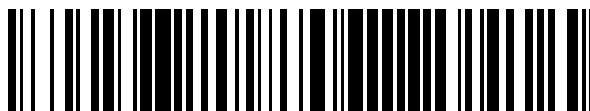


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 603 857**

51 Int. Cl.:

A01H 5/10 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.05.2006** **PCT/US2006/020323**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.12.2006** **WO06130436**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2006** **E 06771226 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.08.2016** **EP 1885176**

54 Título: **Evento MON89788 de soja y procedimientos para la detección del mismo**

30 Prioridad:

27.05.2005 US 685584 P

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

01.03.2017

73 Titular/es:

MONSANTO TECHNOLOGY, LLC (100.0%)
800 NORTH LINDBERGH BOULEVARD
ST. LOUIS, MO 63167, US

72 Inventor/es:

MALVEN, MARIANNE;
RINEHART, JENNIFER;
TAYLOR, NANCY y
DICKINSON, ELLEN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 603 857 T3

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

DESCRIPCIÓN

Evento MON89788 de soja y procedimientos para la detección del mismo

Antecedentes de la invención**1. Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere a un evento distintivo de transformación de soja transgénica, designado MON89788, un cultivar de soja derivado del mismo, y partes de la planta, semillas, y productos de la misma. Además se desvelan ensayos para detectar la presencia de una molécula de ADN específica de MON89788 en un extracto de una parte de la planta o un extracto de semilla.

2. Descripción de la técnica relacionada

- 10 La soja (*Glycine max*) es un cultivo importante en muchas áreas del mundo. Se han aplicado procedimientos de biotecnología a la soja para mejorar los rasgos agronómicos y la calidad del producto. Uno de dichos rasgos agronómicos importante en la producción de soja es la tolerancia a herbicidas, en particular, la tolerancia al herbicida glifosato. Un evento de soja tolerante a herbicidas sería un rasgo útil para gestionar las malas hierbas.

- 15 La N-fosfonometilglicina, también conocida como glifosato, es un herbicida bien conocido que tiene actividad sobre un amplio intervalo de especies vegetales. El glifosato es el ingrediente activo del Roundup® (Monsanto Co., St. Louis, MO), un herbicida seguro que tiene deseablemente una semivida corta en el medio ambiente. Cuando se aplica a una superficie de una planta, el glifosato se desplaza sistémicamente por la planta. El glifosato es fitotóxico debido a su inhibición de la ruta del ácido shikímico, que proporciona un precursor para la síntesis de aminoácidos aromáticos. El glifosato inhibe la enzima 5-enolpiruvil-3-fosfoshikimato sintasa (EPSPS) que se encuentra en las plantas.

- 20 La tolerancia al glifosato se puede conseguir con la expresión de variantes de EPSPS que tienen una afinidad menor por el glifosato y por lo tanto mantienen su actividad catalítica en presencia de glifosato (Patente de EE. UU. N° 5.633.435; 5.094.945; 4.535.060 y 6.040.497). Las enzimas que degradan el glifosato en los tejidos vegetales (Patente de EE. UU. N° 5.463.175) también son capaces de conferir una tolerancia celular al glifosato. Dichos genes se utilizan para la producción de cultivos transgénicos que son tolerantes al glifosato, permitiendo de esta manera que se utilice el glifosato para el control de malas hierbas eficaz con una preocupación mínima por los daños a los cultivos. Por ejemplo, se ha modificado genéticamente la tolerancia al glifosato en el maíz (Patente de EE. UU. N° 5.554.798), trigo (Patente de EE. UU. N° 6.689.880), algodón (Patente de EE. UU. N° 6.740.488), soja (documento WO 9200377) y canola (Solicit. de Patente de EE. UU. N° 20040018518). Los transgenes de tolerancia al glifosato y los transgenes de tolerancia a otros herbicidas, por ejemplo, el gen *bar*, (Toki y col., 1992; Thompson y col., 1987; fosfinotricina acetiltransferasa (DeBlock y col., 1987), para tolerancia al herbicida glufosinato) también son útiles como marcadores genéticos o marcadores valorables y pueden proporcionar un fenotipo útil para la selección de plantas unidos a otros rasgos agronómicamente útiles.

- 35 La expresión de genes ajenos en plantas se sabe que está influenciada por su posición cromosómica, quizás debido a la estructura de la cromatina (por ejemplo, heterocromatina) o la proximidad de elementos de regulación de la transcripción (por ejemplo, amplificadores) cercanos al sitio de integración (Weising y col., 1988). Por esta razón, a menudo es necesario explorar un gran número de eventos con el fin de identificar un evento que se caracterice por la expresión óptima de un gen introducido de interés. Por ejemplo, se ha observado en plantas y otros organismos que puede haber una amplia variación en los niveles de expresión de un gen introducido entre los eventos. Puede haber también diferencias en los patrones espaciales o temporales, por ejemplo, diferencias en la expresión relativa de un transgén en distintos tejidos vegetales, que puede no corresponder con los patrones esperados para los elementos reguladores de la transcripción en la construcción genética introducida. Por esta razón, es común producir cientos a miles de diferentes eventos y explorar estos eventos para un único evento que tiene los niveles y patrones de expresión transgénica deseados para los fines comerciales. Un evento que tenga los niveles o patrones deseados de expresión transgénica es útil para introducir el transgén en otros contextos genéticos por cruzamiento sexual utilizando procedimientos de cruce convencionales. La progenie de dichos cruzamientos mantiene las características de la expresión del transgén del transformante original. Esta estrategia se utiliza para asegurar la expresión genética fiable en varias variedades que se han adaptado bien a las condiciones de cultivo locales.

- 50 Sería ventajoso ser capaces de detectar la presencia de un evento particular con el fin de determinar si la progenie de un cruzamiento sexual contiene el transgén de interés. Además, un procedimiento para detectar un evento particular sería útil para cumplir con las regulaciones requeridas para la pre-aprobación mercantil y el etiquetado de alimentos derivados de cultivos recombinantes de plantas, por ejemplo. Es posible detectar la presencia de un transgén por cualquier procedimiento de detección de ácido nucleico bien conocido tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o hibridación de ADN, utilizando sondas de ácido polinucleico. Estos procedimientos de detección se enfocan generalmente en los elementos genéticos que se utilizan frecuentemente, tal como promotores, terminadores, marcadores genéticos, etc. Como resultado, dichos procedimientos pueden no ser útiles para discriminar entre diferentes eventos, particularmente los que se producen utilizando la misma construcción de ADN a menos de que el ADN cromosómico ("ADN flanqueante") adyacente al ADN transgénico insertado se

conozca. Un ensayo de PCR específico de evento se expone, por ejemplo, por Windels y col. (1999), que identificó el evento de tolerante de soja 40-3-2 por PCR utilizando un grupo de cebadores que abarcaba la unión entre el transgén insertado y el ADN flanqueante, específicamente un cebador que incluye la secuencia de la inserción y un segundo cebador que incluye la secuencia del ADN flanqueante. Los procedimientos de detección por ADN específico de un evento en plantas transgénicas también se han descrito en las Patentes de EE. UU. N° 6.893.826; 6.825.400; 6.740.488; 6.733.974 y 6.689.880; 6.900.014 y 6.818.807.

La presente invención se refiere al evento MON89788 de soja tolerante al glifosato (al que también se hace referencia como MON19788 o GM_A19788) y a las moléculas de ADN contenidas en estas plantas de soja que son útiles para los procedimientos de detección en plantas y progenie de las mismas y tejidos vegetales derivados de MON89788.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona una planta de soja, una semilla, la progenie de la planta de cualquier generación o parte de las mismas, que contienen el genoma de las mismas el SEQ ID NO: 9, en el que la planta se puede obtener cruzando una planta obtenida a partir de la semilla de soja depositada con el número de acceso ATCC PTA-6708 y otra planta.

En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona un procedimiento para producir una planta de soja tolerante al herbicida glifosato como se ha caracterizado anteriormente, cuyo procedimiento comprende la introducción de un SEQ ID NO: 9 en el genoma de dicha planta por transformación de las células vegetales con ADN heterólogo.

En un aspecto adicional, la invención proporciona una molécula de ADN que comprende el SEQ ID NO: 9.

Breve descripción de los dibujos

FIG. 1. Organización de la inserción transgénica en el genoma de una planta de soja que comprende el evento MON89788.

FIG. 2A-2B. Procesamiento de productos comerciales de la soja.

Descripción detallada

La presente invención se refiere a un nuevo evento de transformación de soja designado MON89788 que proporciona tolerancia al glifosato, y las partes de la planta y semillas y productos producidos de las plantas, partes de plantas, semillas y productos que comprenden el evento. La invención proporciona moléculas de ADN que son nuevas en el genoma de las células de soja que comprenden MON89788 y moléculas de ADN que se pueden utilizar en distintos procedimientos de detección de ADN para identificar el ADN de MON89788 en una muestra. Además se desvela un procedimiento para el control de malas hierbas en un campo de plantas que contienen el MON89788 tratando las malas hierbas del campo que comprende las plantas que comprenden el evento MON89788 con un herbicida glifosato.

Se proporcionan las siguientes definiciones y procedimientos para definir mejor la presente invención y para guiar a los expertos habituales en la técnica en la práctica de la presente invención. A menos de que se señale otra cosa, los términos se tienen que entender según el uso convencional por los expertos habituales en la técnica. Las definiciones de términos comunes en biología molecular también se pueden encontrar en Rieger y col. (1991) y Lewin (1994). Se utiliza la nomenclatura para las bases de ADN como se expone en 37 CFR § 1.822.

Como se utiliza en el presente documento, el término “soja” significa *Glycine max* e incluye todas las variedades de plantas que se pueden cruzar con soja.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión “que comprende” significa “que incluye pero no se limita a”.

“Glifosato” se refiere a la N-fosfonometilglicina y sus sales. Glifosato es el principio activo del herbicida Roundup® (Monsanto Co.). Los tratamientos con “herbicida glifosato” se refiere a los tratamientos con el herbicida Roundup®, Roundup Ultra®, Roundup Pro® o cualquier otra formulación de herbicida que contiene glifosato. Ejemplos de formulaciones comerciales de glifosato incluye, sin restricción, los que vende Monsanto Company como herbicidas ROUNDUP®, ROUNDUP® ULTRA, ROUNDUP® ULTRAMAX, ROUNDUP® CT, ROUNDUP® EXTRA, ROUNDUP® BIACTIVE, ROUNDUP® BIOFORCE, RODEO®, POLARIS®, SPARK® y ACCORD®, que contienen todos ellos glifosato como su sal de isopropilamonio; ROUNDUP® WEATHERMAX (sal de glifosato potásico), los que se venden por Monsanto Company como herbicidas ROUNDUP® DRY y RIVAL®, que contienen glifosato como su sal sódica; y el que se vende por Protección de cultivos Syngenta como el herbicida TOUCHDOWN®, que contiene glifosato como su sal trimetilsulfonio. El tratamiento de un campo que comprende plantas de soja tolerantes al glifosato que comprenden el evento MON89788 con cualquiera de estas formulaciones del herbicida glifosato controlará el crecimiento de malas hierbas en el campo y no afectará el crecimiento o rendimiento de las plantas de soja que contengan MON89788.

