtagaatgt ttgcatctac aacagcagtt ctcaaaaaat agtcttagga aagttacaat 9180
 tctaagacag tttaaaaaat aatcatctta gaatgtctac aatctaagat gattttcaaa 9240
 taaccgtctt agaatgtatt tttttttat aaaaaattaa aaattgagga ttttaaggcg 9300
 atttttccat gtcaacaat tttttcaaag acctcttag aattcaaaca ttgtaagacg 9360
 gtttttcaaa gaaccatctt agaatttttt tttttaaatt attttatttt tttactgcca 9420
 taataatcaa tgattatttt atttttttat tggcataata ataaagtaat aaagtaagga 9480
 attttataca tgatgacggt agaaagcata aaatgttcca attaaaaagc acaaaaatgc 9540
 ctaaaaattt gcaatttcca attagaaagc tttgccaacg agaactgaat gcagaaaaca 9600
 atcaattata atgtgtggaa aaaaatatgc actaattttt aattaattaa tttttacaat 9660
 acataaatgt actaataatt ttaaataata aaatcaatta taaattaaaa ataattttag 9720
 tgtgaaaagt ataaagcaat atattatgaa aaaatagttt aatttgtaaa caataaatga 9780
 atctaaatta ttgaaattga agcttacctt tgttgaccta atattcctca gtgatgcctc 9840
 cagttgattc tcaagctcat ttgtattcgt ttaggcaaga tctttcccaa gtaggttctt 9900
 acatatttta tatatatata tatatagtat aaatatagaa tatatagaat atcaacttta 9960
 agtttgaaaa catagcaagt aagttatata attaccttg agaagatccg gtataatgta 10020
 tgcaataact aggcagtcct cagttctaag ccatgatgac ccactagtga gacatggaaa 10080
 tgcagtactt cctagcattc ttgagcctag aaagcacaga tatatcaatc ccaaatacac 10140
 ttctcggcca tcggcctgaa acctgggtgg aaggttgaca ttgttatcta ccattgaagc 10200

ES 2 582 552 T3

caatagaggc aaggggggat gaaggtgggt ttggaaagga tgaaaaatgt tgatagagat 10260
 tgtttgtcaa tcttatgaag ttcaaagcta aattcttgag cctagaaagc acggatatat 10320
 caatcccaaa tacacttctc ggccatcggc ctgaaacctg ggtggaaggt tgacattggt 10380
 atctaccatt gaagccaata gaggcaaggg gggatgaagg tgggtttgga aaggatgaaa 10440
 aatggtgata gagattgttt gtcaatctta tgaagttcaa agctaaattc ttcatagaaa 10500
 aaggagtgat gctcacacaa aattatcatg cagggtagca atttcaggat gattaggaaa 10560
 cttggtcact agctgtagag gagatcgtac agatttgcca gaaaccccgga ttaactagac 10620
 ataaaatggt aattagagat ctacacttat gacacatgca attggtgcat tgtattgcag 10680
 gagcaacatg tgtgaccaac ttgatggtca attctagttc cccatactta actcctcgaa 10740
 gccttaacca aacattctgc accacctcac cattcacaca gttggtatctt ctttcacgga 10800
 caagatagtt ttcaccatca ggtatgacct tccttaatgt cgtctcaata gaggacactc 10860
 ttaagatgtc tcttaatctg gctacagaga ctattggttg aaggttcagg aaagtattcc 10920
 ccatcttgtc atcaaccttc aaaagatctt tatcaaacac ttcctctctc tctctctcta 10980
 tctctctctc tctctatata tatatatata tatatatata tatatatata tataaacaac 11040
 atcttagtta tacaacataa gatctaataa acagtaccta gtattcaaga ttttagaatg 11100
 ggtaaaatat gttttaagtc ccacaatfff ttttgtcaaa attgatttta gtccatactt 11160
 tagaaacatg gttttagtg tcatatfff ataattggtt tcctttatgg aacttagaat 11220
 acttgagtga gggacaagat taaccaagat tgaagaaaac aagaatgaag cggcactacta 11280
 aatatcatgg agctcaccaa attcaaaaact cccaagggtt ctgtcaaagt gaaatttagc 11340
 tcttcattcc aaacaggatt caagcagcta ttaattacct tggctcttgt agtatggtac 11400
 aatttaataa catttcaagg ttaaaaatag ctacataatg ttaatgttat tgttaataga 11460
 aacaagcaa aatgaaatt aacatataaa taagtcttat ttacctgatt ccctagcttg 11520
 agcacaacat aaggatcact agtcttgaaa tcttgatca ccaacctttt cccttgcata 11580
 acaattatct ttagcaacc taattgttta cccattatac tccttctaac aagttaaact 11640
 aatagtcaaa caaataaatt tctttatctg ttgttcaaag ttggtgaaat gaatttccaa 11700
 actcacccta cgcagtagca agttccacca tcaaaattta ctctaaaacg aaataatgct 11760
 ttgaaccagg aaaaaatagt atctcccaag cagcgtatct cagcgcataa taagcaacat 11820
 ttagatttg cttctataaa catccttta caaaaataa tactagttat attttattca 11880
 agtattacat tgaacatcg ctctggatcc aggacatcaa tgcctcaaaa aaattatctc 11940
 ctagatcact actaggcaag gccctatccc ttgtattaca taaattgact acgaaactag 12000
 tattactaaa tcgtctctca tgcaggaact gaaggtggtg ttaaatcaca aaatcttcca 12060
 cttctctca agggcaccag taatccttgt aatacaataa gcaacactta gaggtacccc 12120

ES 2 582 552 T3

gaaactgcaa |tcaggaaaca cgatgatgta agaaatagaa aatatcttga |ctagtgcacg 12180
 ttaaataaac aattagctga ggtagcattt tgtatatatc caagttttga caacagtttt 12240
 tttagggaaa atgaaaaggg tcttgcaaac taatgcttag ttaaggaatt aagatagaaa 12300
 gtatTTTTat tgctcctacc tgaaattaga atatattagc atgtacttac ttagacaata 12360
 ggtacaaaaa ttaaaagttg agctagtatg agtaccacaa agacaaggtc catattgcta 12420
 agaataattg atacttagtc atccatatct acaagcttgt ttggg 12465

<210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Artificial

<220>
 <223> Zona de unión 5' de 20-nt del cóntigo-1

<400> 8
 atacgaaatc attaagtagt 20

10 <210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 15 <223> Zona de unión 3' de 20-nt del cóntigo-1

<400> 9
 gctagctagt gtttttct 20

20 <210> 10
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Zona de unión 5' de 40-nt del cóntigo-1

<400> 10
 25 tggactaac atacgaaatc attaagtagt aattaatcg 40

<210> 11
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Zona de unión 3' de 40-nt del cóntigo-1

<400> 11
 tctcttttg gctagctagt gtttttct cgactttgt 40

35 <210> 12
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Zona de unión 5' de 60-nt del cóntigo-1

40 <400> 12
 aatccaagct tggactaac atacgaaatc attaagtagt aattaatcg tactagtaaa 60
 <210> 13

ES 2 582 552 T3

<211> 60
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 5 <223> Zona de unión 3' de 60-nt del cóntigo-1
 <400> 13
 ataccggtg tctcttttg gctagctagt gtttttct cgactttgt atgaaatca 60
 <210> 14
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Zona de unión 5' de 20-nt del cóntigo-2
 <400> 14
 15 atccttcca aatatgtcc 20
 <210> 15
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Zona de unión 3' de 20-nt del cóntigo-2
 <400> 15
 ccgtcgacgg taactttac 20
 <210> 16
 25 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Zona de unión 5' de 40-nt del cóntigo-2
 30 <400> 16
 atgggcgact atccttcca aatatgtcc atgggtacat 40
 <210> 17
 <211> 40
 <212> ADN
 35 <213> Artificial
 <220>
 <223> Zona de unión 3' de 40-nt del cóntigo-2
 <400> 17
 ctcatatat ccgtcgacgg taactttac ttagataata 40
 40 <210> 18
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> Zona de unión 5' de 60-nt del cóntigo-2
 <400> 18
 cttggtcctc atgggcgact atccttcca aatatgtcc atgggtacat gcatggtaa 60
 <210> 19
 <211> 60
 50 <212> ADN
 <213> Artificial

ES 2 582 552 T3

<220>
 <223> Zona de unión 3' de 60-nt del cóntigo-2

<400> 19
 ttgtttacgg ctcaattatat ccgtcgacgg taacttttac ttagataata ttttcttaa 60

5 <210> 20
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Zona de unión 5' de 20-nt del cóntigo-3

<400> 20
 ttataccatg ttcgtgataa 20

15 <210> 21
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Zona de unión 3' de 20-nt del cóntigo-3

<400> 21
 gtctgtaagc atcaagagga 20

20 <210> 22
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Zona de unión 5' de 40-nt del cóntigo-3

<400> 22
 atctcgtgta ttataccatg ttcgtgataa tatgtaatat 40

30 <210> 23
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Zona de unión 3' de 40-nt del cóntigo-3

<400> 23
 gtcacagctt gtctgtaagc atcaagagga atcaggaag 40

35 <210> 24
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Zona de unión 5' de 60-nt del cóntigo-3

<400> 24
 aggagcaatg atctcgtgta ttataccatg ttcgtgataa tatgtaatat tgttcattat 60

45 <210> 25
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Zona de unión 3' de 60-nt del cóntigo-3

50

ES 2 582 552 T3

<400> 25
 cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc atcaagagga atcaggggaag gcaaaatgta 60

 <210> 26
 <211> 27
 5 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador directo de la zona de unión 5' del cóntigo-1 05-O-975

 <400> 26
 10 tgtcacatta caagtgagat gtcacata 27

 <210> 27
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> Cebador inverso de la zona de unión 5' del cóntigo-1 05-O-977

