

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 923**

51 Int. Cl.:

A01H 5/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.11.2010 PCT/US2010/057886**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.05.2011 WO11063413**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.11.2010 E 10832375 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.02.2017 EP 2503873**

54 Título: **Plantas de soja tolerantes a herbicidas y métodos para identificar las mismas**

30 Prioridad:

23.11.2009 EP 09014565

23.11.2009 US 263707 P

23.07.2010 US 367251 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.07.2017

73 Titular/es:

BAYER CROPSCIENCE NV (50.0%)

J.E. Mommaertsiaan 14

1831 Diegem, BE y

M.S. TECHNOLOGIES LLC (50.0%)

72 Inventor/es:

MASON, JUSTIN, THOMAS;

LETTOW, LESLIE, JAMES;

EBY, MARK, ALAN;

EBY, WILLIAM, H.;

WELZ, GÜNTER;

VERHAEGHE, STEVEN;

DE BEUCKELEER, MARC;

HABEX, VEERLE y

FERULLO, JEAN-MARC

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 623 923 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

Plantas de soja tolerantes a herbicidas y métodos para identificar las mismas

Referencia cruzada a las solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente provisional U.S. nº 61/367.251, presentada el 23 de julio de 2010; la solicitud de patente provisional U.S. nº 61/263.707, presentada el 23 de noviembre de 2009; y la solicitud de patente europea nº EP 09014565.7, presentada el 23 de noviembre de 2009.

Campo de la invención

10 Esta invención se refiere a plantas transgénicas de soja, material vegetal y semillas, que se caracterizan por que alojan al menos dos eventos de transformación específicos, particularmente por la presencia de al menos dos conjuntos de genes que codifican proteínas que confieren tolerancia a herbicida, cada uno en una ubicación específica en el genoma de la soja. Las plantas de soja de la invención combinan el fenotipo de tolerancia a herbicida con un comportamiento agronómico, estabilidad genética y funcionalidad en diferentes fondos genéticos equivalentes a la línea de soja no transformada en ausencia de herbicida(s). Esta invención proporciona además métodos y kits para identificar la presencia del material vegetal que comprende específicamente el evento de transformación EE-GM3 y EE-GM2 en muestras biológicas.

Antecedentes de la invención

20 La expresión fenotípica de un transgén en una planta se determina tanto por la propia estructura del gen o los genes mismos como por su(s) ubicación(es) en el genoma de la planta. Al mismo tiempo, la presencia de los transgenes o "ADN extraño" en diferentes ubicaciones en el genoma influirá de maneras diferentes en el fenotipo entero de la planta. La introducción agronómica o industrialmente próspera de un rasgo comercialmente interesante en una planta por manipulación genética puede ser un procedimiento largo en función de diferentes factores. La transformación y regeneración verdadera de las plantas genéticamente transformadas sólo son las primeras de una serie de etapas de selección, que incluyen la caracterización genética extensa, reproducción, y la evaluación en ensayos de campo, que conducen al final a la selección de un evento de élite.

25 La identificación inequívoca de un evento de élite se vuelve cada vez más importante en vista de los debates sobre nuevos alimentos/piensos, segregación de productos GMO y no GMO, y la identificación del material patentado. Lo mejor sería que tal método de identificación sea rápido y simple, sin la necesidad de un montaje extensivo de laboratorio. Además, el método debe proporcionar resultados que permitan la determinación inequívoca del evento de élite sin la interpretación del experto, pero si es necesario, que se mantenga bajo el escrutinio de un experto. En este documento se describen las herramientas específicas para usar en la identificación del evento de élite EE-GM3 y de EE-GM1 o EE-GM2 en muestras biológicas.

35 En esta invención, se identificó EE-GM3 como un evento de élite de una población de plantas transgénicas de soja en el desarrollo de soja tolerante a herbicida (*Glycine max*) que comprende un gen que codifica de tolerancia al glifosato combinado con un gen que confiere la tolerancia a inhibidores de 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (HPPD), cada uno bajo el control de un promotor expresable en plantas. En la solicitud de patente internacional WO98/02562 se han descrito previamente plantas transgénicas que comprenden un gen que codifica de tolerancia a glifosato combinado con un gen que confiere tolerancia a inhibidores de 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (HPPD).

40 Se identificaron previamente EE-GM1 y EE-GM2 como los eventos de élite de una población de plantas transgénicas de soja en el desarrollo de soja tolerante a herbicida (*Glycine max*) que comprende un gen que codifica de tolerancia a glufosinato bajo el control de un promotor expresable en planta, y se describen en los documentos WO2006/108674 y WO2006/108675.

Se describieron en la técnica las plantas de soja que comprenden un gen de tolerancia a herbicida, por ejemplo en Green J. (2009), Evolution of Glyphosate-resistant Crop technology, Weed Science, 57(1), p. 108-117. Sin embargo, ninguna de las descripciones de la técnica anterior enseña o sugiere la presente invención.

45 Se conoce en la técnica que lograr un evento de transformación de élite de tolerancia a herbicida comercial en plantas de soja con comportamiento agronómico aceptable, sin retrasar el rendimiento, y que proporcione una tolerancia a herbicida suficiente para 3 clases diferentes de herbicidas, no es de ningún modo sencillo.

50 En efecto, se dio a conocer que el primer evento de la soja (evento 40-3-2) liberado en el mercado con tolerancia a herbicida tuvo un retraso significativo del rendimiento comparado con líneas (casi)-isogénicas (Elmore et al. (2001) Agron. J. 93:408-412).

También, las sojas Optimum™ GAT™ (evento 356043) se desarrollaron al combinar la tolerancia a glifosato con la tolerancia a herbicidas ALS, pero se dio a conocer que estas sojas solas no cumplieron los estándares de tolerancia a glifosato (sin la combinación con otro evento de soja de tolerancia a glifosato (tal como el evento 40-3-2) (véase, por ejemplo, www.bloomberg.com/apps/news?pid=newsarchive&sid=ad4L0hH9MKWE)).

Sumario de las realizaciones preferidas de la invención

La presente invención se refiere a una planta de soja, o células, partes, semillas, o progenie de la misma, comprendiendo cada una en su genoma un evento de élite EE-GM3 y evento de élite EE-GM2 en el que el evento de élite EE-GM3, como se encuentra en la semilla de referencia depositada en el NCIMB con el número de depósito NCIMB 41659, es un locus genético que comprende un ADN extraño que comprende un gen quimérico que codifica 2mEPSPS y un gen quimérico que codifica HPPD PF W336, y en el que el evento de élite EE-GM2, como se muestra en la semilla de referencia depositada en el NCIMB con el número de depósito NCIMB 41660, es un locus genético que comprende un ADN extraño que comprende un gen quimérico que codifica fosfinotricina acetiltransferasa.

Más específicamente, la planta de soja transgénica, o semilla, células o tejidos de esta según la invención comprende, integrado establemente dentro de su genoma, un casete de expresión que comprende un gen de tolerancia a herbicida que comprende la secuencia codificante del gen de *2mEPSPS* y otro gen de tolerancia a herbicida que comprende la secuencia codificante de HPPD-PF W336 (ambos como se describen en este documento en el Ejemplo 1.1 y según se representa en la SEQ ID No 1), así como un segundo casete de expresión que comprende un gen de tolerancia a herbicida que comprende la secuencia codificante de una fosfinotricina acetil transferasa, como se describe en el Ejemplo 1 en este documento y según se representa en la SEQ ID No 11. La planta transgénica de soja, o semilla, células o tejidos de esta es tolerante a herbicidas basados en glifosato, basados en glufosinato, y un herbicida inhibidor de HPPD tal como isoxaflutol, y, en ausencia de herbicida(s), tiene un comportamiento agronómico que es sustancialmente equivalente a la línea isogénica no transgénica. Después de la aplicación de uno o más herbicidas para los que se proporciona la tolerancia, la planta tendrá un fenotipo agronómico superior comparado con la planta no transgénica.

De acuerdo con la presente invención, la planta de soja, o semilla, células o tejidos de ésta comprende los eventos de élite EE-GM3 y EE-GM2.

Más específicamente, la presente invención se refiere a una planta transgénica de soja, semilla, células o tejidos de éstas, cuyo ADN genómico se caracteriza por el hecho de que, cuando se analiza en un protocolo de identificación por PCR como se describe en este documento, usando dos cebadores dirigidos a la región de flanco 5' o 3' de EE-GM3 y el ADN extraño que comprende los genes de tolerancia a herbicidas en EE-GM3, respectivamente, produce un fragmento que es específico para EE-GM3 y además cuando se analiza en un protocolo de identificación por PCR como se describe en este documento, usando dos cebadores dirigidos a la región de flanco 5' o 3' de EE-GM2 y el ADN extraño que comprende los genes de tolerancia a glufosinato, respectivamente, produce un fragmento que es específico para EE-GM2. Dos cebadores para la detección de EE-GM3 se pueden dirigir contra la región de flanco 5' dentro de la SEC ID NO: 2 y el ADN extraño que comprende los genes de tolerancia a herbicidas, respectivamente. Los cebadores para la detección de EE-GM3 se pueden dirigir también contra la región de flanco 3' dentro de la SEC ID NO: 3 y el ADN extraño que comprende los genes de tolerancia a herbicidas, respectivamente, tales como los cebadores que comprenden o consisten en (esencialmente) la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 5 y SEC ID NO: 4 o SEC ID NO: 7, respectivamente, y producen un fragmento de ADN de entre 100 y 800 pb, tal como un fragmento de aproximadamente 263 pb o aproximadamente 706 pb. Los cebadores para la detección de EE-GM2 se pueden dirigir contra la región de flanco 5' dentro de la SEC ID NO: 12 y el ADN extraño que comprende los genes de tolerancia a herbicida, respectivamente. Los cebadores para la detección de EE-GM2 se pueden dirigir también contra la región de flanco 3' dentro de la SEC ID NO: 15 y el ADN extraño que comprende los genes de tolerancia a herbicida, respectivamente, tales como los cebadores que comprenden o consisten en (esencialmente) la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 18 y SEC ID NO: 19, respectivamente, y producen un fragmento de ADN de entre 100 y 500 pb, tal como un fragmento de aproximadamente 151 pb.

La semilla de referencia que comprende el evento de élite EE-GM3 de la invención se depositó en el NCIMB con el número de acceso NCIMB 41659. La semilla de referencia que comprende el evento de élite EE-GM2 de la invención se depositó en el NCIMB con el número de acceso NCIMB 41660. La semilla de referencia que comprende el evento de élite EE-GM3 y EE-GM2 se depositó en la ATCC con el número de acceso PTA-11042.

Una realización de la invención es la semilla que comprende el evento de élite EE-GM3 (semilla de referencia que comprende dicho evento que se depositó como NCIMB con número de acceso NCIMB 41659) y que comprende además el evento de élite EE-GM2 (semilla de referencia que comprende dicho evento que se depositó como NCIMB con número de acceso NCIMB 41660), o la semilla que comprende los eventos EE-GM3 y EE-GM2 (semilla de referencia que comprende dichos eventos que se depositó en ATCC con el número de acceso PTA-11042) las cuales se convertirán en una planta de soja tolerante a al menos a tres herbicidas, en particular a glifosato y/o inhibidores de HPPD tales como isoxaflutol y/o inhibidores de glutamina sintetasa tal como glufosinato.