Un “evento” transgénico se produce por transformación de las células vegetales con un ADN heterólogo, por ejemplo, una construcción de ácido nucleico que incluye un transgén de interés, regeneración de una población de plantas que resulta de la inserción del transgén en el genoma de la planta, y la selección de una planta particular caracterizada por la inserción en una localización genómica particular. El término “evento” se refiere al transformante original y la progenie del transformante que incluye el ADN heterólogo. El término “evento” también se refiere a la progenie producida por un cruzamiento sexual entre el transformante y otra variedad que incluye el ADN transgénico heterólogo y el ADN genómico flanqueante. El término “evento” también se refiere al ADN del transformante original que comprende el ADN insertado y la secuencia genómica flanqueante inmediatamente adyacente al ADN insertado que se espera que se transfiera a la progenie que recibe el ADN insertado que incluye el transgén de interés como resultado de un cruce sexual de una línea parental que incluye el ADN insertado (por ejemplo, el transformante original y la progenie resultante del auto cruce) y una línea parental que no contiene el ADN insertado.

Una planta de soja tolerante al glifosato se puede aparear cruzando primero sexualmente una primera planta de soja parental que consiste en una planta de soja cultivada a partir de una planta de soja transgénica tolerante al glifosato que comprende MON89788 o una planta de soja que es una progenie del cruzamiento de dicha planta que expresa el fenotipo tolerante a glifosato, y una segunda planta de soja parental que carece de tolerancia al glifosato, produciendo de esta manera una pluralidad de plantas de primera progenie y entonces seleccionar una planta de progenie que es tolerante a la aplicación del herbicida glifosato. Estas etapas pueden incluir adicionalmente el retro-cruzamiento de la planta de la progenie tolerante al glifosato con la segunda planta de soja parental o una tercera planta de soja parental, seleccionando entonces la progenie por aplicación de glifosato o por identificación con marcadores asociados con el rasgo produciendo de esta manera una planta de soja que tolera la aplicación del herbicida glifosato. Se pueden utilizar marcadores moleculares que comprenden las moléculas de unión ADN que se identifican en los sitios 5' y 3' de la inserción del transgén en el evento MON89788.

También se tiene que entender que se pueden emparejar dos plantas transgénicas diferentes para producir unos hijos que contienen dos transgenes exógenos segregados independientemente. El retro-cruzamiento de una planta parental y el cruzamiento con una planta no transgénica como se ha descrito anteriormente, también se contempla, como la propagación vegetativa. Las descripciones de otros procedimientos de cruzamiento se utilizan habitualmente para los distintos rasgos y cultivos se pueden encontrar en una de varias referencias, por ejemplo, Fehr, (1987).

Una “sonda” es un ácido nucleico aislado a la cual se une un marcador detectable convencional o molécula indicadora, por ejemplo, un isótopo radioactivo, un ligando, un agente quimioluminiscente, o una enzima. Dicha sonda es complementaria a una cadena de un ácido nucleico diana, en el evento de la presente invención, a una cadena de ADN genómico de una planta de soja que contiene el evento MON89788 sea de una planta o semilla de soja o de una muestra o extracto de la planta o la semilla que incluye el ADN del evento. Las sondas de acuerdo con la presente invención incluyen no solo ácidos desoxirribonucleicos o ribonucleicos, sino también poliamidas y otros materiales de sonda que se unen específicamente a una secuencia de ADN diana y que se puede utilizar para detectar la presencia de esa secuencia de ADN diana.

“Cebadores” son ácidos polinucleicos aislados que están hibridados a una cadena de ácido polinucleico diana complementaria por hibridación de ácidos nucleicos para formar un híbrido entre el cebador ya la cadena de ácido polinucleico diana, y luego extendido a lo largo de la cadena de ácido polinucleico por una polimerasa, por ejemplo, una ADN polimerasa. Par de cebadores se refiere a su uso para la amplificación de una molécula de ácido polinucleico diana, por ejemplo, por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otros procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos convencionales.

Las sondas y cebadores son en general de 11 polinucleótidos o más de longitud, preferentemente de 18 polinucleótidos o más, más preferentemente de 24 polinucleótidos o 30 polinucleótidos o más. Dichas sondas y cebadores se hibridan específicamente a una molécula diana en condiciones de hibridación de alta rigurosidad. Preferentemente, las sondas y cebadores tienen una identidad de secuencia completa con la molécula diana, aunque las sondas se diferencian de la secuencia diana y mantienen la capacidad para hibridar secuencias diana en condiciones de alta rigurosidad puede diseñarse por procedimientos convencionales.

Los procedimientos para preparar y utilizar sondas y cebadores se describen, por ejemplo, en Sambrook y col. (1989); Ausubel y col. (1992); e Innis y col. (1990). Los pares de cebadores PCR (un grupo cebador) se puede derivar de una secuencia conocida por ejemplo, utilizando programas de computadora que se pretenden para este fin tal como Primer (Versión 0.5 © 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA).

Los cebadores y sondas basados en el ADN genómico flanqueante y las secuencias insertadas que se desvelan en el presente documento (SEQ ID NO: 1-4 y 9) pueden utilizarse para confirmar, y si es necesario, corregir las secuencias desveladas por procedimientos convencionales, por ejemplo, aislando la molécula de ADN correspondiente a partir de un depósito de semillas que comprenden MON89788, y determinando la secuencia de ácido nucleico de dichas moléculas. Las moléculas de ADN asociadas adicionales se pueden aislar del genoma de una célula que comprende MON89788 que comprende la inserción transgénica y las regiones genómicas flanqueantes, y fragmentos de estas moléculas se pueden utilizar como cebadores o sondas.

Las sondas y cebadores de ácido nucleico se hibridan en condiciones rigurosas con una secuencia de ADN diana. Se puede utilizar cualquier procedimiento convencional de hibridación o amplificación de ácido nucleico para identificar la presencia de ADN del evento MON89788 en una muestra. Las moléculas de ácido nucleico o fragmentos de las mismas son capaces de hibridarse específicamente a otras moléculas de ácido nucleico en ciertas circunstancias. Como se utiliza en el presente documento, se dice que dos moléculas de ácido nucleico es capaz de hibridarse específicamente entre ellas si las dos moléculas son capaces de formar una estructura de ácido nucleico de doble cadena antiparalelas y tienen la suficiente longitud para mantener esta estructura en condiciones de alta rigurosidad. Se dice que una molécula de ácido nucleico es la "complementaria" de otra molécula de ácido nucleico si presenta una complementariedad completa. Como se utiliza en el presente documento, se dice que presenta "complementariedad completa" cuando cada nucleótido de una de las moléculas es complementario de un nucleótido de la otra. Se dice que dos moléculas son "mínimamente complementarias" si se pueden hibridar entre ellas con suficiente estabilidad para permitirles mantenerse hibridadas entre ellas al menos en condiciones de "baja rigurosidad" convencionales. De manera similar, se dice que las moléculas son "complementarias" si se pueden hibridar entre ellas con suficiente estabilidad para permitirles mantenerse hibridadas entre ellas en condiciones de "alta rigurosidad" convencionales. Las condiciones de rigurosidad convencionales están descritas por Sambrook y col., 1989, y por Haymes y col. (1985). Las divergencias de la complementariedad completa son por lo tanto permisibles, siempre que tales divergencias no eviten completamente la capacidad de las moléculas para formar una estructura de doble cadena. Con el fin de que una molécula de ácido nucleico sirva como cebador o sonda es necesario solamente que sea suficientemente complementario en secuencia para que sea capaz de formar una estructura de doble cadena estable en el disolvente y concentraciones de sales que se empleen.

Como se utiliza en el presente documento, una secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia de ácido nucleico que se hibridará específicamente a la complementaria de la secuencia de ácido nucleico a la que se va a comparar en condiciones de alta rigurosidad. Las condiciones de rigurosidad apropiadas que promueven la hibridación de ADN, por ejemplo, 6.0 x cloruro sódico/citrato sódico (SSC) a aproximadamente 45 °C, seguido por un lavado de 2.0 x SSC a 50 °C, son conocidas por los expertos en la técnica o se pueden encontrar en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley y Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Por ejemplo, la concentración de sal en la etapa de lavado se puede seleccionar de una rigurosidad baja de aproximadamente 2.0 x SSC a 50 °C a una alta rigurosidad de aproximadamente 0.2 x SSC a 50 °C. Además, la temperatura de la etapa de lavado se puede aumentar desde las condiciones de baja rigurosidad a temperatura ambiente, aproximadamente 22 °C, a las condiciones de alta rigurosidad a aproximadamente 65 °C. Tanto la temperatura como las sales se pueden variar, o se pueden mantener la temperatura o la concentración de sal mientras que se cambian otras variables. En una realización preferida, un ácido nucleico se hibridará específicamente a una o más de las moléculas de ácido nucleico que se exponen en SEQ ID NO: 1-4, y 9, complementarias de las mismas o fragmentos de cualquiera en condiciones moderadamente rigurosas, por ejemplo a aproximadamente 2.0 x SSC y aproximadamente 65 °C. En una realización preferida particularmente, un ácido nucleico se hibridará específicamente a una o más de las moléculas que se exponen en SEQ ID NO: 1-4 y 9, complementarias de las mismas o fragmentos en condiciones de alta rigurosidad. En un aspecto, una molécula de ácido nucleico marcadora preferida comprende la secuencia de ácido nucleico que se expone en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o complementarias de las mismas o fragmentos. En otro aspecto, una molécula de ácido nucleico marcadora preferida comparte entre un 80 % y un 100 % o 90 % y 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico que se expone en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o complementarias de la misma o fragmentos de cualquiera. Las moléculas de ADN marcadores moleculares que comprenden SEQ ID NO: 1, o SEQ ID NO: 2, o complementarias de las mismas o fragmentos de cualquiera se pueden utilizar como marcadores en procedimientos de cruzamiento de plantas para identificar la progenie de cruzamientos genéticos de manera similar a los procedimientos descritos para el análisis de marcadores de ADN de secuencia repetida simples, en Cregan y col. (1997). La hibridación de la sonda a la molécula de ADN diana puede detectarse por cualquiera de los distintos procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, que pueden incluir, pero no se limitan a, marcadores fluorescentes, marcadores radioactivos, marcadores basados en anticuerpos, y marcadores quimioluminiscentes,

Con respecto a la amplificación de una secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, por PCR) utilizando un par de cebadores de amplificación particular, "condiciones rigurosas" son condiciones que permiten que el par de cebadores se hibride solamente con la secuencia de ácido nucleico diana con la que un cebador que tienen la secuencia de tipo silvestre correspondiente (o su complementaria) se uniría y preferentemente produce un único producto de amplificación, el amplicón, en una reacción de amplificación térmica de ADN.