 <400> 27
 tctcgttatc ttttgccact tttactag 28

 <210> 28
 20 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador de la zona de unión 5' del cóntigo-1 05-QP22

 25 <400> 28
 caagcttggt actaacata 19

 <210> 29
 <211> 35
 <212> ADN
 30 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador directo de la zona de unión 5' del cóntigo-1 06-O-1573

 <400> 29
 ttttggtgaa atcatgctta ctttgtgat gggac 35

 35 <210> 30
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 40 <223> Cebador inverso de la zona de unión 5' del cóntigo-1 06-O-1487

 <400> 30
 cgctaaggcc gaatgcaaag 20

 <210> 31
 <211> 29
 45 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador directo de la zona de unión 3' del cóntigo-1 06-O-1414

 <400> 31
 50 ggtgtaataa gcaatgttg gagaatcgg 29

ES 2 582 552 T3

<210> 32
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> Cebador inverso de la zona de unión 3' del cóntigo-1 06-O-1579
 <400> 32
 gctcgagaag atgaagccta gaggagagca c 31
 10 <210> 33
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador directo de la zona de unión 3' del cóntigo-1 06-O-1577
 15 <400> 33
 aacccttctc ttcgaggatc caagcttga ttttg 35
 <210> 34
 <211> 31
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso de la zona de unión 3' del cóntigo-1 06-O-1579
 <400> 34
 gctcgagaag atgaagccta gaggagagca c 31
 25 <210> 35
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> Cebador directo de la zona de unión 5' del cóntigo-2 06-O-1586
 <400> 35
 ctggcgctat ctttatctga ttgtaaccgg agaac 35
 <210> 36
 <211> 32
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso de la zona de unión 5' del cóntigo-2 06-O-1585
 <400> 36
 40 catgcatgta cccatggacc atattggaa ag 32
 <210> 37
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> Cebador directo de la zona de unión 3' del cóntigo-2 06-O-1404
 <400> 37
 cgaatgcaaa gaaattggtt ctttctcgtt 30
 50 <210> 38
 <211> 35
 <212> ADN

ES 2 582 552 T3

<213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso de la zona de unión 3' del cóntigo-2 06-O-1590
 <400> 38
 5 atcagtattg cgcttcaac ttgaaggctt gaatc 35
 <210> 39
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> Cebador directo de la zona de unión 5' del cóntigo-3 06-O-1626
 <400> 39
 aatgtatgct gtagtgaca ttgct 25
 <210> 40
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Cebador inverso de la zona de unión 5' del cóntigo-3 06-O-1366
 20 <400> 40
 agtcttcac tccttatctc ttcacatca 27
 <210> 41
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> Cebador directo de la zona de unión 3' del cóntigo-3 06-O-1569
 <400> 41
 ggcgacacaa agcacatgat ttcttaca cg 32
 30 <210> 42
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 35 <223> Cebador inverso de la zona de unión 3' del cóntigo-3 06-O-1551
 <400> 42
 acattctct caaaccaagc atcccctaa 29
 <210> 43
 <211> 35
 40 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador directo de la zona de unión 5' del cóntigo-1 06-O-1571
 <400> 43
 45 tagcaaccga agcagagaat gtaggagagg taatc 35
 <210> 44
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>

ES 2 582 552 T3

<223> Cebador inverso de la zona de unión 5' del cóntigo-1 06-O-1572

<400> 44
 caaagcttat atatgccttc cgctaaggcc gaatg 35

5 <210> 45
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador directo de la zona de unión 5' del cóntigo-1 06-O-1351

10 <400> 45
 gatgtcatca cacaactctg acttagtt 28

<210> 46
 <211> 22
 <212> ADN
 15 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador inverso de la zona de unión 5' del cóntigo-1 06-O-1367

<400> 46
 ccatcactcc aacacaggtt cc 22

20 <210> 47
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 25 <223> Cebador directo de la inserción del cóntigo-1 06-O-1357

<400> 47
 tgaatcgtaa tgaggcaagg ca 22

<210> 48
 <211> 23
 30 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador inverso de la inserción del cóntigo-1 06-O-1368

<400> 48
 35 tcacactcac aataggtgg cct 23

<210> 49
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 40 <223> Cebador inverso de la inserción del cóntigo-1 06-O-1369

<400> 49
 agcgaagttc ctattccgaa gtt 23

<210> 50
 45 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador directo de la inserción del cóntigo-1 06-O-1356

50 <400> 50

ES 2 582 552 T3

gaccatatta ggtaaccatc aaacc 25

<210> 51
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador inverso de la inserción del cóntigo-1 06-O-1371

<400> 51
 ccatctcagt cagcacaagg 20

10 <210> 52
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 15 <223> Cebador directo de la inserción del cóntigo-1 06-O-1360

<400> 52
 gcctgtgct gactgagatg g 21

<210> 53
 <211> 25
 20 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador inverso de la inserción del cóntigo-1 06-O-1423

<400> 53
 25 agttccaaga cccattaaag tgcta 25

<210> 54
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Cebador directo de la inserción del cóntigo-1 06-O-1363

<400> 54
 aactcactgg tattcccgtt gcta 24

<210> 55
 35 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador directo de la inserción del cóntigo-1 06-O-1421

<400> 55
 40 tgcccacagg ccgtcgagtt 20

<210> 56
 <211> 34
 <212> ADN
 45 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador inverso de la zona de unión 3' del cóntigo-1 06-O-1578

<400> 56
 ttccattgac aacattgtgg atgtgaaagc ggac 34

50 <210> 57

ES 2 582 552 T3

<211> 37
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> Cebador directo de la región 5' del contigo-1 07-O-1889

 <400> 57
 caatactagc aaaagaaaa gaaattatac ggaacaa 37

 <210> 58
 <211> 35
 10 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador inverso de la región 5' del contigo-1 07-O-1940

 <400> 58
 15 ctgatagttt taaaagaaaa agtcagagtt gtatt 35

 <210> 59
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Artificial

 20 <220>
 <223> Cebador inverso de la región 3' del contigo-1 07-O-1892

 <400> 59
 accaaacat ttaattcaa atattttca ttca 34

 <210> 60
 25 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador directo de la región 3' del contigo-1 07-O-1894

 30 <400> 60
 gaaaatcat tgtgtcaata gttgtgtta tgta 34

 <210> 61
 <211> 35
 <212> ADN
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador directo de la zona de unión 5' del cóntigo-2 06-O-1588

 <400> 61
 gcgcatgaga caattatgct aagactcaag cctac 35

 40 <210> 62
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 45 <223> Cebador inverso de la zona de unión 5' del cóntigo-2 06-O-1403

 <400> 62
 aaccaatttc ttgcattcg gccttagcg 29

 <210> 63
 <211> 35
 50 <212> ADN
 <213> Artificial

ES 2 582 552 T3

<220>
 <223> Cebador inverso de la zona de unión 3' del cóntigo-2 06-O-1592

<400> 63
 tatttattaa tttcacattt taccacctgg ctatc 35

5 <210> 64
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador directo de la región 5' del contigo-2 07-O-1895

<400> 64
 ftttcaagga tgtctagggc ttcaccttc tc 32

10 <210> 65
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador inverso de la región 5' del contigo-2 07-O-1898

<400> 65
 ggaccaagaa atgggacctc atcaagaaga g 31

20 <210> 66
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador directo de la región 3' del contigo-2 07-O-1905

<400> 66
 caacattaa ttgaaagtct atttgac 27

25 <210> 67
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador inverso de la región 3' del contigo-2 07-O-1903

<400> 67
 gctgttatat tattacttag tataatataa aatg 34

30 <210> 68
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador directo de la zona de unión 5' del cóntigo-3 06-O-1669

<400> 68
 ttgtctcatg tgattgactg acttagtttt ctacc 35

40 <210> 69
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador inverso de la zona de unión 5' del cóntigo-3 06-O-1426

50

ES 2 582 552 T3

<400> 69
 cattggtcag attcacggtt tatt 24

 <210> 70
 <211> 25
 5 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador directo de la inserción del cóntigo-3 06-O-1355

 <400> 70
 10 gtggcagta atgtactacc atgaa 25

 <210> 71
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> Cebador inverso de la inserción del cóntigo-3 06-O-1459

 <400> 71
 tggctgctgc cagtggcag aagtcg 26

 <210> 72
 20 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador directo de la zona de unión 3' del cóntigo-3 05-O-1182

 25 <400> 72
 ctgcgctctg ctgaagccag tta 23

 <210> 73
 <211> 33
 <212> ADN
 30 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador inverso de la zona de unión 3' del cóntigo-3 06-O-1672

 <400> 73
 gaatgctagg aagtactgca ttccatgctc tca 33

 35 <210> 74
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 40 <223> Cebador directo de la región 5' del contigo-3 07-O-1881

 <400> 74
 ctttttctc ctctcatcag gcacattctt g 31

 <210> 75
 <211> 30
 45 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador inverso de la región 5' del contigo-3 07-O-1882

 <400> 75
 50 tcagtataat ggtttgctg agtggaggaa 30

<210> 76
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Cebador directo de la región 3' del contiguo-3 07-O-1886

<400> 76
 ggcaaaatgt atatcaactg gaacaagtga gatgg 35

10 <210> 77
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador inverso de la región 3' del contiguo-3 07-O-1884

15 <400> 77
 tgctttttat acaatgggat gaagaagcac actgag 36

<210> 78
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Cebador directo de la zona de unión 5' del contiguo-4 HOS-A

<400> 78
 cctgctctgt ccccttcaga ttacg 25

25 <210> 79
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador inverso de la zona de unión 5' del contiguo-4 HOS-B