La semilla de NCIMB con número de depósito NCIMB 41659 es un lote de semilla consistente en al menos aproximadamente 95% de semillas transgénicas, que comprende el evento de élite EE-GM3 que se convertirá en plantas tolerantes a herbicida, por lo cual las plantas son plantas tolerantes a glifosato y/o isoxaflutol. La semilla o semilla de la progenie disponible u obtenidas de la semilla depositada (por ejemplo, tras el cruzamiento con otras plantas de soja con un fondo genético diferente) se puede sembrar, y las plantas que crecen se pueden tratar con

glifosato o inhibidores de HPPD tal como isoxaflutol como se describe en este documento para obtener plantas tolerantes a glifosato o isoxaflutol, que comprenden el evento de élite EE-GM3. La semilla de NCIMB con número de depósito NCIMB 41660 es un lote de semillas consistente en al menos aproximadamente 95% de semillas transgénicas, que comprenden el evento de élite EE-GM2, que se convertirán en plantas tolerantes a herbicida, por lo cual las plantas son plantas tolerantes a glufosinato. La semilla se puede sembrar, y las plantas que crecen se pueden tratar con glufosinato como se describe en este documento para obtener plantas tolerantes a glufosinato, que comprenden el evento de élite EE-GM2.

La semilla de ATCC con número de depósito PTA-11042 es un lote de semillas consistente en al menos aproximadamente 95% de semillas transgénicas, que comprende el evento de élite EE-GM3 y el evento de élite EE-GM2 en forma homocigota, que se convertirán en plantas tolerantes a herbicida, por lo cual las plantas son tolerantes a glifosato, glufosinato y/o isoxaflutol. La semilla o semilla de la progenie disponible u obtenida de la semilla depositada (por ejemplo, tras el cruzamiento con otras plantas de soja con un fondo genético diferente) se pueden sembrar, y las plantas que crecen se pueden tratar con glifosato, glufosinato y/o inhibidores de HPPD tales como isoxaflutol, como se describe en este documento, para obtener plantas tolerantes a glifosato, glufosinato y/o isoxaflutol, que comprenden el evento de élite EE-GM3 y EE-GM2.

La invención se refiere a células, tejidos, progenie, y descendientes de una planta que comprende el evento de élite EE-GM3 y que comprende además el evento de élite EE-GM2, y que se puede obtener cultivando una planta que comprende el evento de élite EE-GM3 y EE-GM2 depositada en ATCC como PTA-11042, o cultivando una planta que comprende el evento de élite EE-GM3 de la semilla depositada en el NCIMB que tiene número de acceso NCIMB 41659, y cruzando dicha planta con una planta que comprende el evento de élite EE-GM2 cultivada a partir de la semilla depositada en el NCIMB con número de acceso NCIMB 41660. La invención se refiere también a plantas obtenibles de (tal como por propagación de y/o cruzamiento con) una planta de soja o semilla como se describió justo anteriormente. La invención se refiere también a plantas de soja que comprenden el evento de élite EE-GM3 y EE-GM2.

También se describe en este documento un método para identificar una planta transgénica, o células o tejidos de ésta, que comprende el evento de élite EE-GM3 y EE-GM2, método el cual se basa en identificar la presencia de secuencias de ADN caracterizantes o aminoácidos codificados por tales secuencias de ADN en la planta transgénica, células o tejidos. De acuerdo con una realización preferida de la invención, tales secuencias de ADN caracterizantes son secuencias de por lo menos 15 pb, 15 pb, al menos 20 pb, y 20 pb, o 30 pb o más, que comprenden el sitio de inserción del evento, es decir, tanto una parte del ADN extraño insertado que comprende los genes de tolerancia a herbicida como una parte del genoma de soja (ya sea la región de flanco 5' o 3') contiguo con éste, lo que permite la identificación específica del evento de élite.

La presente invención se refiere además a métodos para identificar eventos de élite EE-GM3 y EE-GM2 en muestras biológicas, métodos los cuales se basan en cebadores o sondas que reconocen específicamente la secuencia de flanco 5' y/o 3' del ADN extraño que comprende los genes de tolerancia a herbicida en EE-GM3 y EE-GM2, como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 y 14.

Más específicamente, la invención se refiere a un método que comprende amplificar dos secuencias de un ácido nucleico presente en las muestras biológicas, usando dos reacciones en cadena de la polimerasa cada una con al menos dos cebadores o una reacción en cadena de la polimerasa con al menos cuatro cebadores, reconociendo el primer cebador la región de flanco 5' o 3' del ADN extraño que comprende los genes de tolerancia a herbicida en EE-GM3, reconociendo el segundo cebador una secuencia dentro del ADN extraño que comprende los genes de tolerancia a herbicida de EE-GM3, reconociendo el tercer cebador la región de flanco 5' o 3' del ADN extraño que comprende los genes de tolerancia a herbicida en EE-GM2, y reconociendo el cuarto cebador una secuencia dentro del ADN extraño que comprende los genes de tolerancia a herbicida de EE-GM2, preferentemente para obtener dos fragmentos de ADN de entre 100 y 800 pb. Según la presente invención, los cebadores para identificar EE-GM3 reconocen una secuencia dentro de la región de flanco 5' de EE-GM3 (SEC ID NO: 2, de la posición 1 a la posición 1451) o dentro de la región de flanco 3' de EE-GM3 (complementaria de la SEC ID NO: 3 de la posición 241 a la posición 1408), y una secuencia dentro del ADN extraño que comprende los genes de tolerancia a herbicida (complementaria de la SEC ID NO: 2 de la posición 1452 a 1843 o SEC ID NO: 3 de la posición 1 a la posición 240, o SEC ID NO: 20 de la posición nucleotídica 1452 a la posición nucleotídica 16638 o su complementaria), respectivamente. El cebador que reconoce la región de flanco 3' puede comprender la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 5, y el cebador que reconoce una secuencia dentro del ADN extraño que comprende los genes de tolerancia a herbicida puede comprender la secuencia nucleotídica de las SEC ID NO: 4 o SEC ID NO: 7 descritos en este documento. Los cebadores para la identificación de EE-GM2 reconocen una secuencia dentro de la región de flanco 5' de EE-GM2 (SEC ID NO: 14, de la posición 1 a la posición 311) o dentro de la región de flanco 3' de EE-GM2 (complementaria de la SEC ID NO: 15 de la posición 508 a la posición 1880) y una secuencia dentro del ADN extraño que comprende un gen de tolerancia a herbicida de EE-GM2 (complementaria de la SEC ID NO: 14 de la posición 312 a 810, o la SEC ID NO: 15 de la posición 1 a la posición 507), respectivamente. El cebador que reconoce la región de flanco 3' de EE-GM2 puede comprender la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 18, y el cebador que reconoce una secuencia dentro del ADN extraño de EE-GM2 puede comprender la secuencia nucleotídica de la SEC ID NO: 19 descritos en este documento. La amplificación por PCR se puede hacer simultánea o secuencialmente.

La presente invención se refiere más específicamente a un método para identificar el evento de élite EE-GM3 y EE-GM2 en muestras biológicas, método el cual comprende amplificar al menos dos secuencias de ácidos nucleicos presentes en una muestra biológica, usando una reacción en cadena de la polimerasa con dos cebadores que comprenden o consisten en (esencialmente) la secuencia nucleotídica de la SEC ID NO: 4 y SEC ID NO: 5, respectivamente, para obtener un fragmento de ADN de aproximadamente 263 pb, o con dos cebadores que comprenden o consisten en (esencialmente) la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 5 y SEC ID NO: 7 respectivamente, para obtener un fragmento de ADN de aproximadamente 706 pb, y una reacción en cadena de la polimerasa con dos cebadores que comprenden o consisten en (esencialmente) la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 18 y SEC ID NO: 19 respectivamente, para obtener un fragmento de ADN de aproximadamente 151 pb. Las dos reacciones en cadena de la polimerasa se pueden realizar simultánea o secuencialmente.

Las secuencias de flanqueo específicas de EE-GM3 descritas en este documento en combinación con las secuencias de flanqueo específicas de EE-GM2 se pueden usar para desarrollar métodos específicos de identificación para la presencia simultánea de EE-GM3 y EE-GM2 en muestras biológicas. Tales secuencias de flanqueo específicas combinadas se pueden usar también como material de control de referencia en los ensayos de identificación. Más particularmente, las regiones de flanqueo 5' y/o 3' de EE-GM3 en combinación con las regiones de flanqueo 5' y/o 3' de EE-GM2 se pueden usar para el desarrollo de cebadores específicos y sondas como se describe además en este documento. Son adecuadas también como material de referencia las moléculas de ácido nucleico, preferentemente de aproximadamente 150-850 pb, que comprenden la secuencia que se puede amplificar por los cebadores que comprenden o consisten en (esencialmente) la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 7 y SEC ID NO: 5 o de SEC ID NO: 4 y SEC ID NO: 5 en combinación con las moléculas de ácido nucleico que comprenden la secuencia que se puede amplificar por los cebadores que comprenden o consisten en (esencialmente) la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 18 y SEC ID NO: 19, particularmente tales moléculas de ácido nucleico se obtienen usando tales cebadores en el material que comprende EE-GM3 y EE-GM2.

La invención se refiere además a métodos para identificar la presencia simultánea de EE-GM3 y EE-GM2 en muestras biológicas basado en el uso de tales cebadores o sondas específicas. Los cebadores para la detección de EE-GM3 pueden comprender, consistir o consistir esencialmente en una secuencia nucleotídica de 17 a aproximadamente 200 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1 al nucleótido 1451 o la complementaria de la secuencia nucleotídica de la SEC ID NO: 3 del nucleótido 241 al nucleótido 1408, combinados con los cebadores que comprenden, consisten, o consisten esencialmente en una secuencia nucleotídica de 17 a aproximadamente 200 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 1, tales como una secuencia nucleotídica de 17 a aproximadamente 200 nucleótidos consecutivos seleccionados de la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1452 al nucleótido 1843 o la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 1 al nucleótido 240. Los cebadores para la detección de EE-GM2 pueden comprender, consistir o consistir esencialmente en una secuencia nucleotídica de 17 a aproximadamente 200 nucleótidos consecutivos seleccionada de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 14 del nucleótido 1 al nucleótido 311 o la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 15 desde el nucleótido 508 al nucleótido 1880, combinados con cebadores que comprenden, consisten, o consisten esencialmente en una secuencia nucleotídica de 17 a aproximadamente 200 nucleótidos consecutivos seleccionada de la secuencia nucleotídica de la SEC ID NO: 11, tal como una secuencia nucleotídica de 17 a aproximadamente 200 nucleótidos consecutivos seleccionada de la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 14 desde el nucleótido 312 al nucleótido 810 o la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 15 desde el nucleótido 1 al nucleótido 507. Los cebadores pueden comprender también estas secuencias nucleotídicas ubicadas en su extremo 3' terminal, y comprender además las secuencias no relacionadas o secuencias derivadas de las secuencias nucleotídicas mencionadas, pero que comprenden apareamientos incorrecto.