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

Como se utiliza en el presente documento, "ADN amplificado" o "amplicón" se refiere al producto de amplificación de ácido nucleico de una secuencia de ácido nucleico diana que es parte de una matriz de ácido nucleico. Por ejemplo, para determinar si la planta de soja resulta de un cruzamiento sexual que contiene el evento transgénico MON89788 o si la muestra de soja recolectada de un campo comprende MON89788, o un extracto de soja, tal como carne, harina o aceite comprende MON89788. El ADN extraído de una muestra o extracto de tejido de una planta de soja se puede someter a un procedimiento de amplificación de ácido nucleico utilizando un par de cebadores que incluye un cebador derivado de región genómica adyacente al sitio de inserción del ADN transgénico heterólogo y un

segundo cebador derivado del ADN transgénico heterólogo insertado para producir un amplicón que es diagnóstico de la presencia del evento de ADN. El amplicón tiene una longitud y tiene una secuencia que también es diagnóstica del evento. El amplicón puede variar de longitud desde la longitud combinada de los pares de cebadores más un par de bases de nucleótido, o más aproximadamente cincuenta pares de bases de nucleótido, o más aproximadamente doscientos cincuenta pares de bases de nucleótidos, o más aproximadamente trescientos cincuenta pares de bases de nucleótido o más.

De manea alternativa, se puede derivar un par de cebadores de la secuencia genómica flanqueante en ambos lados del ADN insertado de manera que se produce un amplicón que incluye la secuencia de nucleótido insertada completa. Un miembro de un par de cebador derivado de la secuencia genómica de la planta se puede localizar a distancia de la molécula de ADN transgénica insertada, esta distancia puede variar desde un par de bases de nucleótido hasta aproximadamente veinte mil pares de bases de nucleótido. El uso del término "amplicón" excluye específicamente los dímeros de cebador que se pueden formar en la reacción de amplificación térmica de ADN.

La amplificación de ácido nucleico se puede conseguir por cualquiera de los distintos procedimientos de reacción de amplificación de ácido nucleico que se conocen en la técnica, incluyendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se conoce una variedad de procedimientos en la técnica como se describe, inter alia, en las Patentes de EE. UU. N° 4.683.195 y 4.683.202 y en Innis y col. (1990). Los procedimientos de amplificación por PCR se han desarrollado para amplificar hasta 22 kb de ADN genómico y hasta 42 kb de ADN de bacteriófago (Cheng y col., 1994). Se pueden utilizar estos procedimientos así como otros procedimientos conocidos en la técnica de la amplificación de ADN. La secuencia de la inserción de ADN heterólogo o la secuencia flanqueante del evento de soja MON89788 puede verificarse, y corregirse si es necesario amplificando dichas moléculas del evento genómico utilizando cebadores derivados de las secuencias proporcionadas en el presente documento seguidos por procedimientos de secuenciación de ADN convencionales aplicados al amplicón de la PCR o al ADN genómico/transgénico clonado aislado.

El amplicón producido por estos procedimientos se puede detectar por una pluralidad de técnicas. Uno de dichos procedimientos es el análisis Genetic Bit (Nikiforov, y col., 1994) donde se diseña un oligonucleótido ADN que se solapa con la secuencia de ADN flanqueante adyacente y la secuencia de ADN TRANSGÉNICO INSERTADA. El oligonucleótido se inmoviliza en pocillos de una placa de micropocillos. Después de la PCR de la región de interés (utilizando un cebador en la secuencia insertada y otro en la secuencia genómica flanqueante adyacente), se puede hibridar un producto PCR de cadena sencilla con el oligonucleótido inmovilizado y servir como matriz de una reacción de extensión de base única utilizando una ADN polimerasa y marcado con dNTP específico para la próxima base esperada. La lectura se puede basar en ELISA o fluorescente. Una señal indica la presencia de la secuencia genómica flanqueante/insertada debido a la amplificación satisfactoria, hibridación y extensión de base única.

Otro procedimiento es la técnica de Pirosecuenciación como describe Winge (2000). En este procedimiento se diseña un oligonucleótido que se solapa con la unión del ADN genómico adyacente y el ADN insertado. El oligonucleótido se hibrida a un producto PCR de cadena sencilla a partir de la región de interés (un cebador en la secuencia insertada y otro en la secuencia genómica flanqueante) y se incubó en presencia de una ADN polimerasa, ATP, sulfurilasa, luciferasa, apirasa, adenosina 5' fosfosulfato y luciferina. Se añaden dNTP individualmente y la incorporación da como resultado una señal luminosa que se puede medir. Una señal luminosa indica la presencia de la secuencia flanqueante/insertada transgénica debido a la amplificación satisfactoria, hibridación, y extensión de base única o múltiple.

La Polarización de Fluorescencia como describe Chen y col. (1999) es un procedimiento que se puede utilizar para detectar el amplicón. Utilizando este procedimiento se diseña un oligonucleótido que solapa la unión de ADN genómico flanqueante e insertado. El oligonucleótido se hibrida con un producto de PCR de cadena sencilla de la región de interés (un cebador en el ADN insertado y otro en la secuencia de ADN genómica flanqueante) y se incubó en presencia de una ADN polimerasa y un ddNTP marcado fluorescentemente. Los resultados de la extensión de base única dan como resultado la incorporación del ddNTP. La incorporación se puede medir como un cambio de la polarización utilizando un fluorómetro. Un cambio de polarización indica la presencia de la secuencia de la inserción transgénica / genómica flanqueante debido a amplificación satisfactoria, hibridación y extensión de base única.

Taqman® (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) se describe como un procedimiento para detectar y cuantificar la presencia de una secuencia de ADN y se entiende completamente con las instrucciones proporcionadas por el fabricante. En resumen, se diseña una sonda de oligonucleótido FRET que se solapa con la unión de ADN genómico flanqueante y el insertado. La sonda FRET y los cebadores de PCR (un cebador en la secuencia de ADN insertado y otro en la secuencia genómica flanqueante) se ciclan en presencia de una polimerasa termoestable y dNTP. La hibridación de la sonda FRET da como resultado la escisión y liberación del resto fluorescente del resto de enfriamiento en la sonda FRET. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia genómica flanqueante/inserción transgénica debido a la amplificación satisfactoria e hibridación.

Las balizas moleculares se habían descrito para su uso en la detección de secuencias como se describe en Tyangi y col. (1996). En resumen, un oligonucleótido sonda FRET se diseña para que se solape con la unión del ADN genómico flanqueante y la inserción. La estructura única de la sonda FRET da como resultado que contenga una estructura secundaria que mantiene el resto de fluorescencia y enfriamiento en estrecha proximidad. La sonda FRET

y los cebadores de PCR (un cebador en la secuencia de ADN insertada y el otro en la secuencia genómica flanqueante) se ciclan en presencia de una polimerasa termoestable y dNTP. Después de la amplificación por PCR satisfactoria, la hibridación de la sonda FRET a la secuencia diana da como resultado la retirada de la estructura secundaria de la sonda y la separación espacial de los restos fluorescentes y de enfriamiento. Esto resulta en una señal fluorescente. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia genómica flanqueante/inserción transgénica debido a una amplificación satisfactoria e hibridación.

Otros procedimientos descritos, tal como, microfluídica (Pub. de Patente de EE. UU. N° 2006068398, Patente de EE. UU. N° 6.544.734) proporcionan procedimientos y dispositivos para separar y amplificar muestras de ADN. Los colorantes ópticos que se utilizan para detectar y cuantificar moléculas específicas de ADN (documento WO/05017181). Los dispositivos de nanotubos (documento WO/06024023) que comprende un sensor electrónico para la detección de moléculas de ADN o nanopelotas que se unen específicamente a moléculas de ADN y pueden entonces detectarse son útiles para detectar moléculas de ADN.

Se pueden desarrollar kits de detección de ADN utilizando las composiciones desveladas en el presente documento y los procedimientos de detección de ADN descritos o conocidos en la técnica. Los kits son útiles para la identificación de un evento de ADN en soja en una muestra y se pueden aplicar a los procedimientos para cruzar plantas de soja que contienen el ADN. Los kits pueden contener cebadores o sondas ADN que son homólogos o complementarios a las SEQ ID NO: 1-4 y 9 o cebadores o sondas ADN homólogos o complementarios al ADN contenido en los elementos de ADN genéticos transgénicos, estas secuencias de ADN se pueden utilizar en las reacciones de amplificación de ADN o como sondas en un procedimiento de hibridación de ADN. La estructura del ADN de los elementos genéticos transgénicos contenidos en el genoma de soja y que se ilustra en la Figura 1 comprende una región genómica 5' del genoma de soja A3244 flanqueando la inserción transgénica, comprendiendo la inserción una parte de la región limítrofe derecha (RB) de *Agrobacterium tumefaciens*, el promotor quimérico FMV/Tsfl y elementos relacionados unidos (Patente de EE. UU. N° 6.660.911; a los que se hace referencia como FMV/E1F1α) conectado operativamente a una secuencia codificante de péptido de tránsito a cloroplastos EPSPS de *Arabidopsis* (al que se hace referencia en el presente documento como CTP2 o TS-AtEPSPS CTP2, Patente de EE. UU. N° 5.633.435), unida operativamente a un EPSPS de resistencia al glifosato (al que se hace referencia en el presente documento como CP4 EPSPS o aroA: CP4, aislado de *Agrobacterium tumefaciens* cepa CP4 y que codifica una secuencia modificada para aumentar la expresión en células vegetales, Patente de EE. UU. N° 5.633.435), unida operativamente a la región de terminación 3' de ribulosa de guisante 1,5-bifosfato carboxilasa (a la que se hace referencia en el presente documento como E9 3' o T-Ps.RbcS:E9, Coruzzi y col., (1984), una parte de la región limítrofe izquierda (LB) de *Agrobacterium tumefaciens*, y la región genómica 3' del genoma de soja A3244 flanqueando la inserción transgénica. Las moléculas de ADN útiles como cebadores en Los procedimientos de amplificación de ADN se pueden derivar de las secuencias de elementos genéticos de la inserción transgénica contenida en el evento de soja MON89788. Estas moléculas de cebador se pueden utilizar como parte de un grupo de cebadores que también incluyen una molécula de cebador ADN derivada del genoma de soja que flanquea la inserción transgénica. El evento de soja MON89788 se produjo por transformación de la línea A3244 de soja (Patente de EE. UU. N° 5.659.114) por un procedimiento mediado por *Agrobacterium*, por ejemplo, los procedimientos descritos en las Patentes de EE. UU. N° 6.384.301 y 7.002.058.

Los inventores de la presente invención han descubierto que una línea de soja que comprende la región genómica tipo T MON89788 (Tipo T es la combinación de un transgén y la región haploide asociada del genoma de una planta) en su genoma tiene un rendimiento mejorado con respecto a una línea que comprende la región genómica tipo T 40-3-2 anterior. Esto se demostró en ensayos de campo repetidos que incluyen los datos de rendimiento recolectados de múltiples localizaciones de los Estados Unidos (Solicitud de Patente de EE. UU. N° 60/685584).