30 <400> 79
 gggtgaaag atgtaccat g 21

<210> 80
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Cebador inverso de la zona de unión 3' del contiguo-4 HOS-C

<400> 80
 gaaacgccac catcaattta tatagacagc aagg 34

<210> 81
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Cebador directo de la zona de unión 3' del contiguo-4 HOS-D

<400> 81
 ggcggggttg atatattat acacacc 27

50 <210> 82
 <211> 10058
 <212> ADN

ES 2 582 552 T3

<213> Artificial

<220>

<223> C3ntigo-4

<400> 82

actagtttat	ttaacaacag	gttgttatta	tatgaaatta	tgaattaatt	ttagctgaag	60
actttaaatt	aaaagattta	aaatacttgt	caattttttt	aagggtcaaaa	gttaaaatat	120
ataacttaaa	aataaaacat	catataatat	atatacacat	acaatattat	agtaatccaa	180
atctcataaa	aatatacata	taaatataaa	tcacattata	aggataaatt	atataagttc	240
taagtcactc	aatattatac	ataactttta	atagaaaaca	aaaactgata	acacatcttc	300
acgctaaagt	acacacatca	atgaaccctc	caaaggcaaa	gaatcacctc	ctatccattt	360
gctcctcaca	tatgtcaggg	gttatctctt	agaaattcat	ataataaagc	atatcataat	420
aatcattagt	tcatcaacca	ttacataaag	gttcaatcat	attacataat	cctcatcatc	480
aatccataaa	ttattaaaca	tcaaagtatg	tccatgactc	atcgagtaac	acatcattct	540
caagacaaaa	ttatcaatgc	acctagccat	gctagctctt	gactctcgaa	agatttcacc	600
tcttgagcaa	ttaacctaag	tacatccatt	aacatattca	cacattgacc	atttaggaaa	660
acccgaatta	atcctacgga	gaaagtgtga	ctttattgaa	aatagatgag	catgggtagt	720
aacttgcctc	gttaaaactt	gcaaagacct	taacttatct	aaggattcgt	tcaccaatgc	780
aatctatagg	tccattcttg	ttagccatca	tcaataacct	ccaacactag	gttgagggcc	840
accaagcacc	ctcaacttgc	gtgctactca	catgcaatgt	tattcatcaa	agcatttagg	900
ttatgattat	tcaaaatcaa	tatcatacat	catcaciaat	tcattcaccg	attttaacac	960
cataagaagt	cataatatca	tagattcacc	attcacatgt	tcatcactct	catgaactca	1020

5

ES 2 582 552 T3

cctatgggttc aataaatata gcaagacatt ccaacacctt aaaatcctac aaacaactca 1080
 ctaaaaactt atatgaatgt gaatctcatg aatctcaaca ttaatttaat tctaataata 1140
 aaacaatata atctcaacca catctcatat catcatcgag aatcaataa acacaattta 1200
 agacatccat caataaacat aattatgagc atttcttact acaataatta tatacatgta 1260
 tcatcacttc aacaattagc atttatgggt cttcttcatg tacatagagt tactcaacat 1320
 aacatataat tattttatat tagtttgtaa aacaaagtta attatatgat aataacacga 1380
 catcaacata atacatctca ttcaacttat caccaattca tcaactcacat cttgctcaat 1440
 tcctcatcaa ttcactattc atatcattat caccaatcac atgaactctc acatagttta 1500
 tctacacata atgagacttt tcacaccaca agttttcatg atccaacact atcaaactc 1560
 aacatataaa agcataagaa caaattcaag gaatagagtt ttaatgtctt tcttgaaata 1620
 ttcataagct taaggacaat ccaaaggaaa atataagaag aggtttacca cttgaggaaa 1680
 aagatgtggt tgatgtcacc atgtcaacac tattcccaac acttttctca ttttgctttg 1740
 tgttcttact ccatttttgc ttcaatgtgc ttgaagtttg ccacaacaaa acaaagaaca 1800
 aaaactcgac tcaaattttc actataactt aatagattct cactatagtg aaaatatgtg 1860
 attttagttg tagcaaaata attttagtgc caatgaaaaa aatttcaacc atagcgaaaa 1920
 ttttagtgcg aacaaaaata attttagcca tcataaaata aggtttgcag aatcacgatt 1980
 ttctactatt cttgtccttc taataagttc caatctatat ctaattcaaa tatttcattt 2040
 acaaacatga acatcaaatt aaacaacatt aataatcaaa aaataatgat caaatacatc 2100
 aaacatacat gagattaaag ttggtttaag tttccatacc tatcaaactc aaggaactct 2160
 ctttgatatg aagaaagaaa ggaaatgagg aaataaattt tccctcacct tcaactatatt 2220
 tctacatcat ttccaccacc caaaccccca aaaactagca taaaacacac aatattgaaa 2280
 tagaccacct ttatgaaatt ttaaaaattg tctatggaag aaaatgaaaa tggaggaaga 2340
 aaggaaaaaa aataaggatt tcttacctct gaaattttaa aacacatcaa gttttattct 2400
 taatagtact ctttttaatt attttgata tttttaaata aataatatta atacgtatgt 2460
 taaaggaaaa acgtgtacga caagagaaat ataaaaagaa aatgtgttaa gatgaatata 2520
 aaaaatgctc tataaaacag atagtaattt cttaaaaaat ttaatatgat cttaaattct 2580
 taatagattt ttttctgca gtgaaaaata ttcttcttct tcttaaaagc ttaacaatta 2640
 acaaactttt ttatacaatg attttgaaat gtatcttaaa ggaaaaattt attttaattt 2700
 tgatattagt ttaataaaaa aatcctttat cataagttca tatattttaa ttaatttatt 2760
 tttttcaaaa aataaaagtc gggatttttt ttgtcatttt ctcatattatt acaaccttag 2820
 ccaaataatca acataaagtt acctgctctg tccccctcag attacgtcct acgtgtctcc 2880
 ttcccaaaaca tgaaaatcct ttttatatta agtaaactat ttttatatta tgaaataata 2940

ES 2 582 552 T3

ataaaa aaaa	tattttatca	ttattaacaa	aatcatatta	gttaatt tgt	taactctata	3000
ataaaa gaaa	tactgtaaca	ttcacattac	atggtaacat	ctttccaccc	tttcatttgt	3060
tttttg tttg	atgacttttt	ttcttg ttta	aatttatttc	ccttctttta	aatttgg aat	3120
acattat cat	catatataaa	ctaaaatact	aaaaacagga	ttacacaaat	gataaataat	3180
aacacaa ata	tttataaa tc	tagctgcaat	atattt aac	tagctat atc	gatattg taa	3240
aataaaa acta	gctgcattga	tactgataaa	aaaat atcat	gtgcttt ctg	gactgat gat	3300
gcagtat act	tttgacattg	cctttat ttt	at ttttcaga	aaagct ttct	tagttct ggg	3360
ttcttc atta	tttg tttccc	atctcc attg	tgaatt gaat	catttg cttc	gtgtc acaaa	3420
tacattt tagc	taggtac gtg	cattggt cag	attcac ggtt	tattat gtca	tgactt aagt	3480
tcatgg tagt	acattac ctg	ccacgc atgc	attat attgg	ttagatt tga	taggca aat	3540
tggttg tcaa	caatata aat	ataaa aatg	ttttt atatt	acgaa aat	agtgat caaa	3600
acaacag tt	ttatct ttat	taacaag att	ttgtt tttgt	ttgat gacgt	ttttt aatgt	3660
ttacgc tttc	cccctt cttt	tgaatt taga	acactt t atc	atcata aaat	caaata actaa	3720
aaaaa attaca	tatttc ataa	ataata aacac	aaatatt ttt	aaaaa atctg	aaata aat	3780
gaacaat att	acatatt atc	acgaaa attc	attaata aaa	atattat ata	aataaa atgt	3840
aatagtag tt	atatgt tagga	aaaaa gtact	gcacgc ataa	tatata caaaa	aagatt aaaa	3900
tgaactat ta	taaata ataa	cactaa atta	atgg tgaatc	atatc aaaat	aatgaa aaag	3960
taaataa aat	ttgtaat taa	cttctat atg	tattac acac	acaata ata	aataat agta	4020
aaaaaa atta	tgataaa at	ttaccat ctc	ataaa gat	ttaaa aat	gataaa aata	4080
tagattat ttt	tttatg caac	tagctag cca	aaaaga aac	acgggt atat	ataaaa agag	4140
tacctt taaa	ttctact gta	cttcttt at	tcctg acgtt	tttatat caa	gtggac atac	4200
gtgaagat ttt	taattat cag	tctaaat att	tcattag cac	ttaata cttt	tctgtt ttat	4260
tcctatc cta	taagtag tcc	cgattct ccc	aacattg ctt	attcac acaa	ctaact aaga	4320
aagtett cca	tagcccc ca	agcgcc gct	gagtgat tgc	tcacgag tgt	ggtcacc atg	4380
ccttcag caa	gtaccaat gg	gttgatg atg	ttgtggg ttt	gaccctt cac	tcaacact tt	4440
tagtccct ta	tttctcat gg	aaaataag cc	atcgccg cca	tactcca aac	acaggtt ccc	4500
ttgaccgt ga	tgaagtgt tt	gtcccaa aac	caaaatc caa	agttgca tgg	ttttcca agt	4560
acttaaa caa	ccctctag ga	agggctg ttt	ctcttct cgt	cacactc aca	ataggg tggc	4620
ctatgtat ttt	agccttca at	gtctctg gta	gaccctat ga	tagtttt gca	agccact acc	4680
acccttat gc	tcccatat at	attaacc gtg	agaggctt ct	gatctat gtc	tctgatg ttg	4740
ctttgtt ttc	tgtgactt ac	tctctct acc	gtgttgca ac	cctgaaag gg	ttggttt ggc	4800