La invención se refiere además a kits para identificar los eventos de élite EE-GM3 y EE-GM2 en muestras biológicas como se describe en la reivindicación 10 o 15. Dichos kits comprenden al menos un cebador o sonda que reconoce específicamente la región de flanqueo 5' o 3' del ADN extraño que comprende los genes de tolerancia a herbicida en EE-GM3, comprendiendo dicha región de flanqueo 5' la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1 al nucleótido 1451, y comprendiendo dicha región de flanqueo 3' la secuencia nucleotídica de la complementaria de SEC ID NO: 3 del nucleótido 241 al nucleótido 1408, y al menos un cebador o sonda que reconoce específicamente la región de flanqueo 5' o 3' del ADN extraño que comprende un gen de tolerancia a herbicida en EE-GM2, comprendiendo dicha región de flanqueo 5' la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 14 del nucleótido 1 al nucleótido 311, y comprendiendo dicha región de flanqueo 3' la secuencia nucleotídica de la complementaria de SEC ID NO: 15 del nucleótido 508 al nucleótido 1880.

Los kits de la invención pueden comprender, además de un cebador que reconoce específicamente la región de flanqueo 5' o 3' de EE-GM3 y la región de flanqueo 5' o 3' de EE-GM2, un cebador adicional que reconoce específicamente una secuencia dentro del ADN extraño que comprende los genes de tolerancia a herbicida de EE-GM3, comprendiendo dicho ADN extraño la secuencia nucleotídica de la complementaria de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1452 al nucleótido 1843, o la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 1 al nucleótido 240, o la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 1 del nucleótido 188 al nucleótido 7252 o su complementaria, o la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 20 de la posición nucleotídica 1452 a la posición nucleotídica 16638 o su complementaria, y un cebador adicional que reconoce específicamente una secuencia dentro del ADN extraño que comprende genes de tolerancia a herbicida de EE-GM2, comprendiendo dicho ADN extraño la secuencia

nucleotídica de la complementaria de SEC ID NO: 14 del nucleótido 312 al nucleótido 810, o la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 15 del nucleótido 1 al nucleótido 507, o la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 11 o su complementaria, para uso en un protocolo de identificación por PCR.

5 El cebador que reconoce la región de flanqueo 3' de EE-GM3 puede comprender la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 5, y el cebador que reconoce los transgenes del ADN extraño que comprende genes de tolerancia a herbicida de EE-GM3 puede comprender la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 4 o 7, o cualquier otro cebador o combinación de cebadores para la detección de EE-GM3 como se describe en este documento, en combinación con un cebador que reconoce la región de flanqueo 5' de EE-GM2 que puede comprender la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 18, y un cebador que reconoce los transgenes del ADN extraño que comprende el gen de tolerancia a herbicida de EE-GM2 puede comprender la secuencia nucleotídica de la SEC ID NO: 19.

10 En una realización del kit para identificar el evento de élite EE-GM3 y EE-GM2 en muestras biológicas, dicho kit comprende los cebadores de PCR que comprenden o consisten en (esencialmente) la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 5 y SEC ID NO: 4, y cebadores de PCR que comprenden o consisten en (esencialmente) la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 18 y SEC ID NO: 19, para su uso en la identificación de EE-GM3/EE-GM2 basada en PCR.

15 La invención se refiere además a un kit para la identificación del evento de élite EE-GM3 y EE-GM2 en muestras biológicas, comprendiendo dicho kit dos sondas específicas, una primera sonda que comprende o consiste en (esencialmente) una secuencia que se corresponde (o es complementaria a) una secuencia que tiene entre 80% y 100% de identidad de secuencia con una región específica de EE-GM3, y una segunda sonda que comprende o consiste en (esencialmente) una secuencia que se corresponde (o es complementaria a) una secuencia que tiene entre 80% y 100% de identidad de secuencia con una región específica de EE-GM2.

20 La secuencia de la primera sonda corresponde con una región específica que comprende parte de la región de flanqueo 5' o 3' de EE-GM3, y la segunda sonda corresponde con una región específica que comprende parte de la región de flanqueo 5' o 3' de EE-GM2. La sonda específica de EE-GM3 comprende o consiste en (esencialmente) (o es complementaria a) una secuencia que tiene entre 80% y 100% de identidad de secuencia con la secuencia entre el nucleótido 1441 al 1462 de la SEC ID NO: 2 o una secuencia que tiene entre 80% y 100% de identidad de secuencia con la secuencia entre el nucleótido 230 al 251 de la SEC ID NO: 3, y la sonda específica de EE-GM2 comprende o consiste (esencialmente) (o es complementaria a) una secuencia que tiene entre 80% y 100% de identidad de secuencia con la secuencia entre el nucleótido 301 al 322 de SEC ID NO: 14 o una secuencia que tiene entre 80% y 100% de identidad de secuencia con la secuencia entre el nucleótido 497 al 518 de la SEC ID NO: 15.

25 Se describen las secuencias de ADN que comprenden un sitio de unión del evento y una longitud suficiente de polinucleótidos tanto del ADN genómico de soja como del ADN extraño que comprende los genes de tolerancia a herbicida (transgén) de cada evento, para que sean útiles como cebador o sonda para la detección de EE-GM3 y EE-GM2. Tales secuencias pueden comprender al menos 9 nucleótidos del ADN genómico de soja y un número similar de nucleótidos del ADN extraño que comprende los genes de la tolerancia a herbicida (transgén) de EE-GM3 o EE-GM2, a cada lado del sitio de unión respectivamente. Con la máxima preferencia, las secuencias de ADN de ese tipo comprenden al menos 9 nucleótidos del ADN genómico de soja y un número similar de nucleótidos del ADN extraño que comprende los genes de tolerancia a herbicida contiguos con el sitio de unión en SEC ID NO: 2 o SEC ID NO: 3, y al menos 9 nucleótidos del ADN genómico de soja y un número similar de nucleótidos del ADN extraño que comprende los genes de tolerancia a herbicida contiguos con el sitio de unión en SEC ID NO: 14 o SEC ID NO: 15.

30 Los métodos y kits que se incluyen en la presente invención se pueden usar para diferentes propósitos, tales como, pero sin limitarse a los siguientes: identificar la presencia o determinar el umbral (inferior) de EE-GM3 y EE-GM2 en plantas, material vegetal o en productos tales como, pero sin limitarse a productos alimenticios o piensos (frescos o procesados) comprendidos o derivados del material vegetal; adicional o alternativamente, los métodos y los kits de la presente invención se pueden usar para identificar el material vegetal transgénico para propósitos de segregación entre el material transgénico y no transgénico; adicional o alternativamente, los métodos y los kits de la presente invención se pueden usar para determinar la calidad (es decir, el porcentaje de material puro) de material vegetal que comprende EE-GM3 y EE-GM2.

35 También se describen en el presente documento las regiones de flanqueo 5' y/o 3' de EE-GM3 en combinación con cebadores y sondas específicos desarrollados de las secuencias de flanqueo 5' y/o 3' de EE-GM2, así como a las sondas y cebadores específicos desarrollados de las secuencias de flanqueo 5' y/o 3' de EE-GM3 en combinación con cebadores y sondas específicos desarrollados de las secuencias de flanqueo 5' y/o 3' de EE-GM2.

40 También se describe en el presente documento ADN genómico obtenido de plantas que comprenden los eventos de élite EE-GM3 y EE-GM2. Dicho ADN genómico se puede usar como material de control de referencia en los ensayos de identificación descritos en este documento.

De acuerdo con la invención, se proporciona además una planta de soja transgénica tolerante a herbicida, o células, partes, semillas o progenie de ésta, comprendiendo cada una al menos dos eventos de élite EE-GM3 y EE-GM2, comprendiendo dicho primer evento de élite EE-GM3 un ADN extraño que comprende:

i) un primer gen quimérico que comprende un gen epsps modificado de *Zea mays* que codifica una enzima EPSPS tolerante a glifosato bajo el control de un promotor expresable en plantas, y

ii) un segundo gen quimérico que comprende un gen hppd modificado de *Pseudomonas fluorescens* que codifica una enzima inhibidora de HPPD tolerante a herbicida bajo el control de un promotor expresable en plantas, y dicho segundo evento de élite comprende un (tercer) gen quimérico que comprende un gen modificado de tolerancia a glufosinato derivado de *Streptomyces viridochromogenes* que codifica una enzima glufosinato (o fosfinotricina) acetiltransferasa bajo el control de un promotor expresable en planta.

En una realización, dicho primer evento de élite comprende los nucleótidos 1 al 1451 de SEC ID NO: 2 inmediatamente en dirección 5' y contiguos a dicho ADN extraño, y los nucleótidos 241 al 1408 de SEC ID NO: 3 inmediatamente en dirección 3' y contiguos con dicho ADN extraño, y dicho segundo evento comprende los nucleótidos 1 al 311 de SEC ID NO: 14 inmediatamente en dirección 5' y contiguos con dicho ADN extraño, y los nucleótidos 508 al 1880 de SEC ID NO: 15 inmediatamente en dirección 3' y contiguos con dicho ADN extraño.

En una realización adicional, dicho evento de élite se obtiene por reproducción con una planta de soja que crece de semillas de referencia que comprenden dichos eventos que se han depositado en la ATCC con el número de depósito PTA-11042, o se obtiene de semillas de referencia que comprenden dicho primer evento que se han depositado en el NCIMB con el número de acceso NCIMB 41659, y se obtiene de semillas de referencia que comprenden dicho segundo evento que se han depositado en el NCIMB con el número de acceso NCIMB 41660.

En otra realización, el ADN genómico de dicha planta de soja, o células, partes, semillas, o progenie de ésta cuando se analiza usando el protocolo de identificación del evento de élite para dicho primer evento de élite con dos cebadores que comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 4 y SEC ID NO: 5 respectivamente, produce un fragmento de ADN de aproximadamente 263 pb o 263 pb, y cuando se analiza usando el protocolo de identificación del evento de élite para dicho segundo evento de élite con dos cebadores que comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 18 y SEC ID NO: 19 respectivamente, produce un fragmento de ADN de aproximadamente 151 pb o 151 pb.

En este documento se proporciona además un método para la identificación de una planta de soja transgénica, o células, partes, semilla o progenie de ésta que comprende 2 eventos de élite, en el que dicha planta, células, semilla o progenie son tolerantes a glifosato, glufosinato y/o un herbicida inhibidor de HPPD (tal como isoxaflutol) en muestras biológicas, comprendiendo dicho método amplificar un fragmento de ADN de entre 50 y 1000 o entre 100 y 500 pb de un ácido nucleico de dicho primer evento presente en muestras biológicas usando una reacción en cadena de la polimerasa con al menos dos cebadores, reconociendo uno de dichos cebadores la región de flanco 5' del primer evento de élite especificado anteriormente, comprendiendo dicha región de flanco 5' la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1 al nucleótido 1451, o la región de flanco 3' de dicho primer evento de élite, comprendiendo dicha región de flanco 3' la secuencia nucleotídica de la complementaria de la SEC ID NO: 3 del nucleótido 241 al nucleótido 1408, reconociendo el otro cebador de dichos cebadores una secuencia dentro del ADN extraño de dicho primer evento que comprende la secuencia nucleotídica de la complementaria de la SEC ID NO: 2 del nucleótido 1452 al nucleótido 1843 o la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 1 al nucleótido 240, y que comprende amplificar un fragmento de ADN de entre 50 y 1000 pb o entre 100 y 500 pb de un ácido nucleico de dicho segundo evento presente en muestras biológicas usando una reacción en cadena de la polimerasa con al menos dos cebadores, reconociendo uno de dichos cebadores la región de flanco 5' del segundo evento de élite especificado anteriormente, comprendiendo dicha región de flanco 5' la secuencia nucleotídica del nucleótido 1 al nucleótido 311 de SEC ID NO: 14, o la región de flanco 3' de dicho segundo evento de élite, comprendiendo dicha región de flanco 3' la secuencia nucleotídica de la complementaria de los nucleótidos 508 al 1880 de SEC ID NO: 15, reconociendo el otro cebador de dichos cebadores una secuencia dentro del ADN extraño de dicho segundo evento que comprende la secuencia nucleotídica de la complementaria de la SEC ID NO: 14 del nucleótido 312 al nucleótido 810 o la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 15 del nucleótido 1 al 507.