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar ejemplos de ciertas realizaciones preferidas de la invención. Debería apreciarse por los expertos en la técnica que las técnicas desveladas en los ejemplos que siguen las estrategias representativas que los inventores han encontrado que funcionan bien en la práctica de la invención, y por lo tanto se pueden considerar como ejemplos que constituyen modos preferidos para su práctica.

Ejemplos

Ejemplo 1

Producción de un amplicón diagnóstico de ADN genómico MON89788

El ADN del evento de soja transgénica MON89788 se extrae del tejido que comprende semillas de soja, tejido vegetativo o carne. El ADN se aísla del tejido utilizando el kit Miniprep Plant DNeasy de Qiagen de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Qiagen Corp. Valencia, CA).

Se produce un producto PCR que comprende una parte del ADN genómico que flanquea el extremo 5' del ADN-T (ADN de transferencia que comprende el transgén) de la inserción en el genoma de una planta que comprende MON89788. Este producto de ADN comprende SEQ ID NO: 3. La PCR se puede llevar a cabo utilizando un cebador diseñado para hibridarse con las secuencias de ADN que flanquean el extremo 5' de la inserción transgénica (cebador A ADN, SEQ ID NO: 5, véase la FIG. 1) emparejado con un segundo cebador (cebador ADN B, SEQ ID

NO: 6) localizado en la región de promotor transgénico (Patente de EE. UU. N° 6.660.911, SEQ ID NO: 28, encontrado en la SEQ ID NO: 9).

Un producto PCR se produce a partir del extremo 3' de la inserción transgénica que comprende una parte del ADN genómico que flanquean el extremo 3' de la inserción de ADN-T en el genoma de una planta que comprende MON89788. Este producto de ADN comprende SEQ ID NO: 4. Se puede llevar a cabo utilizando un cebador diseñado para hibridarse con las secuencias de ADN genómico que flanquean el extremo 3' de la inserción de cada evento (cebador ADN D, SEQ ID NO: 8) y se emparejó con un segundo cebador (cebador ADN C, SEQ ID NO: 7) localizado en la secuencia de terminación de la transcripción T-Ps.RbcS:E9 3' en el extremo 3' de la inserción.

La matriz de PCR incluye ~ 50 ng de ADN genómico. Como control negativo se utilizó ~ 50 ng de ADN genómico de un cultivar de soja no transgénico. Cada reacción de PCR contiene 5 ml de 10x de tampón para la mezcla REDAccuTaq™ LA ADN Polimerasa (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), 200 mM de cada dNTP (Sigma-Aldrich), 0,4 mM de cada cebador, y 2,5 unidades JumpStart™ REDTaq™ ADN Polimerasa (Sigma-Aldrich) en un volumen total de reacción de 50 ml. Las reacciones PCR se llevaron a cabo en las siguientes condiciones de ciclado: 1 ciclo a 94 °C durante 3 minutos (min); 32 o 35 ciclos a 94 °C durante 30 segundos (s), 58 °C durante 30 s, 72 °C durante 30 s o 1 min; 1 ciclo a 72 °C durante 10 min.

Se utilizaron pares de cebador del evento ADN para producir un amplicón diagnóstico para el ADN genómico MON89788. Estos pares de cebador del evento incluyen pero no se limitan a los cebadores A y B (SEQ ID NO: 5 y 6) y pares de cebador del evento C y D (SEQ ID NO: 7 y 8), que se utilizaron en el procedimiento de amplificación de ADN descrito. Además de estos pares de cebador, cualquiera de los pares de cebador derivados de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, o las complementarias de la mismas, que cuando se utilizaban en la reacción de amplificación de ADN produce un amplicón que comprende SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 diagnósticos para tejidos derivados de eventos MON89788 de soja, respectivamente. Las condiciones de amplificación de ADN ilustradas en la Tabla 1 y la Tabla 2 se pueden utilizar para producir un amplicón diagnóstico para MON89788 utilizando el par de cebador del evento apropiado. Cualquier modificación de estos procedimientos que se utilizan para producir un amplicón diagnóstico para MON89788 está en el nivel habitual de la técnica. Un extracto que supuestamente contiene ADN de una planta o semilla de soja que comprende MON89788 o un producto derivado de una planta que comprende MON89788 que cuando se ensaya en el procedimiento de amplificación de ADN produce un amplicón diagnóstico para el evento MON89788 de soja se puede utilizar como matriz para la amplificación para determinar si está presente el MON89788.

El amplicón se produce por el uso de al menos una secuencia de cebador derivada de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 que cuando se utiliza en un procedimiento de PCR produce un amplicón diagnóstico para el evento MON89788. Por ejemplo, la producción de amplicones MON89788 se puede llevar a cabo utilizando un Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700, o un termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient como se muestra en la Tabla 2, i por procedimientos y aparatos conocidos por los expertos en la técnica.

Tabla 1. Procedimiento de PCR y condiciones de la mezcla de reacción para la identificación de la región de unión inserción transgénica 5'/genómico de MON89788 de soja

Etapas	Reactivo	Cantidad	Comentarios
1	Agua libre de nucleasa	Añadida hasta un volumen final de 20 µl	-
2	10x tampón de reacción (con MgCl ₂)	2,0 µl	1x concentración final de tampón, 1.5 mM concentración final de MgCl ₂
3	10 mM de solución de dATP, dCTP, dGTP, y dTTP	0,4 µl	200 µM de concentración final de cada dNTP
4	Cebador de evento A (SEQ ID NO: 5) re-suspendido en 1X tampón TE o agua libre de nucleasa a una concentración de 10 µM)	0,2 µl	0,1 µM concentración final
5	Cebador de evento B (SEQ ID NO: 6) re-suspendido en 1x tampón TE o agua libre de nucleasa a una concentración de 10 µM)	0,2 µl	0,1 µM concentración final

(continuación)

Etapa	Reactivo	Cantidad	Comentarios
6	RNasa, DNasa libre (500 µg/ml)	0,1 µl	50 ng/reacción
7	<i>REDTaq</i> ADN polimerasa (1 unidad/ µl)	1,0 µl (recomendado cambiar pipetas antes de la próxima etapa)	1 unidad/reacción
8	ADN extraído (matriz): • muestras que se van a analizar * hojas individuales * hojas agrupadas (máximo de 10 hojas/agrupamiento) • control Negativo • control Negativo • control Positivo	• 10-200 ng de ADN genómico • 200 ng de ADN genómico • 50 ng de ADN genómico de soja no transgénico • ADN no matriz (solución en la que el ADN se re-suspendió) • 50 ng de ADN genómico de soja que comprende MON89788	-

5 Se mezcla suavemente y, si es necesario (no en la parte superior caliente del termociclador), se añaden 1-2 gotas de aceite mineral en la parte superior de cada reacción. Se procede con la PCR en un Robocycler Stratagene (Stratagene, La Jolla, CA), MJ Engine (MJR-Biorad, Hercules, CA), Perkin-Elmer 9700 (Perkin Elmer, Boston, MA), o un termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) utilizando los siguientes parámetros de ciclado (Tabla 2). El MJ Engine o el termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient debería funcionar en el modo calculado. Poner el termociclador Perkin-Elmer 9700 con la velocidad de rampa fijada al máximo.

Tabla 2. Condiciones de termociclador

Ciclo Nº	Ajustes:	Stratagene Robocycler
1	94 °C	3 minutos
34	94 °C	1 minuto
	64 °C	1 minuto
	72 °C	1 minuto y 30 segundos
1	72 °C	10 minutos
Ciclo Nº	Ajustes:	MJ Engine o Perkin-Elmer 9700
1	94 °C	3 minutos
34	94 °C	30 segundos
	64 °C	30 segundos
	72 °C	1 minuto
1	72 °C	10 minutos
Ciclo Nº	Ajustes:	Eppendorf Mastercycler Gradient
1	94 °C	3 minutos
34	94 °C	15 segundos
	64 °C	15 segundos
	72 °C	1 minuto
1	72 °C	10 minutos

Ejemplo 2**Determinación de secuencia de la región transgénica/genómica y análisis de Southern**

La secuenciación del ADN de los productos de la PCR proporciona un ADN que se puede utilizar para diseñar moléculas de ADN adicionales como cebadores y sondas para la identificación de plantas o semillas de soja que comprenden MON89788. Los productos de la PCR de los tamaños esperados que representaban las secuencias transgénica/genómica 5' y 3' se aislaron por separación de los productos de la PCR en un gel de agarosa al 2,0 % por electroforesis. Los productos PCR que se aislaron incluyen las regiones de ADN 5' y 3' que abarcan la unión de la inserción entre la inserción transgénica en el genoma de soja. Los productos 5' y 3' de PCR para MON89788 se purificaron en gel de agarosa de electroforesis seguido por el aislamiento a partir de la matriz de agarosa utilizando el kit de extracción en gel QIAquick (catálogo n° 28704, Qiagen Inc., Valencia, CA). Los productos de la PCR purificados se secuenciaron entonces (por ejemplo, en un ABI Prism™ 377, PE Biosystems, Foster City, CA) y se analizaron (por ejemplo, con el software de análisis de secuencia DNASTAR, DNASTAR Inc., Madison, WI).

Se determinó una secuencia de ADN por el segmento de par de bases de nucleótido que representa la región transgénica/genómica del evento MON89788 como se ilustra en la FIG.1 y se identificó como SEQ ID NO: 9. Los elementos genómicos y transgénicos que están contenidos en SEQ ID NO: 9 se describen en la Tabla 3. Las regiones flanqueantes 5' y 3' se incluyen en SEQ ID NO: 9 y se dan en SEQ ID NO: 21 y 22.

Las secuencias de unión son moléculas de polinucleótido relativamente cortas que tienen las secuencias nuevas de ADN y son diagnósticas del ADN de MON89788 cuando se detectan en un ensayo de detección de ácido polinucleico. Las secuencias de unión en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 representan 10 polinucleótidos a cada lado de un sitio de inserción del fragmento transgénico y al ADN genómico de soja en MON89788. Las secuencias de unión de polinucleótido más cortas o más largas se pueden seleccionar de entre SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4. Las moléculas de unión (región de unión 5' de SEQ ID NO: 1, y región de unión 3' de SEQ ID NO: 2= son útiles como sondas ADN o como moléculas de cebador ADN en los procedimientos para la detección de ADN.

Los cebadores y sondas utilizados en un procedimiento Taqman® (Roche Molecular Systems, Inc., Pleasanton, CA) para la detección de un evento específico de molécula de ADN se desarrollaron para el evento MON89788. Se hace referencia a las moléculas de cebador como SQ2824 (SEQ ID NO: 10), SQ2826 (SEQ ID NO: 11), SQ1141 (SEQ ID NO: 12), SQ1142 (SEQ ID NO: 13), SQ5543 (SEQ ID NO: 14) y se hace referencia a las moléculas de sonda como PB871-6FAM (SEQ ID NO: 15), PB2191-VIC (SEQ ID NO: 16), y PB57-VIC (SEQ ID NO: 17). Los cebadores y las sondas se utilizaron en el procedimiento Taqman® de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes para proporcionar un amplicón diagnóstico para ADN que comprende MON89788. Los tejidos de soja que incluyen los productos procesados, por ejemplo harinas y fuentes de ADN útiles para este procedimiento. Los cebadores adicionales que se utilizan para producir un amplicón a partir de harina de soja incluyen SEQ ID NO: 18-20.