ES 2 582 552 T3

tgctatgtgt ttatggggtg cctttgctca ttgtgaacgg ttttcttgtg actatcacat 4860
 atttgcagca cacacacttt gccttgcoctc attacgattc atcagaatgg gactggctga 4920
 agggagcttt ggcaactatg gacagagata agcggccgcg acacaagtgt gagagtacta 4980
 aataaatgct ttggttgtag gaaatcatta cactaaataa aataatcaaa gcttatatat 5040
 gccttccgct aaggccgaat gcaaagaaat tggttctttc tcgttatctt ttgccacttt 5100
 tactagtacg tattaattac tacttaatca tctttgttta cggctcatta tatccgctga 5160
 cggatataat gagccgtaaa caaagatgat taagtagtaa ttaatacgtc ctagtaaaag 5220
 tggcaaaaga taacgagaaa gaaccaattt ctttgcattc ggccttagcg gaaggcatat 5280
 ataagctttg attattttat ttagtgtaat gatttcgtac aaccaagca tttatttagt 5340
 actctcacac ttgtgtcgcg gccgcttacc tctgtccata gttgccaaag ctcccttcag 5400
 ccagtcccat tctgatgaat cgtaatgagg caaggcaaag tgtgtgtgct gcaaatatgt 5460
 gatagtcaca agaaaaccgt tcacaatgag caaaggcacc ccataaacac atagcagcca 5520
 aaccaaccct ttcagggttg caacacggta gagagagtaa gtcacagaaa acaaagcaac 5580
 atcagagaca tagatcagaa gcctctcagc gttagaatat atgggagcat aagggtggta 5640
 gtggcttgca aaactatcat agggctacc agagacattg aaggctaat acataggcca 5700
 ccctattgtg agtgtgacga gaagagaaac agcccttcct agagggttgt ttaagtactt 5760
 ggaaaaccat gcaactttgg attttggttt tgggacaaac acttcatcac ggtcaagggg 5820
 acctgtgttg gagtgatggc ggcgatggct tattttccat gagaaataag ggactaaaag 5880
 tgttgagtga agggcaaac ccacaacatc atcaaccat tggacttgc tgaaggcatg 5940
 gtgaccacac tcgtgagcaa tcactcagcg gccgcttggg gggctatgga agactttctt 6000
 agttagttgt gtgaataagc aatgttggga gaatcgggac tacttatagg ataggaataa 6060
 aacagaaaag tattaagtgc taatgaaata tttagactga taattaaaat cttcacgtat 6120
 gtccacttga tataaaaaag tcaggaataa aggaagtaca gtagaattta aaggctactc 6180
 ttttatatat acccgtgttc tctttttggc tagctagttg cataaaaaat aatctatatt 6240
 tttatcatta ttttaaataat ctttatgaga tggtaaatat ttatcataat ttttttact 6300
 attatttatt atttgtgtgt gtaatacata tagaagttaa ttacaaattt tatttacttt 6360
 ttcattattt tgatatgatt caccattaat ttagtgttat tatttataat agttcatttt 6420
 aatctttttg tatatattat gcgtgcagta cttttttcct acatataact actattacat 6480
 tttatttata taatattttt attaatgaat tttcgtgata atatgtaata ttgttcatta 6540
 ttatttcaga ttttttaaaa atatttgtgt tattatttat gaaatatgta atttttttag 6600
 tatttgattt tatgatgata aagtgttcta aattcaaaag aaggggggaaa gcgtaaacat 6660
 taaaaaacgt catcaaacaa aaacaaaatc ttgttaataa agataaaact gtttgttttg 6720

ES 2 582 552 T3

atcactgtta	tttcgtaata	taaaaacatt	atattatattt	atattggtga	caaccaaatt	6780
tgccatcaa	atctaacc	tataatgcat	gcgtggcagg	taatgtacta	ccatgaactt	6840
aagtcacgac	ataataaacc	gtgaatctga	ccaatgcatg	tacctagcta	aatgtatttg	6900
tgacacgaag	caaatgattc	aattcacaat	ggagatggga	aacaaataat	gaagaacca	6960
gaactaagaa	agcttttctg	aaaaataaaa	taaaggcaat	gtcaaaaagta	tactgcatca	7020
tcagtccaga	aagcacatga	tattttttta	tcagtatcaa	tgacagctagt	tttattttac	7080
aatatcgata	tagctagttt	aaatatattg	cagctagatt	tataaatatt	tgtgttatta	7140
tttatcattt	gtgtaatcct	gttttttagta	tttttagttta	tatatgatga	taatgtattc	7200
caaatttaaa	agaagggaag	taaatttaaa	caagaaaaaa	agtcacaaa	caaaaaacaa	7260
atgaaagggg	ggaaagatgt	taccatgtaa	tgtgaatggt	acagtatttc	ttttattata	7320
gagttaacaa	attaactaat	atgattttgt	taataatgat	aaaatatttt	ttttattatt	7380
atctcataat	ataaaaatag	tttacttaat	ataaaaaaaa	attctatcgt	tcacaacaaa	7440
gttggccacc	taatttaacc	atgcatgtac	ccatggacca	tattaggtaa	ccatcaaacc	7500
tgatgaagag	ataaagagat	gaagacttaa	gtcataaacac	aaaaccataa	aaaacaaaaa	7560
tacaatcaac	cgccaatctg	accaatgcat	gaaaaagctg	caatagtgag	tgccgacaca	7620
aagcacatga	ttttcttaca	acggagataa	aaccaaaaaa	atatttcatg	aacaacctag	7680
aacaaataaa	gctttttatat	aataaatata	taaataaata	aaggctatgg	aataatatac	7740
ttcaatatat	ttggattaaa	taaattggtg	gcgggggtga	tatattttata	cacacctaaa	7800
gtcaacttcaa	tctcattttc	acttaacttt	tatttttttt	ttctttttat	ttatcataaa	7860
gagaatattg	ataatatact	ttttaacata	tttttatgac	attttttata	cttctatag	7920
taattgtatg	gtggcgatct	ttgatatttg	ttatctacct	tgctgtctat	ataaattgat	7980
ggtggcgttt	caaaaaacta	gtagggcaca	ttttcttttt	ttgaagaaag	tagagcgaca	8040
gtaaaggggg	gtttggtaaa	aaataaatgt	gcataaagaa	tattatattg	taacagaaac	8100
agaaacagat	tagagtctac	aatgctaata	taatcttgtc	atgtgaatca	atgtaatatc	8160
ctatgaaata	ttttttttac	atgtaagaat	aaaaacagat	attaataatt	tataataatt	8220
tatatttctt	gttcaattaa	ctgaattaa	ttccatcgat	tctaatagtaa	aatatatggt	8280
gagaattcca	atgaaacaag	catcatattc	gtgaatagca	tgcatgtaaa	aatcgttgat	8340
gcaataaat	tgaatgtaat	taacaaataa	ataaagtatt	aaattttagg	cggataaatat	8400
tttttggtta	tacataatag	aataggtaat	ataaaatcgt	tttttttatc	taacatgaag	8460
cttaagcttt	tggtattctt	gactcatgac	atgttaataa	gagattattt	gcttcacata	8520
catttttctt	atccattttc	aatatggata	ccactgctac	ctccgatgct	aacgtttgag	8580

ES 2 582 552 T3

cttccaactc tccaaaactt atcattgta caaattaaac ccttgaaatg atagcaacag 8640
 caatcatgca cttatattct taaacacagt ggcactcaac tttattcaa actctctag 8700
 tctctaatta tcatgattta ggatagttca ataaaagggt gtacttgtct ataagaggtc 8760
 tcatagattg tgttgatggt aatttgacca aattcaaaca tgttaaaatt gcatgcttca 8820
 cctttaacc tgaatgtaat cactaatcac tagattcgct cggacctgct tattgttctt 8880
 gtaattgtca attaactc attaccatac tagtaggacc gcagatcaac tctcaagatg 8940
 ctttggtgga cattttgaag acaatatatg tatgcaaac gccctcatac ttggatcttg 9000
 tctcttgatc gaggatcgaa aagtttttc gcgttgaact ataaaggaga aatttctatc 9060
 catatttatt agtttgcaac aaattaaagc tcttcctgat gaactatcaa tcaacattgg 9120
 gacaattgat cttgttaaca attatcccat gacattccta ataacatgaa aaacgtatgg 9180
 actttgaaac ataataacta ttggagatat atatattaat taatttcaag ttaggagcag 9240
 tctcgaggag ccccaactcc ggtgggggag gctccccgc caggaacgga agaccgaggc 9300
 tccagcaaac actcgctggc aaaggcgaga tatcattatc catgagcccg aagggaaata 9360
 gcgtattgac cacaaaatca acacgtgccg taacagaacc gtcatagcca caaactcaac 9420
 tctaaattag cccaagtaat aagtgttgat ggaggtcatt atttggcata agatcacccc 9480
 ttgacctgga gaaaaattac catattatat caagacagga aattattgcc tgaggtgcta 9540
 ggaaccaacc caccttaaac tagtataagt acaacaatg tcattgtata ctgggttacc 9600
 ggaaaaaaag aagcaaccga gcatgactcg aaccacagag cgtgctttac cactatgttg 9660
 gagcgttga ggctattcat tgatacatta ttatcaaag taatatttaa tatatatata 9720
 tatataacat ccaacatgac tcaaagccac aacgatgctc cttcttctt ttctgttgt 9780
 tgtgctattg tatggtaaat cattaaaaa agatttaatt aaaaaatatt ataaattatt 9840
 tataactaac atagtttgtt tcaaaaattg gagattttga taattatttc aattgtaatt 9900
 ttactgtata tttgcctaac taactaacac tcaccaacca agcataacat gtgtcatgta 9960
 gtattgcacc atgcacatta atcatattcc tttggtattt ttgttttcaa gaaataaaaa 10020
 aaaatatggg tgcttactcg agcaacttgc tttgatca 10058