En este documento se proporciona además un kit para identificar una planta de soja transgénica, o células, partes, semilla o progenie de ésta, que comprende 2 eventos de élite y que es tolerante a glifosato, glufosinato y un herbicida inhibidor de HPPD (tal como isoxaflutol), en muestras biológicas, comprendiendo dicho kit un cebador que reconoce la región de flanco 5' del primer evento de élite especificado anteriormente, comprendiendo dicha región de flanco 5' la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1 al nucleótido 1451, o un cebador que reconoce la región de flanco 3' de dicho primer evento de élite, comprendiendo dicha región de flanco 3' la secuencia nucleotídica de la complementaria de la SEC ID NO: 3 del nucleótido 241 al nucleótido 1408, y un cebador que reconoce una secuencia dentro del ADN extraño de dicho primer evento, comprendiendo dicho ADN extraño la secuencia nucleotídica de la complementaria de la SEC ID NO: 2 del nucleótido 1452 al nucleótido 1843 o la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 1 al nucleótido 240, y comprendiendo dicho kit un cebador que reconoce la región de flanco 5' del segundo evento de élite especificado anteriormente, comprendiendo dicha

región de flaqueo 5' la secuencia nucleotídica de los nucleótidos 1 al 311 de SEC ID NO: 14, o la región de flaqueo 3' de dicho segundo evento de élite, comprendiendo dicha región de flaqueo 3' la secuencia nucleotídica de la complementaria de los nucleótidos 508 al 1880 de SEC ID NO: 15, reconociendo el otro cebador de dichos cebadores una secuencia dentro del ADN extraño de dicho segundo evento que comprende la secuencia nucleotídica de la complementaria de la SEC ID NO: 14 del nucleótido 312 al nucleótido 810 o la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 15 del nucleótido 1 al nucleótido 507.

En una realización, la invención también se refiere a un par de cebadores como se describe en la reivindicación 11 o 12.

En otra realización, la invención se refiere a un conjunto que comprende cuatro cebadores como se describe en la reivindicación 13.

Otra realización de la invención se refiere a un par de sondas específicas como se describe en la reivindicación 16.

Según otra realización, la invención se refiere a un método para confirmar la pureza de la semilla, o para identificar semillas para la presencia de eventos de élite EE-GM3 y EE-GM2, método el cual es como se describe en la reivindicación 17.

En este documento se proporciona además una planta de soja, célula vegetal, tejido, o semilla que comprende en su genoma una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica con al menos 97, 98 o al menos 99% o 99,5% de identidad de secuencia con la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 20 de la posición nucleotídica 1452 a la posición nucleotídica 16638, la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 20 de la posición nucleotídica 2257 a la posición nucleotídica 16601 o su complementaria, o una secuencia nucleotídica con al menos el 97, 98 o al menos 99% o 99,5% de identidad de secuencia con la SEC ID NO: 20, o la complementaria de ésta, y que comprende en su genoma una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica con al menos 97, 98 o al menos 99% o 99,5% de identidad de secuencia con la secuencia nucleotídica de EE-GM2 o la complementaria de ésta, comprendiendo la semilla de referencia EE-GM2 que se depositó con el número de depósito NCIMB 41660. En una realización de esta invención, la secuencia nucleotídica de EE-GM2 en dicha planta, célula vegetal, tejido, o semilla, es la secuencia de ADN (tal como la secuencia del ADN extraño) en las SEC ID NO: 14 o 15, o la secuencia de ADN en el genoma de la planta (tal como en las semillas depositadas que comprenden EE-GM2 de la invención) que comprende las SEC ID NO: 14 y 15 entre el primer nucleótido de la secuencia de SEC ID NO: 14 y el último nucleótido de la secuencia de SEC ID NO: 15.

También se describe en el presente documento una planta de soja, célula vegetal, tejido, o semilla que comprende en su genoma una molécula de ácido nucleico que se hibrida con la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 1, o la complementaria de ésta, o que se hibrida con la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 20 de la posición nucleotídica 1452 a la posición nucleotídica 16638 o la complementaria de ésta, o que se hibrida con la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 20 o la complementaria de ésta, y que comprende en su genoma una molécula de ácido nucleico que se hibrida con la secuencia nucleotídica de EE-GM2 o la complementaria de ésta, comprendiendo la semilla de referencia EE-GM2 que se depositó con el número de depósito NCIMB 41660. La secuencia nucleotídica de EE-GM2 en dicha planta, célula vegetal, tejido, o semilla, es el ADN extraño en las SEC ID NO: 14 o 15, o la secuencia del ADN extraño en el genoma de la planta (tal como en las semillas depositadas que comprenden EE-GM2 de la invención) que comprende las SEC ID NO: 14 y 15 entre el primer nucleótido de la secuencia de SEC ID NO: 14 y el último nucleótido de la secuencia de SEC ID NO: 15.

Breve descripción de los dibujos

Los siguientes Ejemplos, no destinados a limitar la invención a las realizaciones específicas descritas, se pueden entender junto con las Figuras que se acompañan, que se incorporan en este documento como referencia, en las que:

Fig. 1:

Representación esquemática de la relación entre las secuencias nucleotídicas citadas y los cebadores para el evento de élite EE-GM3. barra negra: ADN extraño; barra sombreada: ADN de origen vegetal; flecha a cuadros (a): gen quimérico que codifica HPPD PF W336 (véase la Tabla 1 para la composición del gen quimérico); flecha sombreada (b): gen quimérico que codifica 2mEPSPS (véase la Tabla 1 para la composición del gen quimérico); flechas negras: cebadores oligonucleotídicos, las figuras bajo las barras representan las posiciones de los nucleótidos; (c) se refiere a la complementaria de la secuencia nucleotídica indicada; Nota: el esquema no está dibujado a escala.

Fig. 2:

Resultados obtenidos por el protocolo de identificación por PCR desarrollado para EE-GM3. Secuencia de carga del gel: Línea 1: Marcador de peso molecular (escalera de 100 pb); líneas 2 y 3: muestras de ADN de plantas de soja que comprenden el evento transgénico EE-GM3; líneas 4-7: muestras de ADN de plantas de soja transgénica que no comprenden el evento de élite EE-GM3 sino que comprenden los mismos genes de

tolerancia a herbicidas (otros eventos de transformación); línea 8: muestra de ADN de soja silvestre; línea 9: control sin ADN molde; línea 10: marcador de peso molecular.

Fig. 3:

5 Representación esquemática de la relación entre las secuencias nucleotídicas citadas y los cebadores para el evento de élite EE-GM1 (comparativo). barra negra: ADN extraño; barra sombreada: ADN de origen vegetal; flecha de rayas horizontales (d): gen quimérico que codifica fosfinotricina acetiltransferasa (véase SEC ID NO: 11 para la composición del gen quimérico); flechas negras: cebadores oligonucleotídicos, las figuras bajo las barras representan las posiciones de los nucleótidos; (c) se refiere a la complementaria de la secuencia nucleotídica indicada; Nota: el esquema no está dibujado a escala.

10 Fig. 4:

15 Representación esquemática de la relación entre las secuencias nucleotídicas citadas y los cebadores para el evento de élite EE-GM2. barra negra: ADN extraño; barra sombreada: ADN de origen vegetal; flecha de rayas horizontales (d): gen quimérico que codifica la fosfinotricina acetiltransferasa (véase SEC ID NO: 11 para la composición del gen quimérico); flechas negras: cebadores oligonucleotídicos, las figuras bajo las barras representan las posiciones de los nucleótidos; (c) se refiere a la complementaria de la secuencia nucleotídica indicada; NA: no aplicable. Nota: el esquema no está dibujado a escala.

Fig. 5:

20 Protocolo de identificación por PCR desarrollado para EE-GM1 (comparativo). Secuencia de carga del gel: línea 1: muestra de ADN de plantas de soja que comprenden el evento transgénico EE-GM1; línea 2: muestra de ADN de una planta de soja transgénica que no comprende el evento de élite EE-GM1; línea 3: muestras de ADN de control de plantas de soja silvestre; línea 4: control sin molde; línea 5: marcador de peso molecular.

Fig. 6:

25 Protocolo de identificación por PCR desarrollado para EE-GM2. Secuencia de carga del gel: línea 1: muestra de ADN de plantas de soja que comprenden el evento transgénico EE-GM2; línea 2: muestra de ADN de una planta de soja transgénica que no comprende el evento de élite EE-GM2; línea 3: muestras de ADN de control de plantas de soja silvestre; línea 4: control sin molde; línea 5: marcador de peso molecular.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención

30 La incorporación de una molécula de ADN recombinante en el genoma de la planta típicamente resulta de la transformación de una célula o tejido. El sitio particular de la incorporación es por lo general debido a la integración aleatoria.

35 El ADN introducido dentro del genoma de la planta como resultado de la transformación de una célula vegetal o tejido con un ADN recombinante o "ADN transformante", y procedente de dicho ADN transformante de ese tipo, se refiere de aquí en adelante como "ADN extraño" que comprende uno o más "transgenes". Los transgenes de EE-GM3 son genes de tolerancia a glifosato y al herbicida inhibidor de HPPD. "ADN vegetal", en el contexto de la presente invención, se referirá al ADN procedente de la planta que se transforma. El ADN vegetal se puede encontrar generalmente en el mismo locus genético en la planta silvestre correspondiente. El ADN extraño se puede caracterizar por la ubicación y la configuración en el sitio de incorporación de la molécula de ADN recombinante en el genoma de la planta. El sitio en el genoma vegetal donde el ADN recombinante se insertó se refiere también como el "sitio de inserción" o "sitio diana". La inserción del ADN recombinante dentro de la región del genoma de la planta referida como "pre-inserción de ADN vegetal" se puede asociar con una supresión del ADN vegetal, referida como "supresión del sitio diana". Una "región de flanqueo" o una "secuencia de flanqueo", como se usa en este documento, se refiere a una secuencia de al menos 20 pb, preferentemente al menos 50 pb, y hasta 5000 pb de ADN diferente del ADN introducido, preferentemente el ADN del genoma de planta que se ubica ya sea inmediatamente en dirección 5' y contiguo con o inmediatamente en dirección 3' y contiguo con el ADN extraño. Los procedimientos de transformación que conducen a la integración aleatoria del ADN extraño darán como resultado transformantes con regiones de flanqueo distintas, que son características y únicas para cada transformante. Cuando el ADN recombinante se introduce dentro de una planta a través de cruzamientos tradicionales, su sitio de inserción en el genoma de la planta o sus regiones de flanqueo generalmente no se podrán cambiar.