Tabla 3. Anotación de elementos genómicos y genéticos del fragmento de ADN transgénico/genómico (SEQ ID NO: 9) contenido en el genoma de soja que comprende MON89788

Elemento Genético ¹	Localización en la Secuencia ²	Función (Referencia)
Secuencia flanqueante, extremo 5' de la inserción	1-1103	ADN GENÓMICO DE SOJA
Región de unión 5'	1093-1113	Región de ADN que comprende la inserción transgénica
B³-límite derecho	1104-1145	Región de ADN de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> que contiene la secuencia limítrofe derecha utilizada para la transferencia del ADN-T (Depicker y col., 1982)
Secuencia que interviene	1146-1215	Secuencias utilizadas en la clonación de ADN
P⁴-FMV/Tsf1	1216-2255	Promotor quimérico que consiste en secuencias de amplificador del promotor 35S del virus del mosaico de escrofularia (Richins y col., 1987) y el promotor del gen <i>Tsf1</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> (que codifica la elongación del factor EF-1alfa (Axelos, y col., 1989)
L⁵-Tsf1	2256-2301	Líder no traducido 5 (exón 1) del gen <i>Tsf1</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> que codifica la elongación del factor EF-1 alfa (Axelos y col., 1989)
I⁶-Tsf1	2302-2923	Intrón del gen <i>Tsf1</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> que codifica la elongación del factor EF-1 alfa (Axelos y col., 1989)

(continuación)

Elemento Genético ¹	Localización en la Secuencia ²	Función (Referencia)
Secuencia que interviene	2924-2932	SECUENCIAS UTILIZADAS EN CLONACIÓN DE ADN
TS⁷-CTP2	2933-3160	Secuencias que codifican el péptido de tránsito hacia el cloroplasto del gen <i>ShkG</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> que codifica EPSPS (Klee y col., 1987)
CS⁸-cp4 epsps	3161-4528	Secuencia codificante del codón optimizado del gen de <i>aroA</i> de <i>Agrobacterium spp.</i> cepa CP4 que codifica la proteína CP4 EPSPS (Padgett y col., 1996; Barry y col., 1997)
Secuencia que interviene	4529-4570	Secuencias utilizadas en la clonación de ADN
T⁹-E9	4571-5213	Secuencia no traducida 3' del gen <i>RbcS2</i> de <i>Pisum sativum</i> que codifica la subunidad pequeña de Rubisco (Coruzzi y col., 1984)
Secuencia que interviene	5214-5256	Secuencias utilizadas en la clonación de ADN
B-Límite izquierdo	5257-5406	Región de ADN de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> que contiene la secuencia limítrofe izquierda utilizada para la transferencia del ADN-T (Barker y col., 1983)
Región de unión 3'	5396-5416	Región de ADN que abarca la inserción transgénica
Secuencia flanqueante del extremo 3' de la inserción	5407-6466	ADN genómico de soja

Análisis de transferencia de Southern

5 El ADN genómico de una planta que comprende MON89788 y el ADN genómico de soja de control (~ 15 µg de cada) se digieren con varias enzimas de restricción (140 U) en un volumen total de 150 µl del correspondiente tampón del fabricante (NEB, Beverly, MA). Se utilizaron endonucleasas de restricción, por ejemplo, Bgl11, BamH1, Nco1, Hind111, y Bel1, en el análisis de Southern de MON89788. Las digestiones de endonucleasa se llevaron a cabo a la temperatura apropiada durante al menos 6 horas. Tras la incubación, se precipitó el ADN con acetato sódico 3 M y 2,5 volúmenes de etanol. Posteriormente, se lava el ADN con un 70 %, se seca y se re-suspende en 40 µl de TBE. El tampón de carga (0,2x) se añadió a las muestras y entonces se sometió a electroforesis en geles de agarosa (0,8 %) durante 16-18 horas a 30 voltios. Los geles se tiñen con bromuro de etidio, y luego se trata con una solución de despurinación (0,125 N de HCl) durante 10 minutos, con una solución desnaturalizante (0,5 M de hidróxido sódico, 1,5 M de cloruro sódico) durante 30 minutos, y finalmente con una solución de neutralización (0,5 M de base Trizma, 1,5 M de cloruro sódico) durante 30 minutos. El ADN se transfirió a una membrana Hybond-N (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Inglaterra) utilizando un Turboblottter (Schleicher y Schuell, Dassel, Alemania) durante 4-6 horas y luego se fijó en la membrana utilizando luz ultravioleta.

20 Las membranas se pre-hibridan con 20 ml de solución DIG Easy Hyb (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN; n° de cat. 1603558) durante 2-4 horas a 45 °C. Las sondas de ADN radioactivas (³²P dCTP) homólogas o complementarias de SEQ ID NO: 1, o SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3, o SEQ ID NO: 4, o una parte de las mismas se hizo utilizando un kit de marcado de ADN Radprime (Invitrogen, Carlsbad, CA; n° de cat. 18428-011). Los nucleótidos no incorporados se retiraron utilizando columnas de SEPHADEX G-50 (Invitrogen). Las soluciones de pre-hibridación se sustituyeron con 10 ml de solución DIG Easy Hyb pre-calentadas que contiene la sonda desnaturalizada a una concentración de 1 millón de recuentos por ml. Las transferencias se hibridaron a 45 °C durante 16-18 horas.

25 Las transferencias se lavaron con una solución de baja rigurosidad (5x de SSC, 0,1x de SDS) a 45 °C y luego se lavaron repetidamente con una solución de mayor rigurosidad (0,1x de SSC, un 0,1 % de SDS) a 65 °C. Las transferencias se expusieron en una pantalla de fósforo (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) durante > 2 horas y se leyó la exposición utilizando la máquina Data Storm 860 (Amersham Bio-sciences). Estos procedimientos y condiciones que se ejemplifican pueden ser modificarlos por los expertos en la técnica de detección de ADN en una muestra.

30

Ejemplo 3**Control de malas hierbas**

Control del crecimiento de malas hierbas en un campo de soja que comprende MON89788. Se planta un campo con semillas de soja que comprenden MON89788, se deja que germinen las semillas y salgan las plantas y el campo de plantas se trata con una formulación de herbicida que contiene glifosato. Se aplica al campo una dosis eficaz de una formulación de glifosato con tasas de tratamiento de aproximadamente 0,028 g ae/m² (gramos de glifosato ácido equivalente /metro cuadrado) hasta 0,336 o más g ae/m². Las tasas a menudo se aplicaban en un intervalo de aproximadamente 0,084 g ae/m² a 0,055 g ae/m² con una frecuencia de uno o más tratamientos durante la estación de cultivo según sea necesario para el control del crecimiento de malas hierbas en un campo. Las semillas de las plantas que comprenden MON89788 se recolectan de las plantas tratadas.

Se hizo un depósito de la semilla de soja representativa del evento MON89788 de Monsanto Technology LLC, desvelada anteriormente y se referido en las reivindicaciones bajo el Tratado de Budapest en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110. El número de acceso de ATCC para el depósito que comprende el evento MON89788 (también conocido como MON19788 o GM_A19788) es PTA-6708, depositado el 11 de mayo de 2005. El depósito se mantendrá en el depositario durante un periodo de 30 años, o 5 años tras la última petición, o durante la vida efectiva de la patente, lo que sea más largo, y se sustituirá si fuera necesario durante este periodo.

Referencias

Las siguientes referencias proporcionan procedimientos ejemplares u otros detalles suplementarios a los que se exponen en el presente documento.

Patente de EE. UU. 4.535.060
 Patente de EE. UU. 4.683.195
 Patente de EE. UU. 4.683.202
 Patente de EE. UU. 5.094.945
 Patente de EE. UU. 5.463.175
 Patente de EE. UU. 5.554.798
 Patente de EE. UU. 5.633.435
 Patente de EE. UU. 5.633.435
 Patente de EE. UU. 5.659.114
 Patente de EE. UU. 6.040.497
 Patente de EE. UU. 6.384.301
 Patente de EE. UU. 6.544.734
 Patente de EE. UU. 6.660.911
 Patente de EE. UU. 6.660.911
 Patente de EE. UU. 6.689.880
 Patente de EE. UU. 6.689.880
 Patente de EE. UU. 6.733.974
 Patente de EE. UU. 6.740.488
 Patente de EE. UU. 6.740.488
 Patente de EE. UU. 6.818.807
 Patente de EE. UU. 6.825.400
 Patente de EE. UU. 6.893.826
 Patente de EE. UU. 6.900.014
 Patente de EE. UU. 7.002.058
 Solicitud EE. UU. 60/685584
 Publicación EE. UU. 20040018518
 Publicación EE. UU. 2006068398

Ausubel y col., In: Current Protocols in Molecular Biology, John, Wiley & Sons, Inc., New York, 1992.

Chen y col., Genome Res., 9:492-498, 1999.

Cheng y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:5695-5699, 1994.

Coruzzi y col., EMBO J., 3:1671-1679, 1984.

Cregan y col., In: DNA markers: Protocols, applications, and overviews, Wiley-Liss NY, 173-185, 1997.

DeBlock y col., EMBO J., 6:2513-2522, 1987.

Fehr, In: Breeding Methods for Cultivar Development, Wilcox (Ed.), Amer. Soc. of Agronomy, Madison WI, 1987.

Haymes y col., In: Nucleic acid hybridization, a practical approach, IRL Press, Washington, DC, 1985.

Innis, y col., In: PCR Protocols. A guide to Methods and Application, Academic Press, Inc. San Diego, 1990.

Lewin, In: Genes V, Oxford University Press, NY, 1994.

Nikiforov, y col. Nucleic Acid Res., 22:4167-4175, 1994.