<210> 83
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Zona de unión 5' de 20-nt del cóntigo-4

<400> 83
 atgaaaatcc ttttatatt 20

10

<210> 84
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Zona de unión 3' de 20-nt del cóntigo-4

<400> 84
 catttttat acttctatat 20

5 <210> 85
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Zona de unión 5' de 40-nt del cóntigo-4

<400> 85
 ctcccaaac atgaaaatcc ttttatatt aagtaaacta 40

10 <210> 86
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Zona de unión 3' de 40-nt del cóntigo-4

<400> 86
 attttatga catttttat acttctatat gtaattgtat 40

15 <210> 87
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Zona de unión 5' de 60-nt del cóntigo-4

<400> 87
 tacgtgtctc ctcccaaac atgaaaatcc ttttatatt aagtaaacta ttttatatt 60

20 <210> 88
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Zona de unión 3' de 60-nt del cóntigo-4

<400> 88
 ttttaacat attttatga catttttat acttctatat gtaattgtat ggtggcgatc 60

25 <210> 89
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador directo QPCR de la zona de unión 5' del cóntigo-1

<400> 89
 tgtcacatta caagtgagat gtcacatca 27

30 <210> 90
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador inverso QPCR de la zona de unión 5' del cóntigo-1

35 <210> 90
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial

40 <210> 90
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <210> 90
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial

50 <210> 90
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial

ES 2 582 552 T3

<400> 90
 tctcgttatc ttttgccact ttactag 28

 <210> 91
 <211> 19
 5 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sonda QPCR de la zona de unión 5' del cóntigo-1

 <400> 91
 10 caagcttggt actaacata 19

 <210> 92
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> Cebador directo QPCR de SAMS-HRA

 <400> 92
 ggctgttgt gcagttttg aa 22

 20 <210> 93
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador inverso QPCR de SAMS-HRA

 25 <400> 93
 ggaagaagag aatcgggtgg tt 22

 <210> 94
 <211> 16
 <212> ADN
 30 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sonda QPCR de SAMS-HRA

 <400> 94
 35 caacacaatg gcggcc 16

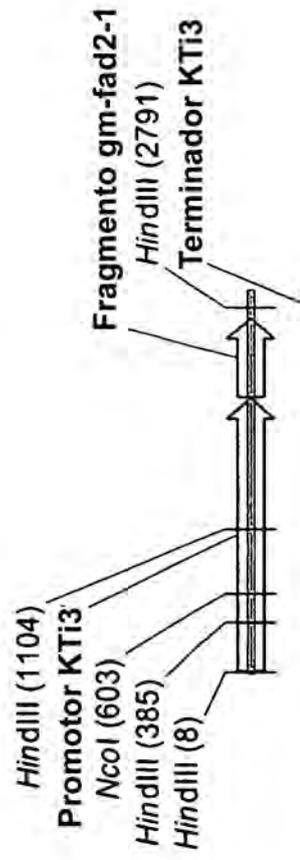
REIVINDICACIONES

- 1.- Un polinucleótido aislado que comprende la SEQ ID NO:5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 84, 85, 86, 87 o 88, o su complemento.
- 2.- Una planta de soja o una semilla de soja que comprende las SEQ ID NO:5, 6, 7 y 82.
- 5 3.- Un método para identificar si una muestra biológica comprende un polinucleótido que comprende cualquiera de SEQ ID NO:5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 o 88, comprendiendo dicho método:
- a) poner en contacto dicha muestra biológica con un primer y un segundo cebador, en el que el primer cebador se asocia con:
- 10 i) una región genómica 5' de SEQ ID NO:5, 6, 7 o 82, o su complemento, o
- ii) una región 3' genómica de SEQ ID NO:5, 6, 7 o 82, o su complemento, y
- en el que la segunda secuencia de cebador se asocia con una región de inserción de SEQ ID NO:5, 6, 7 o 82, o su complemento, y la región de inserción comprende los nucleótidos 18.652-31.579 de SEQ ID NO:5, los nucleótidos 12.164-14.494 de SEQ ID NO:6, los nucleótidos 5.751-7.813 de SEQ ID NO:7, o los nucleótidos 2.900-7.909 de
- 15 SEQ ID NO:82;
- b) amplificar un polinucleótido que comprende cualquiera de SEQ ID NO:8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 83, 84, 85, 86, 87 o 88; y
- c) confirmar que dicha muestra biológica comprende un polinucleótido que comprende cualquiera de SEQ ID NO:5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 o 88.
- 20 4.- El método de la reivindicación 3, que comprende además detectar un polinucleótido que comprende la SEQ ID NO:5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 o 88, o su complemento, mediante la hibridación con una sonda, en el que dicha sonda se hibrida selectivamente bajo condiciones rigurosas con un polinucleótido que comprende la SEQ ID NO:8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 83, 84, 85, 86, 87 o 88, o su complemento, en el que dichas condiciones de hibridación
- 25 son una hibridación en formamida al 50%, NaCl 1,0 M, SDS al 1% a 37 °C y un lavado en 0,1 x SSC de 60 a 65 °C, en el que la sonda tiene una longitud de al menos 8 nucleótidos y tiene una longitud suficiente de nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:5, 6, 7 o 82, o su complemento, para actuar como sonda de ADN que puede detectar y/o identificar específicamente un ADN que comprende la SEQ ID NO:8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 83, 84, 85, 86, 87 o 88, o su complemento.
- 30 5.- El método de la reivindicación 3 o 4, en el que dicho primer o dicho segundo cebador comprende un fragmento de al menos 6 nucleótidos de SEQ ID NO:5, 6, 7 o 82, o su complemento.
- 6.- El método de la reivindicación 5, en el que dicho primer o dicho segundo cebador comprende la SEQ ID NO: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, 89, 90, 91, 92, 93 o 94.
- 35 7.- Un método para detectar la presencia de un polinucleótido que comprende la SEQ ID NO:5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 o 88 en una muestra biológica que comprende ADN, que comprende:
- (a) extraer una muestra de ADN de dicha muestra biológica;
- (b) poner en contacto dicha muestra de ADN con al menos una pareja de moléculas de cebador de ADN
- 40 seleccionadas del grupo que consiste en:
- i) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:26 y SEQ ID NO:27;
- ii) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:29 y SEQ ID NO:30;
- iii) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:31 y SEQ ID NO:32;
- iv) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:33 y SEQ ID NO:34;
- 45 v) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:35 y SEQ ID NO:36;
- vi) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:37 y SEQ ID NO:38;
- vii) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:39 y SEQ ID NO:40;

- viii) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:41 y SEQ ID NO:42;
 - ix) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:43 y SEQ ID NO:44;
 - x) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:45 y SEQ ID NO:46;
 - xi) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:47 y SEQ ID NO:48;
 - 5 xii) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:47 y SEQ ID NO:49;
 - xiii) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:50 y SEQ ID NO:51;
 - xiv) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:52 y SEQ ID NO:53;
 - xv) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:54 y SEQ ID NO:49;
 - xvi) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:55 y SEQ ID NO:46;
 - 10 xvii) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:33 y SEQ ID NO:56;
 - xviii) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:57 y SEQ ID NO:58;
 - xix) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:59 y SEQ ID NO:60;
 - xx) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:61 y SEQ ID NO:36;
 - xxi) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:35 y SEQ ID NO:62;
 - 15 xxii) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:37 y SEQ ID NO:63;
 - xxiii) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:64 y SEQ ID NO:65;
 - xxiv) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:66 y SEQ ID NO:67;
 - xxv) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:68 y SEQ ID NO:69;
 - xxvi) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:70 y SEQ ID NO:71;
 - 20 xxvii) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:72 y SEQ ID NO:73;
 - xxviii) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:74 y SEQ ID NO:75;
 - xxix) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:76 y SEQ ID NO:77;
 - xxx) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:78 y SEQ ID NO:79;
 - xxxi) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:80 y SEQ ID NO:81; y
 - 25 xxxii) las secuencias que comprenden SEQ ID NO:89 y SEQ ID NO:90;
- (c) proporcionar condiciones de reacción de amplificación de ADN;
- (d) realizar dicha reacción de amplificación de ADN, produciendo con ello una molécula de amplicón de ADN; y
- (e) detectar dicha molécula de amplicón de ADN, en el que la detección de dicha molécula de amplicón de ADN en dicha reacción de amplificación de ADN indica la presencia de un polinucleótido que comprende la SEQ ID NO:8, 9,
- 30 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 83, 84, 85, 86, 87 o 88,
- o
- (a') poner en contacto la muestra biológica que comprende ADN bajo condiciones de hibridación rigurosas con una sonda polinucleotídica, en el que dicha sonda se hibrida selectivamente bajo condiciones de hibridación rigurosas con un polinucleótido que comprende la SEQ ID NO:8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24,
- 35 25, 83, 84, 85, 86, 87 o 88, o su complemento, en el que dichas condiciones de hibridación son una hibridación en formamida al 50%, NaCl 1,0 M, SDS al 1% a 37 °C y un lavado en 0,1 x SSC de 60 a 65 °C, en el que la sonda tiene una longitud de al menos 8 nucleótidos y tiene una longitud suficiente de nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:5, 6, 7 o 82, o su complemento, para actuar como sonda de ADN que puede detectar y/o identificar específicamente un
- 40 ADN que comprende la SEQ ID NO:8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 83, 84, 85, 86, 87 o 88, o su complemento; y
- (b') detectar la hibridación de la sonda con el ADN.