50 Un "ácido nucleico aislado (secuencia)" o "ADN aislado (secuencia)" como se usa en este documento, se refiere a un ácido nucleico o ADN (secuencia) que ya no está en el medio ambiente natural y se aisló de, por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico en otro huésped bacteriano o en un genoma de la planta, o un ácido nucleico o ADN fusionado con ADN o ácido nucleico de otro origen, tal como cuando se incluye en un gen quimérico bajo el control de un promotor expresable en planta.

Un evento se define como un locus genético (artificial) que, como resultado de la ingeniería genética, porta un ADN extraño o transgén que comprende al menos una copia de un gen de interés o de los genes de interés. Los estados alélicos típicos de un evento son la presencia o ausencia del ADN extraño. Un evento se caracteriza fenotípicamente por la expresión del transgén. A nivel genético, un evento es parte de la herencia de una planta. A nivel molecular, un evento se puede caracterizar por el mapa de restricción (por ejemplo, como se determina por transferencia Southern), por secuencias de flaqueo en dirección 5' y/o en dirección 3' del transgén, la ubicación de marcadores moleculares y/o la configuración molecular del transgén. Por lo general, la transformación de una planta con un ADN transformante que comprende al menos un gen de interés conduce a una población de transformantes que comprende una multitud de eventos separados, cada uno de los cuales es único. Un evento se caracteriza por el ADN extraño y al menos una de las secuencias de flaqueo.

Un evento de élite, como se usa en este documento, es un evento que se selecciona de un grupo de eventos, obtenidos por la transformación con el mismo ADN transformante, que se basa en la expresión y estabilidad del transgén(es) y su compatibilidad con características agronómicas óptimas de la planta que lo comprende. De este modo, los criterios para la selección del evento de élite son uno o más, preferentemente dos o más, ventajosamente todos los siguientes:

a) que la presencia del ADN extraño no comprometa otras características deseadas de la planta, tales como aquellas relativas con el comportamiento agronómico o valor comercial;

b) que el evento se caracterice por una configuración molecular bien definida que se hereda establemente y para el que se pueden desarrollar herramientas apropiadas para el control de identidad;

c) que el gen(es) de interés muestre(n) una expresión fenotípica correcta, adecuada y estable espacial y temporal, tanto en el estado del evento heterocigoto (o hemocigoto) como homocigoto, a un nivel aceptable comercialmente en un intervalo de condiciones ambientales en las que las plantas que portan el evento deben estar probablemente expuestas en el uso agronómico normal.

Se prefiere que el ADN extraño se asocie con una posición en el genoma de la planta que permita la introgresión fácil dentro de los fondos genéticos comerciales deseados.

El estado de un evento como un evento de élite se confirma por la introgresión del evento de élite en diferentes fondos genéticos relevantes y la observación del cumplimiento de uno, dos o todos los criterios, por ejemplo a), b) y c) anteriores.

Un "evento de élite" se refiere de este modo a un locus genético que comprende un ADN extraño, que satisface los criterios descritos anteriormente. Una planta, material vegetal o progenie, tales como semillas, pueden comprender uno o más eventos de élite en su genoma.

Las herramientas desarrolladas para identificar un evento de élite o la planta o material vegetal que comprende un evento de élite, o productos que comprenden material vegetal que comprende el evento de élite, se basan en las características genómicas específicas del evento de élite, tales como un mapa específico de restricción de la región genómica que comprende el ADN extraño, marcadores moleculares o la secuencia de la(s) región(es) de flaqueo del ADN extraño.

Una vez que una o ambas de las regiones de flaqueo del ADN extraño se han secuenciado, se pueden desarrollar cebadores y sondas que reconocen específicamente esta (estas) secuencia(s) en el ácido nucleico (ADN o ARN) de una muestra por medio de una técnica biológica molecular. Por ejemplo, se puede desarrollar un método de PCR para identificar el evento de élite en muestras biológicas (tales como muestras de plantas, material vegetal o productos que comprenden material vegetal). Una PCR de ese tipo se basa en al menos dos "cebadores" específicos, uno que reconoce una secuencia dentro de la región de flaqueo 5' o 3' del evento de élite y otro que reconoce una secuencia del ADN extraño. Los cebadores tienen preferentemente una secuencia de entre 15 y 35 nucleótidos que bajo condiciones óptimas de PCR "reconocen específicamente" una secuencia dentro de la región de flaqueo 5' o 3' del evento de élite y el ADN extraño del evento de élite respectivamente, de manera que un fragmento específico ("fragmento de integración" o amplicón discriminante) se amplifica de una muestra de ácido nucleico que comprende el evento de élite. Esto significa que solo el fragmento de integración seleccionado como diana, y ninguna otra secuencia en el genoma de la planta o ADN extraño, se amplifica bajo condiciones optimizadas de PCR.

Los cebadores de PCR adecuados para la identificación de EE-GM3 pueden ser los siguientes:

- oligonucleótidos de longitud en el intervalo de 17 nucleótidos a aproximadamente 200 nucleótidos, que comprenden una secuencia nucleotídica de al menos 17 nucleótidos consecutivos, preferentemente 20 nucleótidos consecutivos, seleccionados del ADN vegetal en la secuencia de flaqueo 5' (SEC ID NO: 2 del nucleótido 1 al nucleótido 1451) en su terminal 3' (cebadores que reconocen las secuencias de flaqueo 5'); u
- oligonucleótidos de longitud en el intervalo de 17 nucleótidos a aproximadamente 200 nucleótidos, que comprenden una secuencia nucleotídica de al menos 17 nucleótidos consecutivos, preferentemente 20

nucleótidos consecutivos, seleccionados del ADN vegetal en la secuencia de flanqueo 3' (complementaria de SEC ID NO: 3 del nucleótido 241 al nucleótido 1408) en su terminal 3' (cebadores que reconocen las secuencias de flanqueo 3'); u

- 5 - oligonucleótidos de longitud en el intervalo de 17 nucleótidos a aproximadamente 200 nucleótidos, que comprenden una secuencia nucleotídica de al menos 17 nucleótidos consecutivos, preferentemente 20 nucleótidos consecutivos, seleccionados de las secuencias de ADN insertadas (complementaria de la SEC ID NO: 2 del nucleótido 1452 al nucleótido 1843) en su terminal 3' (cebadores que reconocen ADN extraño); u
- 10 - oligonucleótidos de longitud en el intervalo de 17 nucleótidos a aproximadamente 200 nucleótidos, que comprenden una secuencia nucleotídica de al menos 17 nucleótidos consecutivos, preferentemente 20 nucleótidos consecutivos, seleccionados de las secuencias de ADN insertadas (SEC ID NO: 3 del nucleótido 1 al nucleótido 240); u
- 15 - oligonucleótidos adecuados de longitud en el intervalo de 17 nucleótidos a aproximadamente 200 nucleótidos, que comprenden una secuencia nucleotídica de al menos 17 nucleótidos consecutivos, preferentemente 20 nucleótidos consecutivos, seleccionados de la secuencia nucleotídica del fragmento de ADN insertado o su complementaria (SEC ID NO: 1 o SEC ID NO: 20 de la posición nucleotídica 1452 a 16638).

Por supuesto, los cebadores pueden ser más largos que los 17 nucleótidos consecutivos mencionados, y pueden ser, por ejemplo, 20, 21, 30, 35, 50, 75, 100, 150, 200 nucleótidos de largo o incluso más largos. Los cebadores pueden consistir enteramente en la secuencia nucleotídica seleccionada de entre las secuencias nucleotídicas mencionadas de secuencias de flanqueo y secuencias del ADN extraño. Sin embargo, es menos crítica la secuencia nucleotídica de los cebadores en su terminal 5' (es decir, fuera de los 17 nucleótidos consecutivos ubicados en el 3'). De este modo, la secuencia 5' de los cebadores puede comprender o consistir en una secuencia nucleotídica seleccionada de las secuencias de flanqueo o del ADN extraño, según proceda, pero puede contener varios apareamientos incorrectos (por ejemplo, 1, 2, 5, o 10). La secuencia 5' de los cebadores puede ser incluso totalmente una secuencia nucleotídica no relacionada con las secuencias de flanqueo o ADN extraño, tal como, por ejemplo, una secuencia nucleotídica que representa uno o más sitios de reconocimiento de enzimas de restricción. Las secuencias no relacionadas de ese tipo o secuencias de ADN de flanqueo con apareamientos incorrectos deberían ser preferentemente no más largas de 100, con mayor preferencia no más largas de 50 o incluso 25 nucleótidos.

Además, los cebadores adecuados pueden comprender, consistir o consistir esencialmente en una secuencia nucleotídica en su terminal 3' que abarca la región de unión entre las secuencias derivadas del ADN vegetal y las secuencias del ADN extraño (ubicados en los nucleótidos 1451-1452 en la SEC ID NO: 2 y los nucleótidos 240-241 en la SEC ID NO: 3 para EE-GM3) con la condición de que los 17 nucleótidos consecutivos ubicados en el 3' mencionados no deriven exclusivamente ya sea del ADN extraño o de las secuencias derivadas de plantas en las SEC ID NO: 2 o 3.

Resultará inmediatamente claro para el experto en la materia que los pares de cebadores de PCR debidamente seleccionados no deberían comprender además secuencias complementarias entre sí.

Para el propósito de la invención, la "complementaria de una secuencia nucleotídica representada en la SEC ID NO: X" es la secuencia nucleotídica que se puede derivar de la secuencia nucleotídica representada reemplazando los nucleótidos por su nucleótido complementario de acuerdo con las reglas de Chargaff ($A \leftrightarrow T$; $G \leftrightarrow C$) y leyendo la secuencia en la dirección 5' a 3', es decir, en sentido inverso de la secuencia nucleotídica representada.

Los ejemplos de cebadores adecuados para EE-GM3 son las secuencias oligonucleotídicas de SEC ID NO: 5 (cebador que reconoce la secuencia de flanqueo 3'), SEC ID NO: 4 (cebador que reconoce el ADN extraño para el uso con los cebadores que reconocen la secuencia de flanqueo 3') o SEC ID NO: 7 (cebador que reconoce el ADN extraño para el uso con los cebadores que reconocen la secuencia de flanqueo 3').