PCT Appln. WO 9200377

PCT Appln. WO/05017181

Rieger y col., In: Glossary of Genetics: Classical and Molecular, 5th Ed., Springer-Verlag: NY, 1991.
 Sambrook y col., In: Molecular cloning: a laboratory manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
 Thompson y col., EMBO J. 6:2519-2523, 1987.
 Toki y col., Plant Physiol., 100:1503-1507, 1992.
 Tyangi y col., Nature Biotech., 14:303-308, 1996.
 Weising y col., Ann. Rev. Genet., 22:421-477, 1988.
 Windels y col., Med. Fac. Landbouww., 64/5b:459-462, 1999.
 Wingem, Innov. Pharma. Tech., 00:18-24, 2000.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Malven, Marianne Rinehart, Jennifer Taylor, Nancy Dickinson, Ellen

<120> Evento MON89788 de soja y procedimientos para la detección del mismo

<130> MONS:113WO

<140> DESCONOCIDO

<141> 26-05-2006

<150> 60/685.584

<150> 27-05-2005

<160> 22

<170> 3.3

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(20)

<223> Molécula quimérica de genoma y transgén de soja

<400> 1

tatcaagctc caaactga 20

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(20)

<223> Molécula quimérica de secuencia genómica y transgén de soja

<400> 2

taataacgct cagactctag 20

<210> 3

<211> 1222

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1222)

<223> Molécula quimérica de ADN genómico de soja e inserto de transgén

<400> 3

```

cctgtacttc ccaaaacttc gcttccctga cccatcatat ccaggactgg acgattgggt 60
tgattgatac cagatgggtg agtcgagtc acctcggtag cggcatttat ggcaacgatt 120
gcagccaagt tgacctccat cattttttct catgtctatc atggcctcca tcatgggtgg 180
catttgggtct ttcattggcct ccatgtcggc cttcatctgc tcttgaactt catctatctc 240
actcatgatt ctagccttgg cacgtgtttg gtaagggtac cgtaaagcgc gttcgttctt 300
ttttattact atgattacat tttgacgatg atgatgattg taggaaagaa tgaaatgagt 360
aatgaaacaa ctaaataaac gtgaatgcat gacaatgata agttgctgaa gtattataaa 420
tttacatagg acattcagtg gaacgtaggg tcgaatcaaa tcctatttca ttaaaaacaa 480
tattgttcat cttgacagag ccaaagcata actagaaata caacatggac acatcagcga 540
ttcctaatta tgtgggtcat tagttcgacc atgtgttggc agtaacttga aagactatga 600
acttcatcgg gagcagagta tgtgtcagtc accgccttgg ctctggctaa caaccttggg 660
atctcttggc tctcatttag agtaagagca aatttgtcca tccatttcat ggcttcttta 720
tgcaataact ctatcacccc ttctcttgc tccctttcaa cctgcaaggc cgacactttt 780
gcctgttctg cttctagcct tcgcccata ctagcagcta gggtcacctt ctcttcatat 840
tgggtcaatga ttatcaacat attttctttt gttttgtctc actgttctct caaacttctc 900
ttcgatctct gacaactctt taacttatcc tctaacatca ggttttccat acttgatttg 960
tccctcttgg cttttctaa gtttgagctg ttactgctgc cccacaaagc cctcgaaac 1020
ttgttctctg tccactcttc cttttgggct tttttgttcc ccgctctagc gcttcaatcg 1080
tgggttatcaa gctccaaaca ctgatagttt aaactgaagg cgggaaacga caatctgata 1140
cccatcaagc tctagctaga gcggccgcgt tatcaagctt ctgcaggtcc tgctcgagtg 1200
gaagctaatt ctcagtcctc ag 1222

```

- 5 <210> 4
 <211> 675
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(675)
 <223> Molécula química de ADN de ADN genómico de soja e inserto de transgén
- <400> 4

gccaatgat tgacaacatg catcaatcga cctgcagcca ctogaagcgg ccgcatcgat 60
 cgtgaagttt ctcatctaag cccccatttg gacgtgaatg tagacacgtc gaaataaaga 120
 tttccgaatt agaataattt gtttattgct ttgcgcctata aatacgaagg atcgtaattt 180
 gtcgttttat caaaatgtac ttccatttta taataacgct cagactctag tgactaccac 240
 cttcactctc ctcaagcatt tcagcctctt ccccgcctcag actccttagc tttgggagcc 300
 aaattatccc ttacgttctc gacttcaacc atatgtgata gctgcctatg ataccatggc 360

 tacttcccct tagttcttta tctttccttt ccgctttatt ccattgcctta ccgacccctt 420
 gaagtgtctt tgcattagct tcattgaaac ctacgcgat gaaagggtgtg atgggtctct 480
 ccgatggcgc acttctcata gggtaacctt attgtcttac gaccaacata ggattataat 540
 taatacaacc cctcgtccct ataaaaggga ctttggaaa tccttcacat aagcataaca 600
 ctctacccc tctttctttc cactgtggga accaactaat ggacgctcct atcatgcctg 660
 ccaagagttc ttccc 675

5 <210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Glycine max*

 10 <400> 5
 cctgtacttc ccaaaacttc g 21

 15 <210> 6
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Virus del mosaico de escrofularia

 20 <400> 6
 cttccactg agaattagct cc 22

 25 <210> 7
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> *Petunia hybrida*

 30 <400> 7
 gccaatgat tgacaacatg catc 24

 35 <210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Glycine max*

 40 <400> 8
 gggaagaact ctggcaggc 20

 <210> 9
 <211> 6466
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> misc_feature

<222> (1)..(6466)

<223> Molécula quimérica de ADN de ADN genómico de soja e inserto de transgén

<400> 9

tgggggctgc ctgtacttcc caaaaacttcg cttccctgac ccatcatatc caggactgga 60
 cgattggcctt gattgatacc agatgggtga gtccagatcca cctcggttagc ggcattttatg 120
 gcaacgattg cagccaagtt gaacctccatc atttttttctc atgctcatca tggcctccat 180
 catggtggtc atttggctctt tcatggcctc catgtcggcc ttcattctgct cttgaacttc 240
 atctatctca ctcatgattc tagccttggc acgtgttttg taagggtacc gtaaagcgcg 300
 ttccgttcttt tttattacta tgattacatt ttgacgatga tgatgattgt aggaagaat 360
 gaaatgagta atgaaacaac taaataaacg tgaatgcag acaatgataa gttgctgaag 420
 tattataaat ttacatagga cattcagtg aaagtagggc cgaatcaaat cctatttcat 480
 taaaaacaat attgttcac ttagacagagc caaagcataa ctagaaatac aacatggaca 540
 catcagcgat tctaattat gtgggtcatt agtccgacca tgtgttggca gtaacttgaa 600
 agactatgaa cttcatcggt agcagagtat gtgtcagtc cgccttggc tctggctaac 660
 aaccttggga tctcttggct ctcatctaga gtaagagcaa atttgtccat ccatttcatg 720
 gcttctttat gcaataactc tatcaccctt tctcttgcct ccttttcaac ctgcaaggtc 780
 gacacttttg cctgttcgtc ttctagcctt cgcctatgac tagcagctag gttcaccttc 840
 tcttcatatt ggtcaatgat tatcaacata ttttcttttg ttttgcctaa ctgttctctc 900
 aaacttctct togatctctg acaactcttt aacttatcct ctaacatcag gttttccata 960
 cttgatttgt cctcttggc ttttctaagt ttgagctcgt tactgctgcc ccacaaagcc 1020
 cctcgaaaact tgttctctgt ccactcttcc ttttgggctt ttttgtttcc cgctctagcg 1080
 cttcaatcgt gggtatcaag ctccaaacac tgatagttaa aactgaaggc gggaaacgac 1140
 aatctgatcc ccatcaagct ctagctagag cggccgcgtt atcaagcttc tgcaggtcct 1200
 gctcgagtgg aagctaattc tcagtccaaa gcctcaacaa ggtcagggta cagagtctcc 1260
 aaaccattag ccaaaagcta caggagatca atgaagaatc ttcaatcaaa gtaaactact 1320
 gttccagcac atgcatcatg gtcagtaagt ttcagaaaaa gacatccacc gaagacttaa 1380
 agttagtggg catctttgaa agtaattctt tcaacatoga gcagctggct tgtggggacc 1440
 agacaaaaaa ggaatgggtc agaattgtta ggccgacctt ccaaaagcat ctttgccttt 1500
 attgcaaaga taaagcagat tcctctagta caagtgggga acaaaataac gtggaaaaga 1560
 gctgtcctga cagccactc actaatcgtt atgacgaacg cagtgcgac cacaaaagaa 1620
 ttagcttgag ctccagattt agcagcattc cagattgggt tcaatcaaca aggtacgagc 1680
 catatcaact tattcaaatt ggtatcgcca aaaccaagaa ggaactccca tcctcaaagg 1740
 tttgtaagga agaattcgat atcaagcttg atatcggaag tttctctctt gagggaggtt 1800
 gctcgtggaa tgggacacat atggttgta taataaacca tttccattgt catgagattt 1860
 tgagggtaat atatacttta cttgttcatt attttatttg gtgtttgaat aaatgatata 1920
 aatggctctt gataatctgc attcattgag atatcaaata ttactctag agaagagtgt 1980

catatagatt gatgggtccac aatcaatgaa atttttggga gacgaacatg tataaccatt 2040
 tgcttgaata accttaatta aaagggtgtga ttaaattgatg tttgtaacat gtagtactaa 2100
 acattcataa aacacaacca acccaagagg tattgagtat tcacggctaa acagggggcat 2160
 aatggtaatt taaagaatga tattatttta tgttaaaccoc taacattggg ttoggattca 2220
 acgctataaa taaaaccact ctggttgctg attccattta tggttcttat tgaccctagc 2280
 cgctacacac ttttctgcga tatctctgag gtaagcgta acgtaccott agatcggtct 2340
 ttttcttttt cgtctgctga tgggtgctca tattatttcg atgattggtg gattcgatgc 2400
 tctttgttga ttgatcggtc tgaaaattct gatctggtgt ttagatttta tggattgtta 2460
 atatcaacgt ttactgctt ctaaaccgata atttattcat gaaactattt tccattctg 2520
 atcgatcttg ttttgagatt ttaatttggt cgattgattg ttgggtgggt gatctatata 2580
 cgagtgaact tgttgatttg cgtatttaag atgtatgtcg atttgaattg tgattgggta 2640
 attctggagt agcataacaa atccagtgtt cctttttctt aagggttaatt ctoggattgt 2700
 ttgctttata tctcttgaaa ttgcgattt gattgaattt agctcgctta gctcagatga 2760
 tagagcacca caatttttgt ggtagaaatc gggttgactc cgataggggc tttttactat 2820
 gattgttttg tgttaaagat gattttcata atgggtatat atgtctactg tttttattga 2880
 ttcaatattt gattgttctt ttttttcgag atttgttgac cagagatcta ccatggcgca 2940
 agttagcaga atctgcaatg gtgtgcagaa cccatctctt atctccaato tctcgaaatc 3000
 cagtcaacgc aaatctccct tatcggtttc tctgaagacg cagcagcatc cagcagctta 3060
 tccgatttcg tcgtcggtgg gattgaagaa gagtgggatg acgttaattg gctctgagct 3120
 tegtctctt aagggtcatgt cttctgtttc cacggcggtc atgcttcacg gtgcaagcag 3180
 ccgtccagca actgctcgta agtctctgg tctttctgga accgtccgta ttccaggtga 3240
 caagtctatc tcccacaggt ctttcattgt tggaggtctc gctagcgggt aaactcgtat 3300
 caccggctct ttggaagggt aagatgttat caacactggg aaggctatgc aagctatggg 3360
 tgccagaatc cgtaaggaag gtgatacttg gatcattgat ggtgttggtg acggtggact 3420
 ccttgcctct gaggtcctc tcgatttcgg taacgctgca actggttgcc gtttgactat 3480
 gggctcttgt ggtgtttacg atttcgatag cactttcatt ggtgacgctt ctctactaa 3540
 gcgtccaatg ggtcgtgtgt tgaaccact tcgcgaaatg ggtgtgcagg tgaagtctga 3600
 agacgggtgat cgtcttcacg ttaccttgcg tggaccaaag actccaacgc caatcaccta 3660
 cagggtagct atggctccg ctcaagtga gtccgctgtt ctgcttctg gtctcaacac 3720
 ccaggtatc accactgtta tcgagccaat catgactcgt gaccacactg aaaagatgct 3780
 tcaagggtttt ggtgctaacc ttaccgttga gactgatgct gacgggtgtc gtaccatccg 3840
 tcttgaagggt cgtggtaagc tcaccgggtc agtgattgat gttccaggtg atccatctc 3900
 tactgcttct ccattgggtg ctgccttgct tgttcagggt tccgacgtca ccatccttaa 3960