- 8.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, en el que dicha muestra comprende tejido de soja.
- 9.- Una pareja de cebadores de ADN que comprende un primer cebador de ADN y un segundo cebador de ADN, en el que los cebadores de ADN tienen una longitud de al menos 6 nucleótidos y tienen una longitud suficiente de nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:5, 6, 7 o 82, o su complemento, para actuar como cebadores de ADN que pueden detectar y/o identificar específicamente un ADN que comprende la SEQ ID NO:5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 o 88, o su complemento, y en el que primer cebador se asocia con;
- 5 a) una región genómica 5' de SEQ ID NO:5, 6, 7 o 82, o su complemento, o
- b) una región genómica 3' de SEQ ID NO:5, 6, 7 o 82, o su complemento, y
- 10 en el que la secuencia del segundo cebador se asocia con una región de inserción de SEQ ID NO:5, 6, 7 o 82, o su complemento, y la región de inserción comprende los nucleótidos 18.652-31.579 de SEQ ID NO:5, los nucleótidos 12.164-14.494 de SEQ ID NO:6, los nucleótidos 5.751-7.813 de SEQ ID NO:7, o los nucleótidos 2.900-7.909 de SEQ ID NO:82.
- 15 10.- Un método para seleccionar semillas para detectar la presencia de un polinucleótido que comprende la SEQ ID NO:5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 o 88, que comprende:
- a) poner en contacto una muestra que comprende ADN de dicha semilla con un primer y un segundo cebador de ADN, en el que el primer cebador se asocia con:
- i) una región genómica 5' de SEQ ID NO:5, 6, 7 o 82, o su complemento, o
- 20 ii) una región genómica 3' de SEQ ID NO:5, 6, 7 o 82, o su complemento, y
- en el que la secuencia del segundo cebador se asocia con una región de inserción de SEQ ID NO:5, 6, 7 o 82, o su complemento, y la región de inserción comprende los nucleótidos 18.652-31.579 de SEQ ID NO:5, los nucleótidos 12.164-14.494 de SEQ ID NO:6, los nucleótidos 5.751-7.813 de SEQ ID NO:7, o los nucleótidos 2.900-7.909 de SEQ ID NO:82;
- 25 b) amplificar un polinucleótido que comprende un polinucleótido que comprende la SEQ ID NO:8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 83, 84, 85, 86, 87 o 88; y
- c) detectar dicho polinucleótido amplificado, o
- a') poner en contacto una muestra que comprende ADN de dicha semilla bajo condiciones de hibridación rigurosas con una sonda polinucleotídica que se hibrida selectivamente bajo condiciones de hibridación rigurosas con un polinucleótido que comprende la SEQ ID NO:8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 83, 84, 85, 86, 87 o 88, o su complemento, en el que dichas condiciones de hibridación son una hibridación en formamida al 50%, NaCl 1,0 M, SDS al 1% a 37 °C y un lavado en 0,1 x SSC de 60 a 65 °C, en el que la sonda tiene una longitud de al menos 8 nucleótidos y tiene una longitud suficiente de nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:5, 6, 7 o 82, o su complemento, para actuar como sonda de ADN que puede detectar y/o identificar específicamente un
- 30 ADN que comprende la SEQ ID NO:8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 83, 84, 85, 86, 87 o 88, o su complemento; y
- 35 (b') detectar la hibridación de la sonda con el ADN.

FIG. 1



PHP19340A
2924 pb

Fig. 2

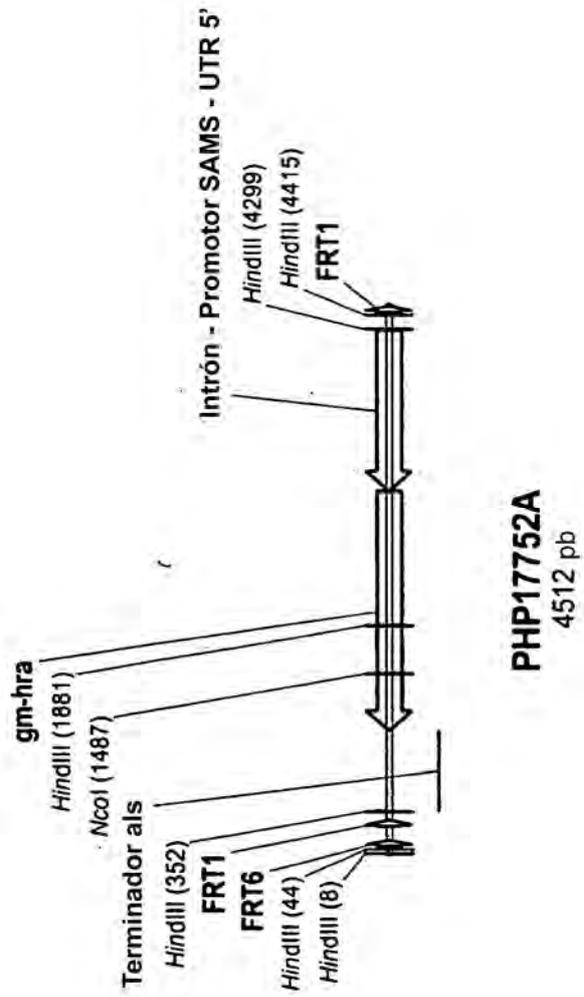


FIG. 3

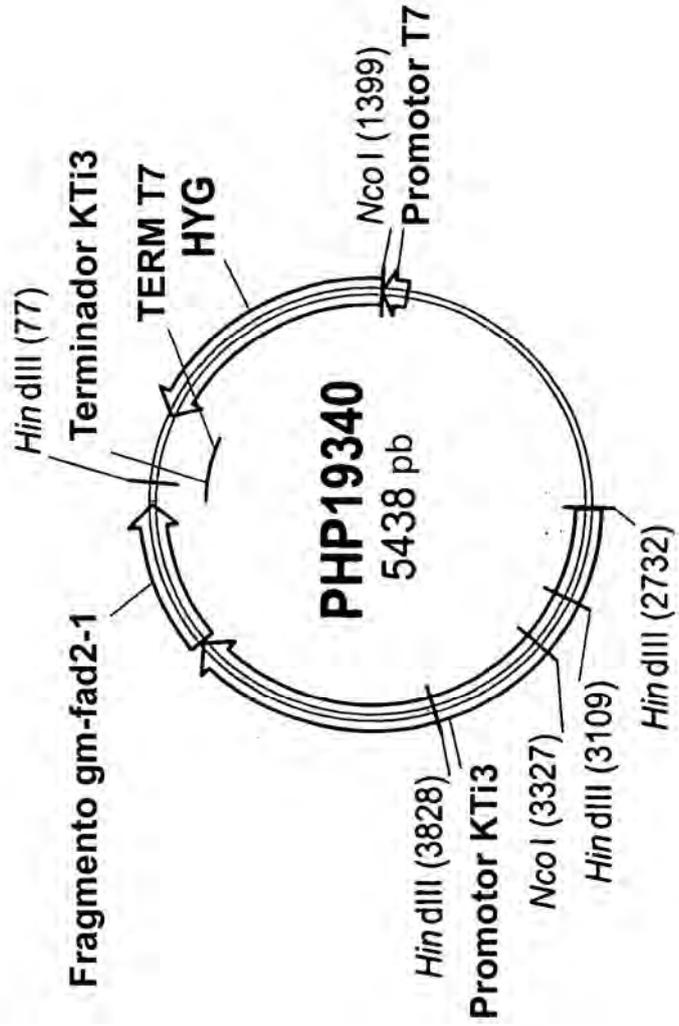
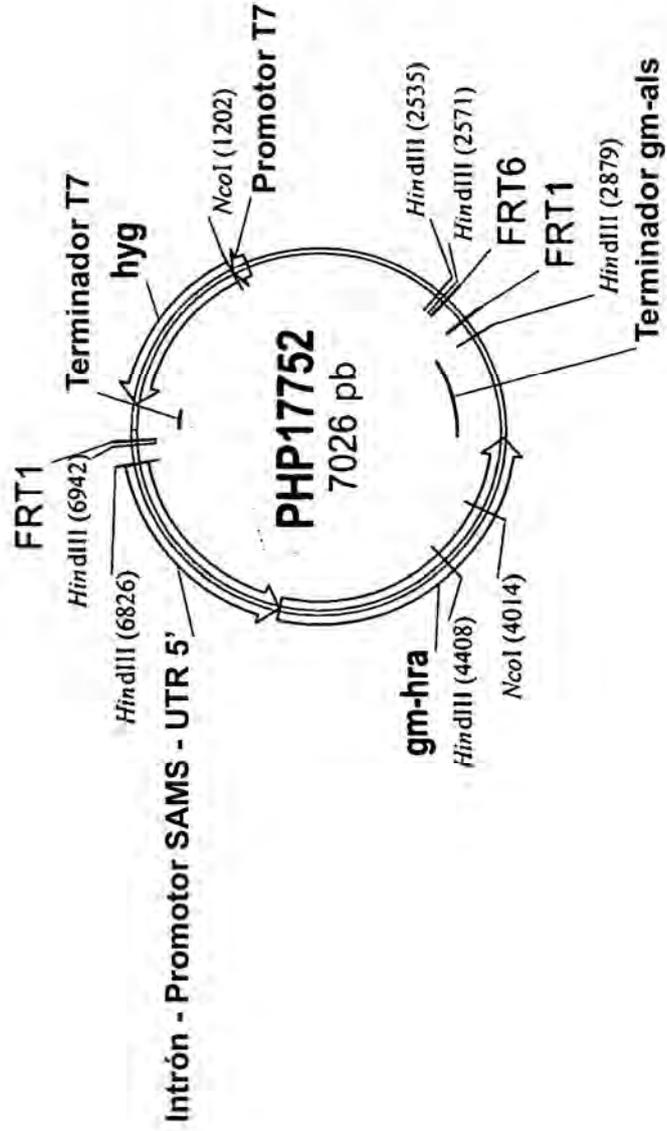