Otros ejemplos de cebadores oligonucleotídicos adecuados para EE-GM3 comprenden en su terminal 3' las secuencias siguientes o consisten (esencialmente) en tales secuencias:

a. cebadores que reconocen la secuencia de flanqueo 5':

- la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 264 al nucleótido 283
- la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 266 al nucleótido 285
- 50 - la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1240 al nucleótido 1259
- la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 265 al nucleótido 285
- la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 265 al nucleótido 283
- la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1239 al nucleótido 1259

ES 2 623 923 T3

- la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1241 al nucleótido 1259
- la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1244 al nucleótido 1263
- la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1248 al nucleótido 1267
- la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1250 al nucleótido 1269
- 5 - la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 262 al nucleótido 279
- la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 263 al nucleótido 279
- la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 264 al nucleótido 285
- la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 266 al nucleótido 283
- la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1238 al nucleótido 1259
- 10 - la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1242 al nucleótido 1259
- la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1243 al nucleótido 1263
- la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1245 al nucleótido 1263
- la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1247 al nucleótido 1267
- la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1249 al nucleótido 1269
- 15 - la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1249 al nucleótido 1267
- la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 263 al nucleótido 285
- la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 267 al nucleótido 283
- la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1242 al nucleótido 1263
- la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1243 al nucleótido 1259
- 20 - la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1246 al nucleótido 1267
- la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1246 al nucleótido 1263
- la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1248 al nucleótido 1269
- la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1250 al nucleótido 1271
- la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1250 al nucleótido 1267
- 25 - la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1241 al nucleótido 1263
- la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1245 al nucleótido 1267
- la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1247 al nucleótido 1269
- la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1247 al nucleótido 1263
- la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1249 al nucleótido 1271
- 30 - la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1242 al nucleótido 1261
- la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1241 al nucleótido 1261
- la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1243 al nucleótido 1261
- la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1240 al nucleótido 1261
- la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1244 al nucleótido 1261
- 35 - la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1239 al nucleótido 1261
- la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1245 al nucleótido 1261

ES 2 623 923 T3

b. cebadores que reconocen la secuencia del ADN extraño para uso con cebadores que reconocen la secuencia de flanqueo 5':

- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1732 al nucleótido 1751
- 5 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1735 al nucleótido 1754
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1731 al nucleótido 1750
- 10 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1732 al nucleótido 1750
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1732 al nucleótido 1752
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1731 al nucleótido 1749
- 15 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1732 al nucleótido 1749
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1731 al nucleótido 1751
- 20 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1732 al nucleótido 1753
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1731 al nucleótido 1748
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1732 al nucleótido 1748
- 25 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1735 al nucleótido 1751
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1731 al nucleótido 1752
- 30 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1732 al nucleótido 1754
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1731 al nucleótido 1747
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1731 al nucleótido 1753
- 35 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1727 al nucleótido 1746
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1727 al nucleótido 1745
- 40 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1727 al nucleótido 1747
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1727 al nucleótido 1744
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1727 al nucleótido 1748
- 45 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1727 al nucleótido 1749

ES 2 623 923 T3

- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1726 al nucleótido 1745
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1726 al nucleótido 1744
- 5 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1726 al nucleótido 1746
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1726 al nucleótido 1747
- 10 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1726 al nucleótido 1748
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1724 al nucleótido 1744
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1724 al nucleótido 1745
- 15 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1724 al nucleótido 1746
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1461 al nucleótido 1478
- 20 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1670 al nucleótido 1686
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1469 al nucleótido 1486
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1508 al nucleótido 1527
- 25 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1667 al nucleótido 1686
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1670 al nucleótido 1687
- 30 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1673 al nucleótido 1689
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1688 al nucleótido 1704
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1688 al nucleótido 1705
- 35 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1692 al nucleótido 1709
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1467 al nucleótido 1486
- 40 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1481 al nucleótido 1497
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1481 al nucleótido 1498
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1491 al nucleótido 1507
- 45 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1491 al nucleótido 1508

ES 2 623 923 T3

- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1672 al nucleótido 1688
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1673 al nucleótido 1690
- 5 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1673 al nucleótido 1691
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1688 al nucleótido 1706
- 10 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1691 al nucleótido 1707
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1691 al nucleótido 1708
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1469 al nucleótido 1487
- 15 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1481 al nucleótido 1499
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1489 al nucleótido 1505
- 20 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1489 al nucleótido 1506
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1489 al nucleótido 1507
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1489 al nucleótido 1508
- 25 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1666 al nucleótido 1686
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1667 al nucleótido 1687
- 30 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1670 al nucleótido 1688
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1672 al nucleótido 1689
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1688 al nucleótido 1707
- 35 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1691 al nucleótido 1709
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1692 al nucleótido 1710
- 40 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1481 al nucleótido 1500
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1491 al nucleótido 1509
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1670 al nucleótido 1689
- 45 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1672 al nucleótido 1690

ES 2 623 923 T3

- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1672 al nucleótido 1691
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1687 al nucleótido 1705
- 5 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1687 al nucleótido 1706
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1691 al nucleótido 1710
- 10 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1472 al nucleótido 1488
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1488 al nucleótido 1507
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1491 al nucleótido 1510
- 15 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1495 al nucleótido 1512
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1495 al nucleótido 1513
- 20 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1495 al nucleótido 1514
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1673 al nucleótido 1692
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1678 al nucleótido 1694
- 25 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1678 al nucleótido 1695
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1678 al nucleótido 1696
- 30 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1687 al nucleótido 1703
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1687 al nucleótido 1704
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1692 al nucleótido 1711
- 35 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1469 al nucleótido 1488
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1488 al nucleótido 1506
- 40 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1491 al nucleótido 1511
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1670 al nucleótido 1690
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1678 al nucleótido 1697
- 45 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1688 al nucleótido 1709

ES 2 623 923 T3

- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1467 al nucleótido 1487
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1488 al nucleótido 1508
- 5 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1495 al nucleótido 1511
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1491 al nucleótido 1512
- 10 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1666 al nucleótido 1687
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1667 al nucleótido 1688
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1672 al nucleótido 1692
- 15 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1673 al nucleótido 1693
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1687 al nucleótido 1707
- 20 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1472 al nucleótido 1490
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1472 al nucleótido 1491
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1481 al nucleótido 1501
- 25 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1489 al nucleótido 1509
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1495 al nucleótido 1515
- 30 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1670 al nucleótido 1691
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1673 al nucleótido 1694
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1678 al nucleótido 1698
- 35 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1469 al nucleótido 1489
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1667 al nucleótido 1689
- 40 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1687 al nucleótido 1708
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1688 al nucleótido 1710
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1691 al nucleótido 1711
- 45 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1472 al nucleótido 1492

ES 2 623 923 T3

- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1489 al nucleótido 1510
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1666 al nucleótido 1688
- 5 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1687 al nucleótido 1709
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1692 al nucleótido 1712
- 10 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1467 al nucleótido 1488
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1469 al nucleótido 1490
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1488 al nucleótido 1509
- 15 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1489 al nucleótido 1511
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1678 al nucleótido 1699
- 20 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1472 al nucleótido 1493
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1472 al nucleótido 1494
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1481 al nucleótido 1502
- 25 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1670 al nucleótido 1692
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1469 al nucleótido 1491
- 30 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1488 al nucleótido 1510
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1691 al nucleótido 1712
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1692 al nucleótido 1713
- 35 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1692 al nucleótido 1714
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1467 al nucleótido 1489
- 40 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1678 al nucleótido 1700
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1481 al nucleótido 1503
- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1691 al nucleótido 1713
- 45 c. cebadores que reconocen la secuencia de flanqueo 3':
la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 828 al nucleótido 847

ES 2 623 923 T3

- la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 830 al nucleótido 849
 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 828 al nucleótido 846
 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 828 al nucleótido 848
 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 830 al nucleótido 848
 - 5 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 830 al nucleótido 850
 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 828 al nucleótido 845
 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 830 al nucleótido 847
 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 828 al nucleótido 849
 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 830 al nucleótido 851
 - 10 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 828 al nucleótido 844
 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 830 al nucleótido 846
 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 828 al nucleótido 850
 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 830 al nucleótido 852
 - 15 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 992 al nucleótido 1009
 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 731 al nucleótido 752
 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 776 al nucleótido 795
 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 731 al nucleótido 753
 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 776 al nucleótido 794
 - 20 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 776 al nucleótido 796
 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 776 al nucleótido 793
 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 776 al nucleótido 797
 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 776 al nucleótido 792
 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 776 al nucleótido 798
 - 25 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 733 al nucleótido 752
 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 733 al nucleótido 753
 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 733 al nucleótido 754
 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 733 al nucleótido 755
 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 838 al nucleótido 854
 - 30 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 246 al nucleótido 263
 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 838 al nucleótido 855
 - la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 245 al nucleótido 264
- d. cebadores que reconocen la secuencia del ADN extraño para uso con cebadores que reconocen la secuencia de flanqueo 3':
- 35 - la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 173 al nucleótido 192
 - la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 22 al nucleótido 41
 - la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 172 al nucleótido 192

- la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 174 al nucleótido 192
- la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 191 al nucleótido 210
- la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 171 al nucleótido 192
- la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 175 al nucleótido 192
- 5 - la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 190 al nucleótido 210
- la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 192 al nucleótido 210
- la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 176 al nucleótido 192
- la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 189 al nucleótido 210
- la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 193 al nucleótido 210
- 10 - la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 188 al nucleótido 210
- la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 194 al nucleótido 210
- la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 199 al nucleótido 218
- la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 200 al nucleótido 218
- la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 197 al nucleótido 218
- 15 - la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 201 al nucleótido 218
- la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 201 al nucleótido 220
- la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 200 al nucleótido 220
- la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 199 al nucleótido 220
- la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 200 al nucleótido 221
- 20 - la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 199 al nucleótido 221
- la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 150 al nucleótido 172

Los cebadores de PCR adecuados para la identificación de EE-GM2 se describieron en el documento WO2006/108675, en particular de la línea 4 de la página 8 a la línea 4 de la página 33 (incorporado en este documento como referencia).

- 25 Como se usa este documento, "la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: Z de la posición X a la posición Y" indica la secuencia nucleotídica que incluye ambos extremos de nucleótidos.

30 Preferentemente, el fragmento amplificado tiene una longitud de entre 50 y 500 nucleótidos, tal como una longitud entre 100 y 350 nucleótidos. Los cebadores específicos pueden tener una secuencia que es entre 80 y 100% idéntica a una secuencia dentro de la región de flanco 5' o 3' del evento de élite y el ADN extraño del evento de élite, respectivamente, con la condición de que los apareamientos incorrectos todavía permitan la identificación específica del evento de élite con estos cebadores bajo condiciones óptimas de PCR. El intervalo de apareamientos incorrectos permisible sin embargo puede ser fácilmente determinado experimentalmente y se conoce por un experto en la técnica.

35 La detección de los fragmentos de integración puede realizarse de diversas maneras, por ejemplo a través de la estimación del tamaño después del análisis del gel. Los fragmentos de integración se pueden también secuenciar directamente. También se conocen en la técnica otros métodos específicos de secuencias para la detección de fragmentos de ADN amplificados.

40 Como la secuencia de los cebadores y su ubicación relativa en el genoma son exclusivas para el evento de élite, la amplificación del fragmento de integración sólo se producirá en muestras biológicas que comprenden (el ácido nucleico del) evento de élite. Preferentemente, al realizar una PCR para identificar la presencia de los eventos de élite EE-GM3 y EE-GM2 en muestras desconocidas, se incluye un control de un conjunto de cebadores con los que se puede amplificar un fragmento dentro de un "gen constitutivo" de las especies vegetales del evento. Los genes constitutivos son los genes que se expresan en la mayoría de los tipos de células y que están relacionados con actividades metabólicas básicas comunes a todas las células.

Preferentemente, el fragmento amplificado del gen constitutivo es un fragmento que es mayor que el fragmento de integración amplificado. Se pueden incluir otros controles dependiendo de las muestras que se analizan.

Los protocolos estándar de PCR se describen en la técnica, tal como en "PCR Applications Manual" (Roche Molecular Biochemicals, 2ª Edición, 1999) y otras referencias. Las condiciones óptimas para la PCR, incluyendo la secuencia de los cebadores específicos, se especifican en un "Protocolo de identificación por PCR (o Reacción en Cadena de la Polimerasa) para cada evento de élite. Sin embargo, se entiende que se necesitaría ajustar una serie de parámetros en el protocolo de identificación por PCR a determinadas condiciones de laboratorio, y se pueden modificar ligeramente para obtener resultados similares. Por ejemplo, el uso de un método diferente para la preparación del ADN puede requerir el ajuste de, por ejemplo, la cantidad de cebadores, polimerasa y condiciones de hibridación usadas. Del mismo modo, la selección de otros cebadores puede imponer otras condiciones óptimas para el protocolo de identificación por PCR. Estos ajustes sin embargo serán evidentes para una persona experta en la técnica, y además se detallan en los presentes manuales de aplicación de PCR, tal como el mismo que se citó anteriormente.