cgttttgatg aacccaaccc gtactggtct catcttgact ctgcaggaaa tgggtgcca 4020
 catcgaagtg atcaaccacac gtcttgctgg tggagaagac gtggctgact tgcgtgttcg 4080
 ttcttctact ttgaagggtg ttactgttcc agaagaccgt gctccttcta tgatcgacga 4140
 gtatccaatt ctgctgtttg cagctgcatt cgctgaaggt gctacogtta tgaacgggtt 4200
 ggaagaactc cgtgttaagg aaagcgaccg tctttctgct gtgcgaaacg gtctcaagct 4260
 caacgggtgtt gattgcatg aaggtgagac ttctctcgtc gtgctgggtc gtcctgacgg 4320
 taagggtctc ggtaacgctt ctggagcagc tgcctgctacc cactcgatc accgtatcgc 4380
 tatgagcttc ctggttatgg gtctcgtttc tgaaaaccct gttactgttg atgatgctac 4440
 tatgatcgct actagcttcc cagagttcat ggatttgatg gctggctctg gagctaagat 4500
 cgaactctcc gacactaagg ctgcttgatg agctcaagaa ttcgagctcg gtaccggatc 4560
 ctctagctag agctttcggt cgtatcatcg gtttcgacaa cgttcgtcaa gttcaatgca 4620
 tcagtttcat tgcgcacaca ccagaatcct actgagtttg agtattatgg cattgggaaa 4680
 actgtttttc ttgtaccatt tgttggtgctt gtaatttact gtgtttttta ttcggttttc 4740
 gctatcgaac tgtgaaatgg aaatggatgg agaagagtta atgaatgata tggctccttt 4800
 gttcattctc aaattaatat tatttgtttt ttctcttatt tgttggtgtg tgaatttgaa 4860
 attataagag atatgcaaac attttgtttt gagtaaaaat gtgtcaaato gtggcctcta 4920
 atgaccgaag ttaatatgag gagtaaaaca cttgtagttg taccattatg cttattcact 4980
 aggcaacaaa tatattttca gacctagaaa agctgcaaat gttactgaat acaagtatgt 5040
 cctcttggtg ttttagacatt tatgaacttt cctttatgta attttccaga atccttgctc 5100
 gattctaato attgctttat aattatagtt ataactcatgg atttgtagtt gagtatgaaa 5160
 atatttttta atgcatttta tgacttgcca attgattgac aacatgcac aatcgacctg 5220
 cagccactcg aagcgccgc atcgatcgtg aagttttctc tetaagcccc catttgacg 5280
 tgaatgtaga cactcgaaa taaagatttc cgaattagaa taatttgttt attgctttcg 5340
 cctataaata cgacggatcg taatttgctg ttttatcaaa atgtactttc attttataat 5400
 aacgctcaga ctctagtgc taccaccttc actctcctca agcatttcag cctcttcccc 5460
 gctcagactc cttagctttg ggagccaaat tatcccttac gttctcgact tcaaccatat 5520
 gtgatagctg cctatgatac catggctact tccccttagt tctttatctt tcttttccgc 5580
 ttatttccat gccttaccga tctctgaag tgtctttgca ttagcttcat tgaacacctc 5640
 cgcatgaaa ggtgtgatgg tctcctccga tggcgactt ctcatagggt aacctaatg 5700
 tcttacgacc aacataggat tataattaat acaacccctc gtccctataa aaggacatt 5760
 tggaaatcct tcacataagc ataacactcc taccctctt tctttccact gtgggaacca 5820
 actaatggac gctcctatca tgctgcca gagttcttcc caatttgctt cgtcctttcc 5880
 tgagcacatg cgatgacctt gtatggggtg gacagatcta ctttcatgat tgaagacgtg 5940

ggataccaac cacacataaa gagcaggcgc acaacagaaa atcctcgtag tgctcttctt 6000
gcatcttaag tcaaagtgtat catacaactta tgctaaaaca acaatgatcg ggcttttctt 6060
gctatgggtga taagcaagaa aagcatcgat tgctactaga tccaccaact cgtctacatt 6120
cgaaaatagt actatcccaa acactagcag tgctaatacgc tcgatgaatg atgcccactc 6180
tccttggttg gccagagttt ccgccttctc ctccaatcac ttcttggtta ttcccctac 6240
cctattccta ctttgcttca ctcagtttaa ttctcatttc gagatcttga caactcctgc 6300
tattctcgcc atagaaggat agtaccaga aaaaagggtat ggcttcttcc ctctatcgg 6360
gcctcctaag atcccttcga actcctctat gggttggtgct aactgaaagt ccccaaaagt 6420
gaagcatctg agtgattggt catagtattg ggtgagagat gcgatg 6466

5
<210> 10
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(22)
<223> Molécula cebadora sintética

15
<400> 10
cctttgggc tttttgtt cc 22

20
<210> 11
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> Molécula cebadora sintética

30
<400> 11
cgttccgc ctcagtta 20

35
<210> 12
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> Molécula cebadora sintética

45
<400> 12
tgttggtg gaccattg 20

<210> 13
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(25)

	<223> Molécula cebadora sintética	
5	<400> 13 cctcaattgg gagatactgc acta	25
	<210> 14 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(29) <223> Molécula cebadora sintética	
15	<400> 14 gtagtcacta gggtcagtaa agaattgtga	29
20	<210> 15 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(18) <223> Molécula cebadora sintética	
30	<400> 15 ttatcaagct ccaaacac	18
	<210> 16 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(22) <223> Molécula cebadora sintética	
40	<400> 16 tgagctcaaa gatatcaaca tg	22
45	<210> 17 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(22) <223> Molécula cebadora sintética	
55	<400> 17 agttaaatca tagttaataa tc	22
60	<210> 18 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(20) <223> Molécula cebadora sintética	

	<400> 18	
	tcccgctcta gcgcttcaat	20
5	<210> 19	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(19)	
	<223> Molécula cebadora sintética	
15	<400> 19	
	tcgagcagga cctgcagaa	19
	<210> 20	
	<211> 24	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> misc_feature	
25	<222> (1)..(24)	
	<223> Molécula cebadora sintética	
	<400> 20	
30	ctgaaggcgg gaaacgacaa tctg	24
	<210> 21	
	<211> 1103	
	<212> ADN	
	<213> <i>Glycine max</i>	
35	<400> 21	
	tgggggctgc ctgtacttec caaaaacttcg cttccctgac ccatcatatc caggactgga 60 cgattggcctt gattgatacc agatgggtga gtcgagtcca cctcggtagc ggcatttatg 120 gcaaogattg cagccacggt gacctccatc attttttctc atgctcatca tggcctccat 180	

```

catgggtgggc atttgggtott tcatgggcctc catgtcgggc ttcattctgct cttgaacttc 240
atctatctca ctcatgattc tagccttggc acgtgttttg taagggtacc gtaaagcgcg 300
ttcgttcttt tttattacta tgattacatt ttgacgatga tgatgattgt aggaaagaat 360
gaaatgagta atgaaacaac taaataaacg tgaatgcacg acaatgataa gttgctgaag 420
tattataaat ttacatagga cattcagtgg aacgtagggt cgaatcaaat cctatttcat 480
taaaaacaat attgttcac c ttgacagagc caaagcataa ctagaaatac aacatggaca 540
catcagcgat tcctaattat gtgggtcatt agttcgacca tgtgttggca gtaacttgaa 600
agactatgaa cttcatcggg agcagagtat gtgtcagtc cgccttggc tctggctaac 660
aaccttggga tctcttggc ctcattttaga gtaagagcaa atttgtccat ccatttcatg 720
gcttctttat gcaataaact tatcaacct tctcttgcct cctttcaac ctgcaaggtc 780
gacacttttg cctgttcgct ttctagcctt cgcctatgac tagcagctag gttcaccttc 840
tcttcataat ggtcaatgat tatcaacata ttttcttttg ttttgctcaa ctgttctctc 900
aaacttctct tcgatctctg acaactcttt aacttatcct ctaacatcag gttttccata 960
cttgatttgt cctcttggc ttttctaagt ttgagctcgt tactgctgcc ccacaaagcc 1020
cctcgaaact tgttctgct ccactcttcc ttttgggctt ttttgttcc cgtcttagcg 1080
cttcaatcgt gggtatcaag ctc 1103

```

<210> 22
 <211> 1060
 <212> ADN
 <213> *Glycine max*
 <400> 22

```

cagactctag tgactaccac cttcactctc ctcaagcatt tcagcctctt ccccgctcag 60
actccttagc tttgggagcc aaattatccc ttacgttctc gacttcaacc atatgtgata 120
gctgcctatg ataccatggc tacttccct tagttcttta tctttcctt cgcctttatt 180
ccatgcctta ccgatcctct gaagtgtctt tgcattagct tcattgaaac ctcacgcgat 240
gaaagggtgt atggtctcct ccgatggcgc acttctcata gggtaacctt attgtcttac 300
gaccaacata ggattataat taatacaacc cctcgtccct ataaaaggga catttggaag 360
tccttcacat aagcataaca ctccacccc tctttctttc cactgtggga accaactaat 420
ggacgctcct atcatgcctg ccaagagttc ttcccaattt gcctcgtcct ttctgagca 480
catgcgatga ccttgatagg ggtagacaga tctactttca tgattgaaga cgtgggatac 540
caaccacaca taaagagcag gcgcacaaca gaaaatcctc gtagtgctct tcttgcatct 600
taagtcaaat gtatcataca cttatgctaa aacaacaatg atcgggcttt ccttgctatg 660
gtgataagca agaaaagcat cgattgctac tagatccacc aactcgtcta cattcgaaaa 720
tagtactatc ccaaacaacta gcagtgttaa tacgtcgatg aatgatgcc actctccttg 780
gctggccaga gtttccgctt tctctccaa tcaactcctt ggtattcccc ctaccctatt 840
cctactttgc ttcaactcag ctaattctca tttcgagatc ttgacaactc ctgctattct 900
cgccatagaa ggatagtacc cagaaaaaag gtatggcttc cttcctccta tcgggcatcc 960
taagatccct tcgaactcct ctatggttgg tgctaactga aagtcctcaa aagtgaagca 1020
tctgagtgat tggtcatagt attgggtgag agatgcgatg 1060

```

REIVINDICACIONES

1. Una planta de soja, una semilla, progenie de la planta de cualquier generación o una parte de la misma, conteniendo el genoma de la misma un SEQ ID NO: 9, en el que la planta se puede obtener por el cruzamiento de una planta obtenida de una semilla de soja depositada con el número de acceso de la ATCC PTA-6708 y otra planta.