FIG. 4



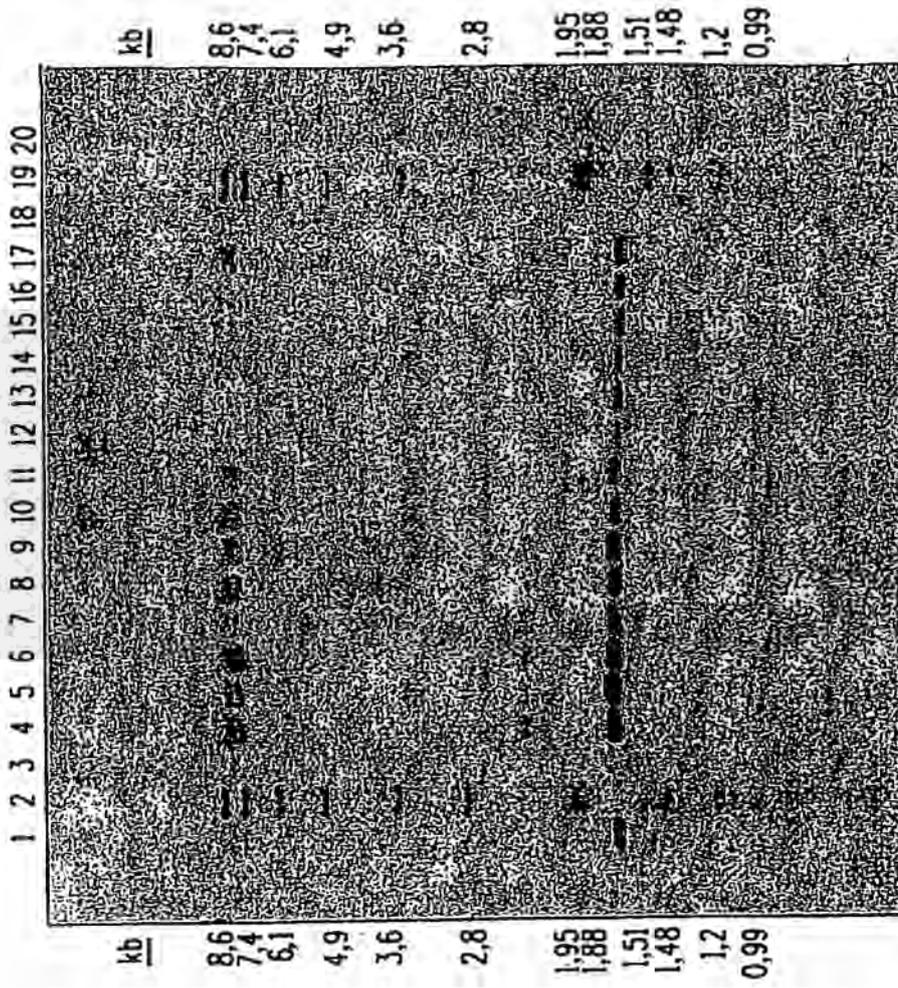


FIG. 5

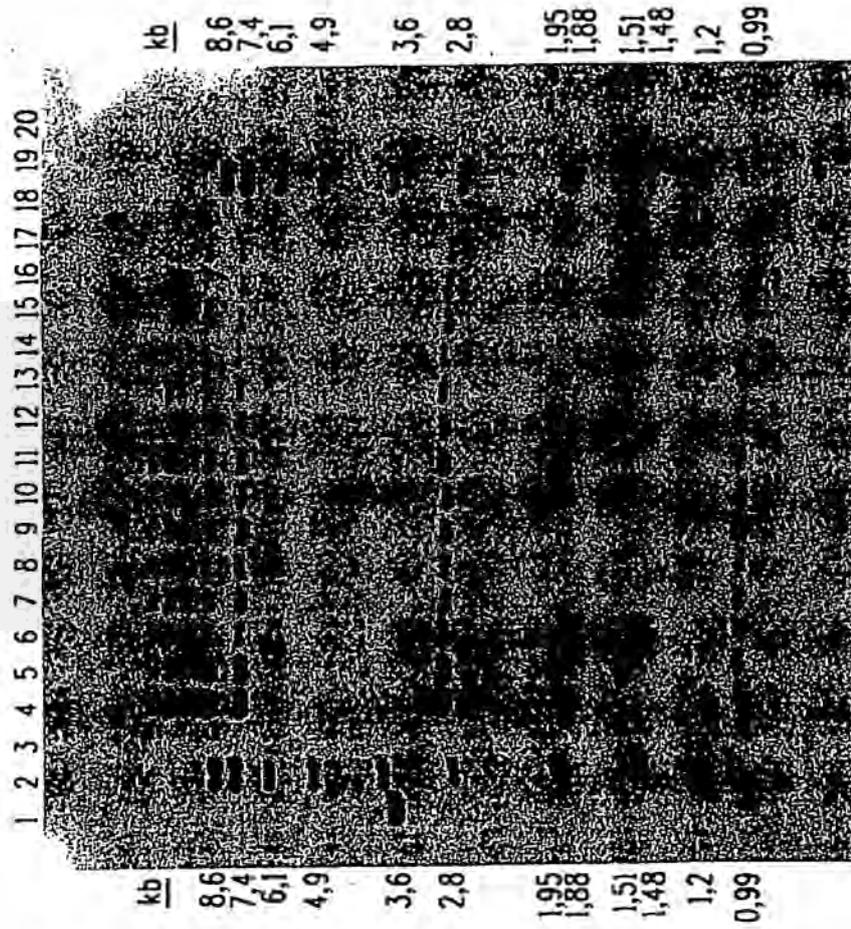


FIG. 6

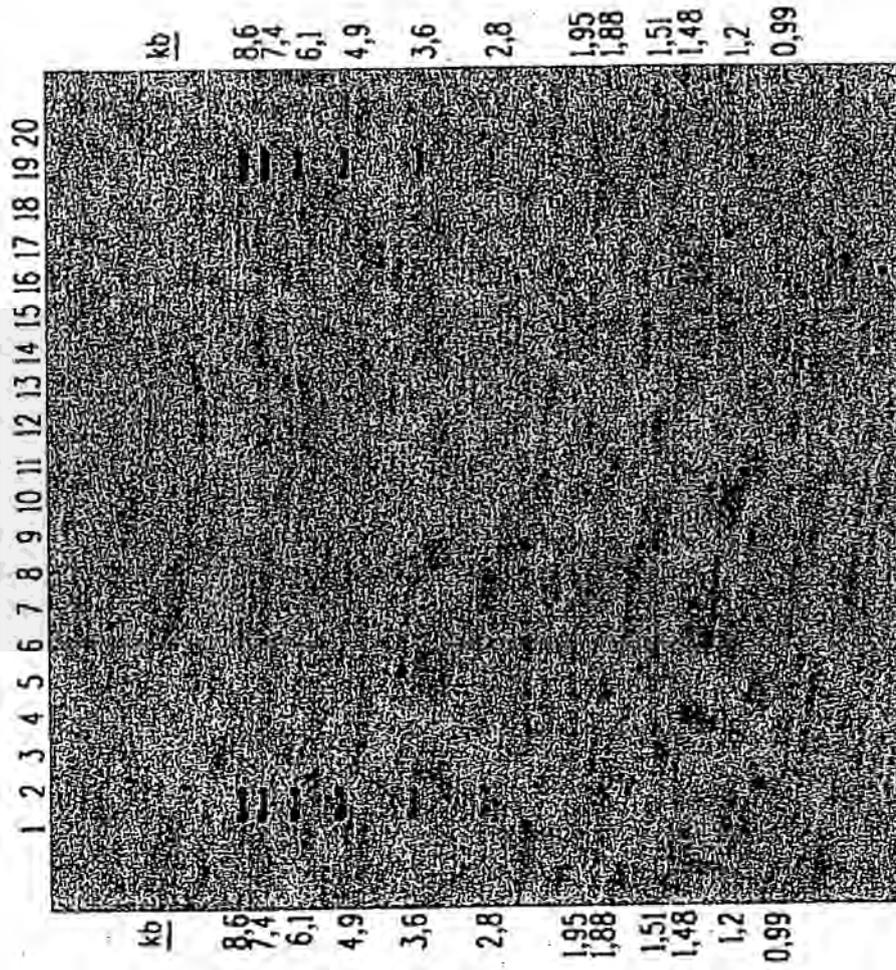


FIG. 7

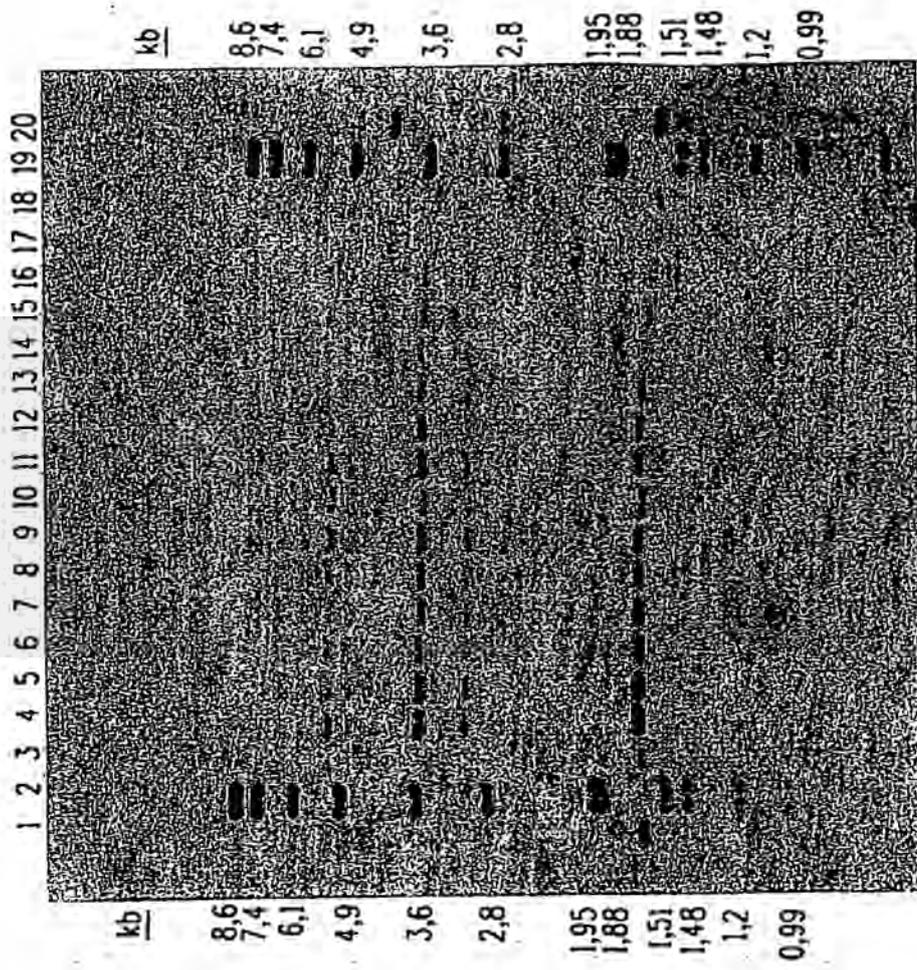
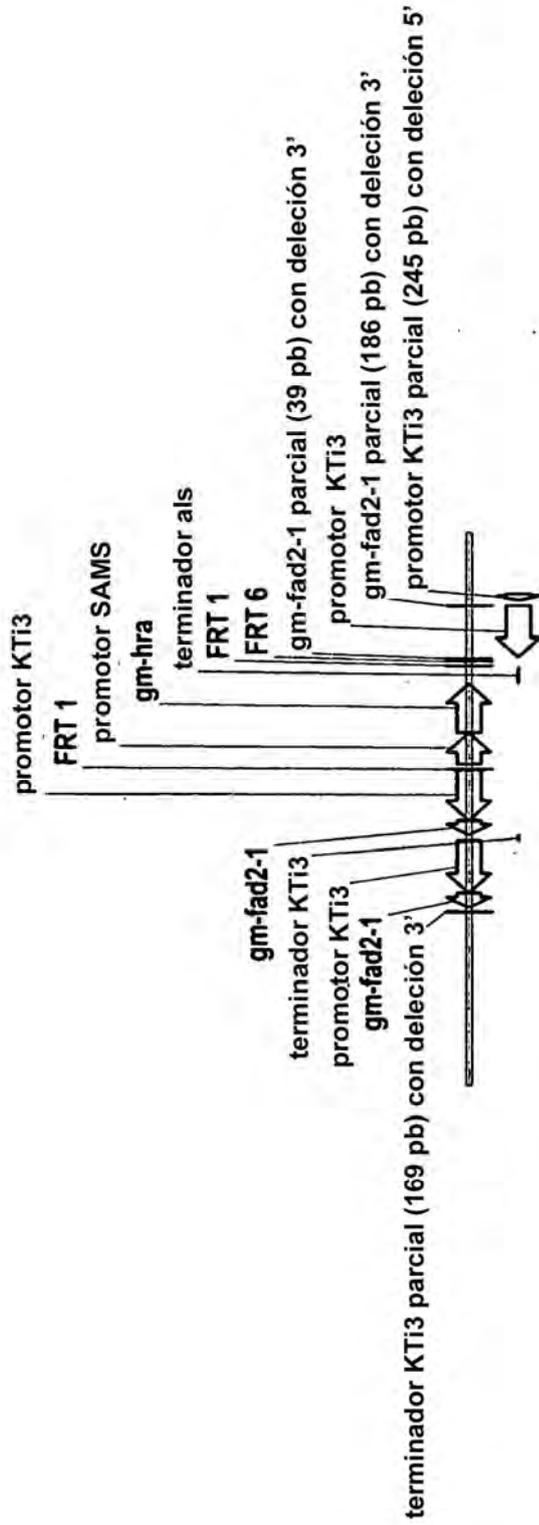


FIG. 8

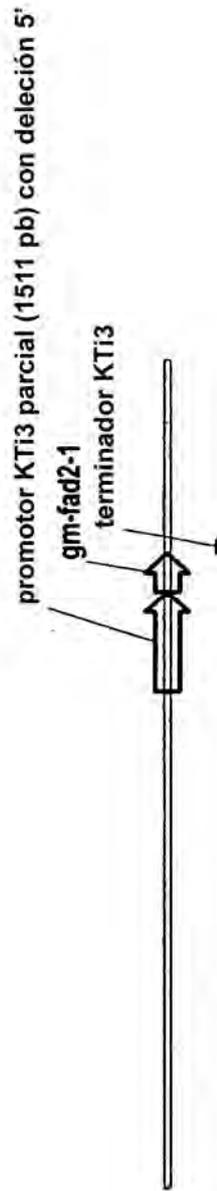
FIG. 9