Como alternativa, se pueden usar cebadores específicos para amplificar fragmentos de integración que se pueden usar como "sondas específicas" para identificar EE-GM3 y EE-GM2 en muestras biológicas. El contacto del ácido nucleico de una muestra biológica con las sondas, bajo condiciones que permiten la hibridación de las sondas con sus correspondientes fragmentos en el ácido nucleico de la muestra, da como resultado la formación de híbridos ácido nucleico/sonda. La formación de estos híbridos se puede detectar (por ejemplo a través del marcaje del ácido nucleico o sonda), por lo cual la formación de estos híbridos indica la presencia de EE-GM3 y EE-GM2. Los métodos de identificación de este tipo basados en hibridación con una sonda específica (ya sea en un vehículo de fase sólida o en disolución) se describieron en la técnica. La sonda específica es preferentemente una secuencia que bajo condiciones óptimas se hibrida específicamente a una región dentro de la región de flanco 5' o 3' del evento de élite y preferentemente comprende también una parte del ADN extraño contiguo con éste (en adelante se refiere como "región específica"). Preferentemente, la sonda específica comprende una secuencia de entre 50 y 500 pb, preferentemente de 100 a 350 pb que es al menos 80%, preferentemente entre 80 y 85%, con mayor preferencia entre 85 y 90%, especialmente de forma preferente entre 90 y 95%, con la máxima preferencia entre 95% y 100% idéntica (o complementaria) a la secuencia nucleotídica de una región específica. Preferentemente, la sonda específica comprenderá una secuencia de aproximadamente 15 a aproximadamente 100 nucleótidos contiguos idénticos (o complementarios) a una región específica del evento de élite.

Además, los métodos de detección para los eventos de élite específicos EE-GM3 y EE-GM2, que difieren de los métodos de amplificación basados en PCR, se pueden desarrollar también usando la información de la secuencia específica del evento de élite que se proporciona en este documento. Los métodos de detección alternativos de este tipo incluyen métodos de detección de amplificación lineal de la señal basados en la escisión invasiva de estructuras de ácidos nucleicos particulares, conocido también como tecnología Invader™ (como se describe por ejemplo en las patentes U.S. 5.985.557, "Invasive Cleavage of Nucleic Acids", y 6.001.567, "Detection of Nucleic Acid Sequences by Invader Directed Cleavage, que se incorporan en este documento como referencia). Para la detección de EE-GM3 por este método, la secuencia diana se puede hibridar con un primer oligonucleótido marcado de ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1452 al nucleótido 1469 o su complementaria o dicha sonda marcada de ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 223 al nucleótido 240 o su complementaria, y se hibrida además con un segundo oligonucleótido de ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1434 al nucleótido 1451 o su complementaria o dicha sonda de ácido nucleico marcada que comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 241 al nucleótido 258 o su complementaria, en el que el primer y segundo oligonucleótidos se superponen en al menos un nucleótido. La estructura de dúplex o triplex que se produce por esta hibridación permite la escisión selectiva de la sonda con una enzima (Cleavase®) dejando intacta la secuencia diana. La sonda marcada escindida se detecta a continuación, potencialmente a través de una etapa intermedia que da como resultado una amplificación de señal adicional. Para la detección de EE-GM2 por este método, la secuencia diana se puede hibridar con un primer oligonucleótido marcado de ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 14 del nucleótido 312 al nucleótido 329 o su complementaria o dicha sonda marcada de ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 15 del nucleótido 490 al nucleótido 507 o su complementaria, y se hibrida además con un segundo oligonucleótido de ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 14 del nucleótido 294 al nucleótido 311 o su complementaria o dicha sonda marcada de ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 15 del nucleótido 508 al nucleótido 525 o su complementaria, en el que el primer y segundo oligonucleótidos se superponen en al menos un nucleótido. La estructura de dúplex o triplex que se produce por esta hibridación permite la escisión selectiva de la sonda con una enzima (Cleavase®) dejando intacta la secuencia diana. La sonda marcada escindida se detecta a continuación, potencialmente a través de una etapa intermedia que da como resultado una amplificación de señal adicional.

En consecuencia, la presente invención se refiere a un método para detectar la presencia de eventos de élite EE-GM3 y EE-GM2 en muestras biológicas a través de la hibridación con una sonda de ácido nucleico marcada sustancialmente complementaria, en el que la relación de sonda:ácido nucleico diana se amplifica a través del reciclado de la secuencia de ácido nucleico diana, siendo dicho método como se describe en la reivindicación 18.

Un "kit", como se usa en este documento, se refiere a un conjunto de reactivos para el fin de realizar el método de la invención, más particularmente, la identificación del evento de élite EE-GM3 en muestras biológicas o la determinación del estado de cigocidad de EE-GM3 que contiene el material vegetal. Más particularmente, una realización preferida del kit de la invención comprende al menos uno o dos cebadores específicos, como se describió anteriormente para identificar el evento de élite, o tres cebadores específicos para determinar el estado de cigocidad. Opcionalmente, el kit puede comprender además cualquier otro reactivo descrito en este documento en el protocolo de identificación por PCR. Como alternativa, de acuerdo con otra realización de esta invención, el kit puede comprender una sonda específica, como se describió anteriormente, la cual se hibrida específicamente con ácidos nucleicos de muestras biológicas para identificar la presencia de EE-GM3 en éstas. Opcionalmente, el kit puede comprender además cualquier otro reactivo (tal como, pero sin limitarse a, amortiguador de hibridación, marcador) para identificación de EE-GM3 en muestras biológicas usando la sonda específica.

El kit de la invención puede usarse, y sus componentes pueden ajustarse específicamente, para los fines de control de calidad (por ejemplo, pureza de lotes de semillas), detección de la presencia o ausencia del evento de élite en el material vegetal o material que comprende o se deriva del material vegetal, tal como, pero sin limitarse a, productos alimentarios o piensos.

Como se usa en este documento, "identidad de secuencia", con respecto a las secuencias nucleotídicas (ADN o ARN), se refiere al número de posiciones con nucleótidos idénticos dividido entre el número de nucleótidos en la más corta de las dos secuencias. La alineación de las dos secuencias nucleotídicas se realiza mediante el algoritmo de Wilbur y Lipmann (Wilbur y Lipmann, 1983, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 80:726) usando un tamaño de ventana de 20 nucleótidos, una longitud de palabra de 4 nucleótidos, y una penalización de espacio de 4. El análisis asistido por ordenador y la interpretación de datos de secuencia, incluyendo alineamiento de secuencias como se describió anteriormente, se puede llevar a cabo convenientemente, por ejemplo, usando el paquete de programas informáticos de análisis de secuencia del Genetics Computer Group (GCG, University of Wisconsin Biotechnology Center). Las secuencias se indican como "esencialmente similares" cuando las secuencias de este tipo tienen una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 75%, en particular al menos aproximadamente 80%, más particularmente al menos aproximadamente 85%, muy en particular al menos aproximadamente 90%, especialmente al menos aproximadamente 95%, más especialmente al menos aproximadamente 98%, o al menos aproximadamente 99%. Está claro que cuando se dice que las secuencias de ARN son esencialmente similares o tienen un determinado grado de identidad de secuencia con las secuencias de ADN, la timina (T) en la secuencia de ADN se considera igual a uracilo (U) en la secuencia de ARN. También, está claro que pueden aparecer con el tiempo pequeñas diferencias o mutaciones en las secuencias de ADN, y que se pueden permitir algunos apareamientos incorrectos para los cebadores o sondas específicos del evento de la invención, por lo que cualquier secuencia de ADN indicada en este documento en cualquier realización de esta invención para cualquier ADN de flanco 3' o 5' o para cualquier inserto o ADN extraño o cualquier cebador o sonda de esta invención, incluye también secuencias esencialmente similares a las secuencias que se proporcionan en este documento, tales como secuencias que se hibridan a o con al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o al menos 99% de identidad de secuencia a la secuencia dada para cualquier ADN de flanco 3' o 5', para cualquier cebador o sonda o para cualquier inserto o ADN extraño de esta invención.

El término "cebador", como se usa en este documento, incluye cualquier ácido nucleico capaz de cebar la síntesis de un ácido nucleico naciente en un proceso dependiente de molde, tal como PCR. Típicamente, los cebadores son oligonucleótidos de 10 a 30 nucleótidos, pero pueden emplearse secuencias más largas. Los cebadores se pueden proporcionar en forma de doble cadena, aunque se prefiere la forma monocatenaria. Las sondas se pueden usar como cebadores, pero se diseñan para unirse con los ADN o ARN diana y no se necesitan usar en un proceso de amplificación.

El término "reconocimiento", según se usa en este documento, cuando se refiere a cebadores específicos, se refiere al hecho de que los cebadores específicos hibridan específicamente a una secuencia de ácido nucleico en el evento de élite bajo las condiciones establecidas en el método (tales como las condiciones del protocolo de identificación por PCR), por lo cual la especificidad se determina por la presencia de controles positivos y negativos.

El término "hibridación", según se usa en este documento, cuando se refiere a sondas específicas, se refiere al hecho de que la sonda se une a una región específica en la secuencia de ácido nucleico del evento de élite bajo condiciones estándares estrictas. Condiciones estándares estrictas, según se usa en este documento, se refiere a las condiciones de hibridación descritas en este documento o a las condiciones convencionales de hibridación como se describieron por Sambrook et al., 1989 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY), que, por ejemplo, puede comprender las siguientes etapas: 1) inmovilizar fragmentos de ADN genómico de planta en un filtro, 2) prehibridar el filtro durante 1 a 2 horas a 42°C en formamida al 50%, SSPE 5 X, reactivo de Denhardt 2 X y SDS al 0,1%, o durante 1 a 2 horas a 68°C en SSC 6 X, reactivo de Denhardt 2 X y SDS al 0,1%, 3) añadir la sonda de hibridación que se marcó, 4) incubar durante 16 a 24 horas, 5) lavar el filtro durante 20 minutos a temperatura ambiente en SSC 1 X y SDS al 0,1%, 6) lavar el filtro tres veces durante 20 minutos cada vez a 68°C en SSC 0,2 X y SDS al 0,1%, y 7) exponer el filtro durante 24 a 48 horas a una película de rayos X a -70°C con una pantalla intensificadora.

Como se usa en este documento, una muestra biológica es una muestra de una planta, material vegetal o productos que comprenden el material vegetal. El término “planta” pretende incluir tejidos de planta de soja (*Glycine max*), en cualquier fase de madurez, así como cualesquiera células, tejidos u órganos tomados de o derivados de cualquier planta de este tipo, incluyendo, sin limitación, cualquier semilla, hojas, tallos, flores, raíces, células individuales, gametos, cultivos de células, cultivos de tejidos o protoplastos. El “material vegetal”, como se usa en este documento, se refiere a un material que se obtiene o deriva de una planta. Los productos que comprenden el material vegetal se refieren a alimentos, piensos u otros productos que se fabrican usando el material vegetal o se pueden contaminar por material vegetal. Se entiende que, en el contexto de la presente invención, las muestras biológicas de este tipo se prueban en busca de la presencia de ácidos nucleicos específicos para EE-GM3 y EE-GM2, lo que implica la presencia de los ácidos nucleicos en las muestras. De este modo, los métodos referidos en este documento para identificar los eventos de élite EE-GM3 y EE-GM2 en muestras biológicas se refieren a la identificación en muestras biológicas de ácidos nucleicos que comprenden el evento de élite.