5 2. La parte de planta de soja de la reivindicación 1, que se define como una célula, polen, óvulo, flor, brote, raíz u hoja.

3. Un procedimiento de producción de una planta de soja tolerante al herbicida glifosato como se define en la reivindicación 1, cuyo procedimiento comprende la introducción de SEQ ID NO: 9 en el genoma de dicha planta por transformación de las células de la planta con un ADN heterólogo.

4. Una molécula de ADN que comprende SEQ ID NO: 9.

10

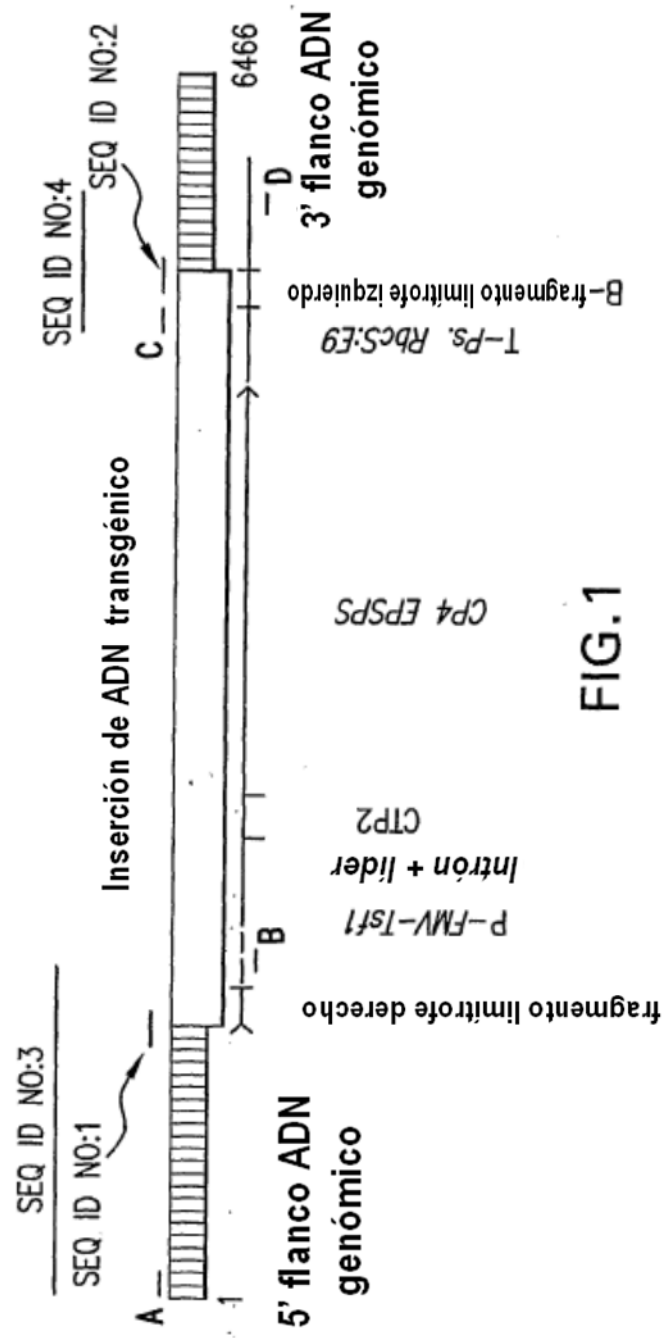
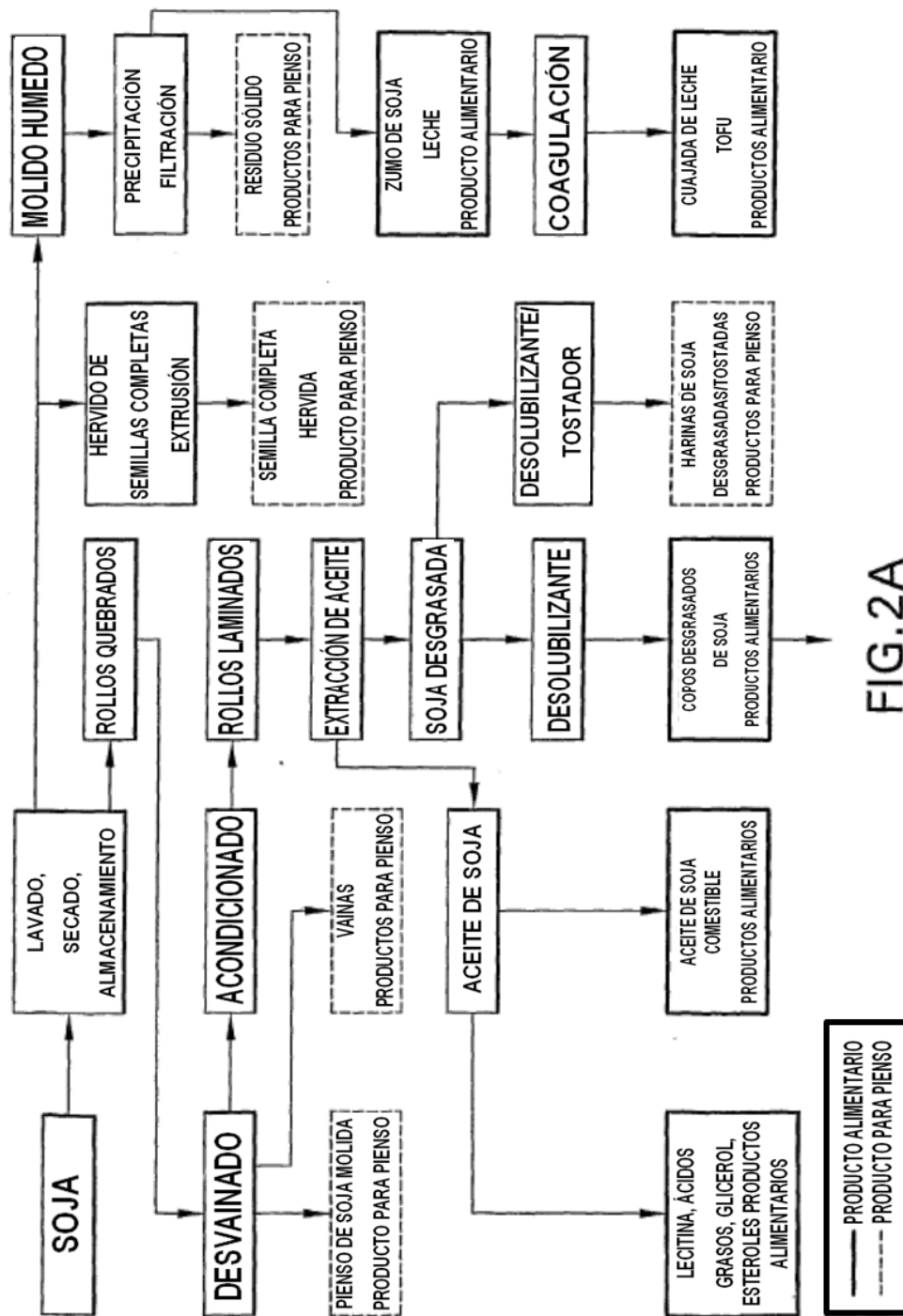


FIG.1



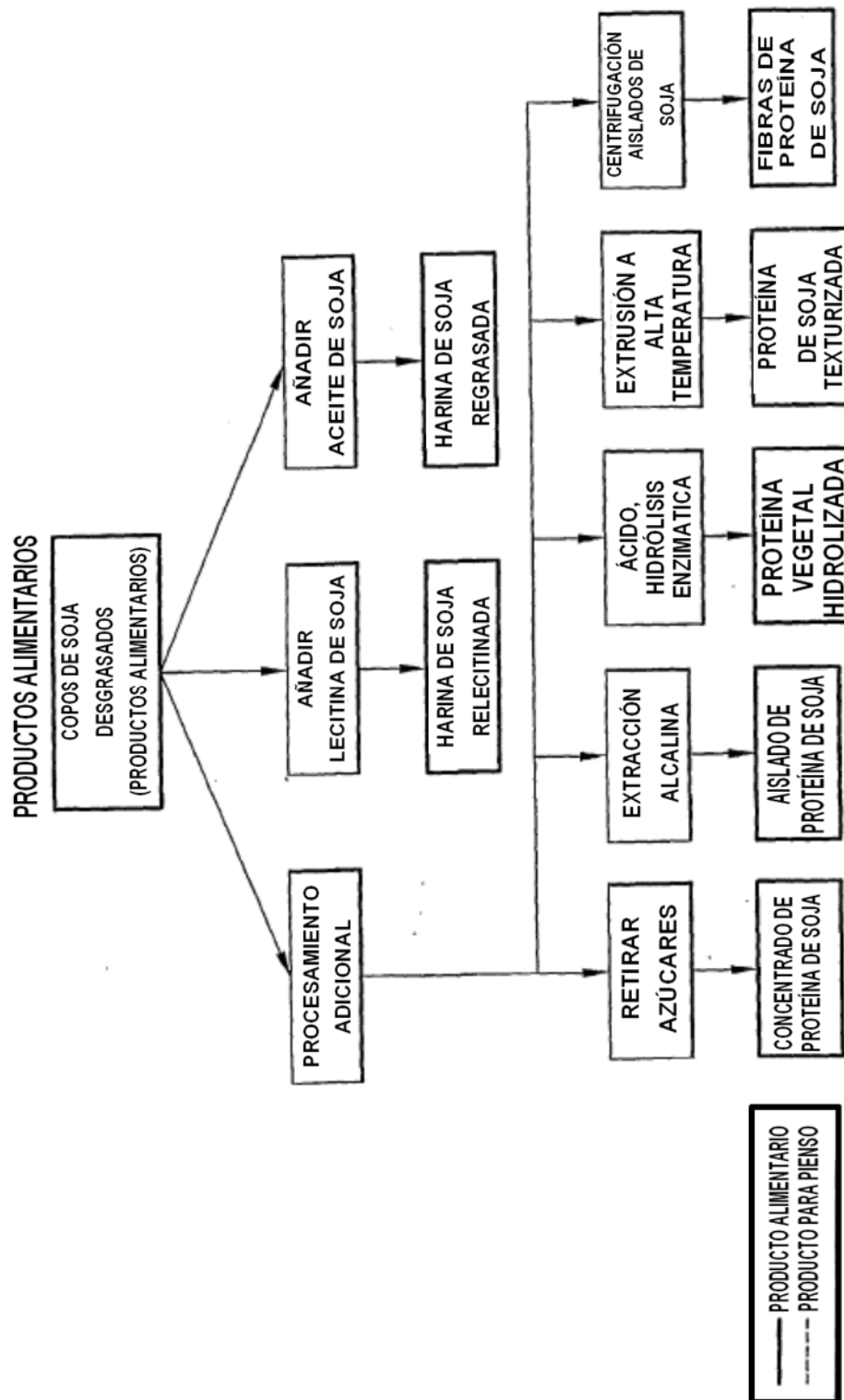


FIG.2B