Cóntigo-1: Inserción-1 y regiones de límite flanqueantes

22452 pb

FIG. 10



Cóntigo-2: Inserción-2 y regiones de límite flanqueantes
12667 pb

FIG. 11

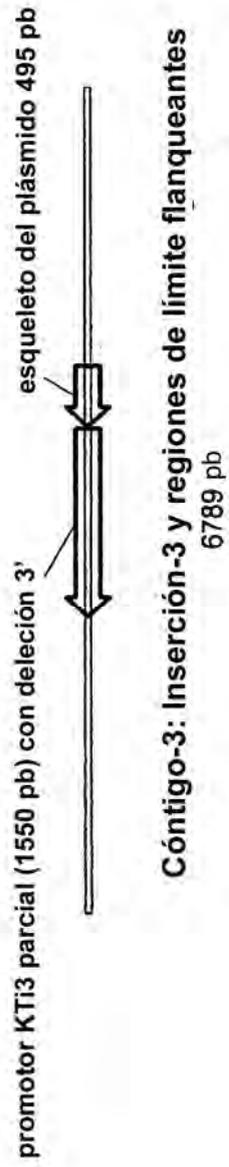
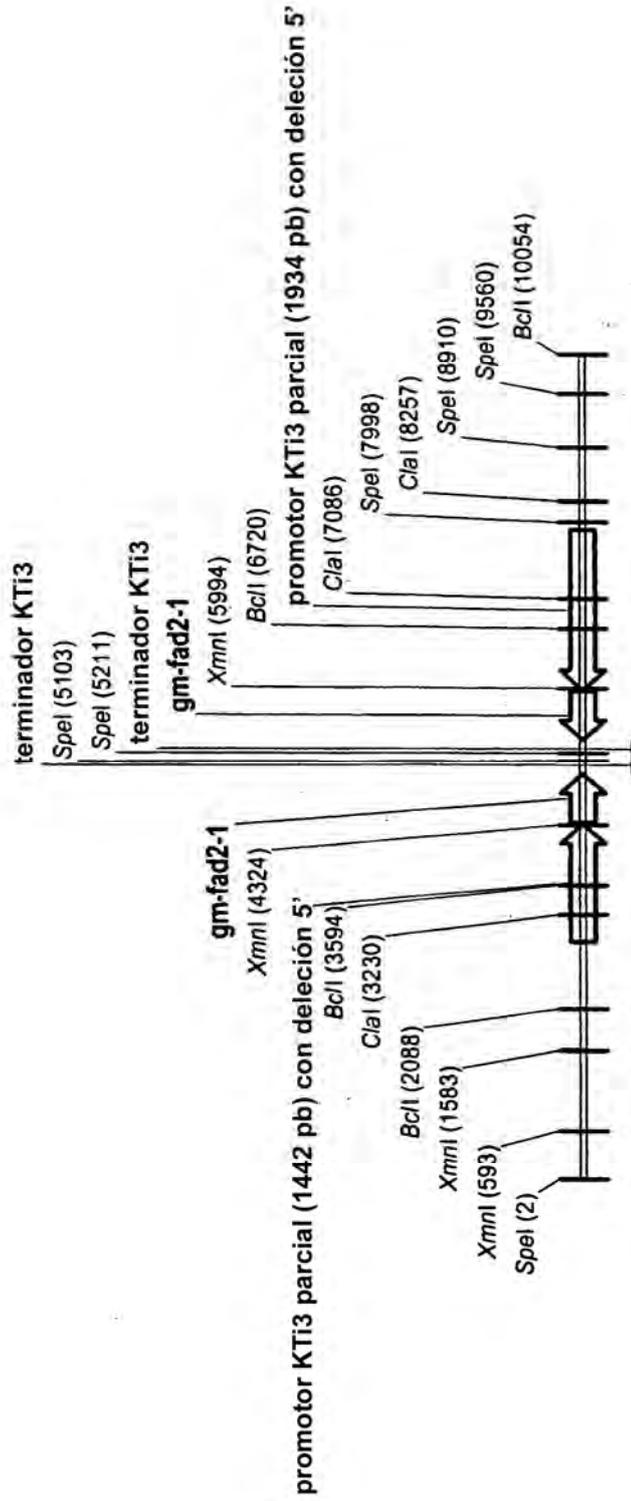


FIG. 12



Cóntigo-4: Inserción-4 y regiones de límite flanqueantes

10058 pb