Como se usa en este documento, “que comprende” debe interpretarse como que especifica la presencia de las características indicadas, números enteros, etapas, reactivos o componentes a que se refiere, pero no excluye la presencia o adición de una o más características, números enteros, etapas o componentes, o agrupaciones de éstas. De este modo, por ejemplo, un ácido nucleico o proteína que comprende una secuencia de nucleótidos o de aminoácidos puede comprender más nucleótidos o aminoácidos de los realmente citados, es decir, integrarse en un ácido nucleico o proteína más grande. Un gen quimérico que comprende una secuencia de ADN que se define funcionalmente o estructuralmente puede comprender secuencias de ADN adicionales, tales como secuencias promotoras y de terminación de la transcripción.

La presente invención se refiere también al desarrollo de un apilamiento del evento de élite EE-GM3 y del evento de élite EE-GM2 en la soja, a las plantas que comprenden un apilamiento de estos eventos, a la progenie que se obtiene de estas plantas y a las células vegetales, o material vegetal derivado de plantas que comprenden estos apilamientos. Las plantas que comprenden los eventos de élite EE-GM3 y EE-GM2 se pueden obtener según se describe en el Ejemplo 1. Los apilamientos se obtienen cruzando las plantas que comprenden eventos individuales usando métodos de reproducción convencionales y la identificación de la progenie de las mismas que comprenden dos eventos diferentes.

Las plantas de soja o material vegetal que comprende EE-GM3 y EE-GM2 se pueden identificar según el protocolo de identificación por PCR descrito para EE-GM3 y EE-GM2 en el Ejemplo 2. En resumen, el ADN genómico de soja presente en la muestra biológica se amplifica por PCR usando un cebador que reconoce específicamente una secuencia dentro de la secuencia de flanqueo 5' o 3' de EE-GM3, tal como el cebador con la secuencia de SEC ID NO: 5, y un cebador que reconoce una secuencia en el ADN extraño, tal como el cebador con la secuencia de SEC ID NO: 4, y además usando un cebador que reconoce específicamente una secuencia dentro de la secuencia de flanqueo 5' o 3' de EE-GM2, tal como el cebador con la secuencia de SEC ID NO: 18, y un cebador que reconoce una secuencia en el ADN extraño, tal como el cebador con la secuencia de SEC ID NO: 19.

Los cebadores de ADN que amplifican parte de una secuencia de soja endógena se usan como control positivo para la amplificación por PCR. Si tras la amplificación por PCR el material produce los fragmentos de los tamaños esperados, el material contiene el material vegetal de una planta de soja que contiene el evento de élite EE-GM3 y EE-GM2.

Las plantas que contienen EE-GM3 y EE-GM2 se caracterizan por su tolerancia a glifosato, así como por su tolerancia a los inhibidores de HPPD tal como isoxaflutol, y además por su tolerancia a glufosinato. Las plantas que contienen los apilamientos de eventos se caracterizan también por tener características agronómicas que son comparables con las variedades de soja comercialmente disponibles, en ausencia de aplicación de herbicidas. Se observó que la presencia del ADN extraño en las regiones de inserción del genoma de la planta de soja que se describe en este documento confiere características fenotípicas y moleculares especialmente interesantes a las plantas que comprenden este evento.

También se describe en el presente documento una combinación de eventos de élite EE-GM3 y EE-GM2 en plantas de soja, obtenible mediante la inserción de transgenes en ubicaciones específicas en el genoma de la soja, eventos de élite los cuales confieren tolerancia a glifosato, glufosinato y a un herbicida inhibidor de HPPD tal como isoxaflutol en las plantas de soja de este tipo, y en la que los eventos de élite de este tipo no causan ningún efecto sobre el comportamiento agronómico de las sojas de este tipo que afectan negativamente al rendimiento de las plantas de soja de este tipo en comparación con líneas isogénicas (como se usa en este documento, “líneas isogénicas” o “líneas casi isogénicas” son las líneas de soja del mismo fondo genético pero que carecen de los transgenes, tales como las plantas del mismo fondo genético como la planta que se usa para la transformación, o líneas hermanas segregantes que han perdido los transgenes). En particular, la presente invención proporciona una combinación de eventos de élite EE-GM3 y EE-GM2 en plantas de soja, en la que la inserción o presencia de dicho evento de élite en el genoma de las plantas de soja de este tipo no provoca una susceptibilidad aumentada a la enfermedad, no provoca un retraso en el rendimiento, o no provoca un alojamiento aumentado en las plantas de soja de este tipo, comparado con las líneas isogénicas. Por lo tanto, la presente invención proporciona una combinación de eventos de élite en plantas de soja, designados como EE-GM3 y EE-GM2, que dan lugar a plantas de soja que pueden tolerar la aplicación de glifosato, glufosinato y un herbicida inhibidor de HPPD (ya sea simultánea o separadamente)

sin afectar negativamente al rendimiento de dichas plantas de soja comparado con las líneas isogénicas, plantas de soja las cuales no tienen ninguna diferencia estadísticamente significativa en su susceptibilidad a la enfermedad o alojamiento, comparado con las plantas de soja isogénicas. Estas características hacen muy interesante la presente combinación de eventos de élite para controlar malezas resistentes a glifosato en campos de soja, y también pueden usarse en los enfoques para evitar o retrasar el desarrollo adicional de resistencia a glifosato en los campos de soja (por ejemplo, mediante la aplicación de glifosato e isoxaflutol y/o glufosinato, o mediante aplicación de isoxaflutol y glifosato y/o glufosinato, o mediante la aplicación de glufosinato y glifosato y/o isoxaflutol, asegurando al menos 2 o incluso 3 modos diferentes de actuación de los herbicidas aplicados sobre un campo de soja).

En este documento se proporciona además una planta de soja o parte de ésta que comprende el evento EE-GM3 y el evento de élite EE-GM2, en la que la semilla representativa de soja que comprende el evento EE-GM3 se depositó en el NCIMB con el número de acceso 41659, la semilla representativa que comprende el evento de élite EE-GM2 se depositó en el NCIMB con el número de acceso NCIMB 41660, la semilla representativa de soja que comprende el evento EE-GM3 y EE-GM2 se depositó en la ATCC bajo número de acceso PTA-11042.

Las plantas de soja o partes de éstas que comprenden EE-GM3 y EE-GM2 se pueden obtener combinando los respectivos eventos de élite que pueden encontrarse en las semillas depositadas correspondientes a través de cualquiera de los medios disponibles en la técnica, incluyendo el cruzamiento de las plantas a partir de las semillas depositadas, la recolección de la progenie de éstas, e identificación de aquellas plantas de la progenie que comprenden la combinación adecuada de los eventos de élite. En este documento se proporcionan además semillas de tales plantas, que comprenden tales eventos, así como un producto de soja que se produce a partir de dichas semillas, en el que dicho producto de soja comprende los eventos EE-GM3 y EE-GM2. Tal producto de soja puede ser o puede comprender harina, semillas molidas, harina, o copos, y comprende ácidos nucleicos específicos para los eventos de élite EE-GM2 y EE-GM3, como se detectan usando el método descrito en el presente documento. Particularmente, dicho producto de soja comprende un ácido nucleico que produce amplicones de diagnóstico para el evento EE-GM3 y evento de élite EE-GM2, comprendiendo tales amplicones de este tipo las SEC. ID NO: 2 o 3 y/o SEC. ID NO: 14 o 15. En este documento se proporciona además un método para producir un producto de soja, que comprende obtener semillas de soja que comprenden el evento EE-GM3 y evento de élite EE-GM2, y producir a partir de ellas tal producto de soja.

En este documento se proporciona además una planta de soja, que es la progenie de cualquiera de las plantas de soja anteriores, y que comprende el eventos EE-GM3 y EE-GM2.

En este documento se proporciona además un método para producir una planta de soja tolerante a los herbicidas glifosato y/o glufosinato y/o isoxaflutol, que comprende introducir en el genoma de tal planta el evento EE-GM3 y el evento EE-GM2, particularmente por el cruzamiento de una primera planta de soja que contiene el evento EE-GM3 con una planta de soja que comprende EE-GM2, y seleccionar una planta progenie tolerante a glifosato y/o glufosinato y/o isoxaflutol.

En este documento se proporciona además una planta tolerante a glifosato y glufosinato y/o isoxaflutol que comprende EE-GM2 y EE-GM3, particularmente sin retraso del rendimiento, y con características agronómicas aceptables, que comprende una proteína 2mEPSPS, HPPD y PAT, y es capaz de producir un amplicón de diagnóstico para los eventos EE-GM3 y EE-GM2.

Además, en este documento se proporciona un método para controlar las malezas en un campo de plantas de soja que comprenden los eventos EE-GM3 y EE-GM2, que comprende tratar el campo con una cantidad efectiva de un herbicida basado en isoxaflutol, basado en glifosato y/o basado en glufosinato, en el que tales plantas son tolerantes a herbicida(s) de este tipo.

El término "isoxaflutol", como se usa en este documento, se refiere al herbicida isoxaflutol [es decir (5-ciclopropil-4-isoxazolil)[2-(metilsulfonil)-4-(trifluorometil)fenil]metanona], al metabolito activo de éste, dicetonitrilo, y a cualesquiera mezclas o disoluciones que comprenden dichos compuestos. Los herbicidas inhibidores de HPPD útiles para aplicar en las plantas que comprenden los eventos de esta invención son los dicetonitrilos, por ejemplo 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-metilsulfonil-4-trifluorometilfenil)-propano-1,3-diona y 2-ciano-1-[4-(metilsulfonil)-2-trifluorometilfenil]-3-(1-metilciclopropil)propano-1,3-fiona; otros isoxazoles; y los pirazolinatos, por ejemplo topamezona [es decir [3-(4,5-dihidro-3-isoxazolil)-2-metil-4-(metilsulfonil)fenil](5-hidroxi-1-metil-1H-pirazol-4-il)metanona], y pirasulfotol [(5-hidroxi-1,3-dimetilpirazol-4-il(2-metil-4-trifluorometilfenil)metanona]; o pirazofeno [2-[4-(2,4-diclorobenzoiil)-1,3-dimetilpirazol-5-iloxil]acetofenona].

Como se describe en este documento, un campo que se cultiva con las plantas de soja que contienen el evento EE-GM3 se puede tratar con un herbicida inhibidor de HPPD, tal como isoxaflutol ("IFT"), antes de que se cultiven las plantas de soja o se siembren las semillas, que limpia el campo de malezas que se mueren por el inhibidor de HPPD, lo que favorece las prácticas de siembra directa, seguido del cultivo o siembra de la soja en ese mismo campo pre-tratado más tarde (aplicación de quemado usando un herbicida inhibidor de HPPD). La actividad residual de IFT protegerá también a las plantas de soja emergentes y en crecimiento de la competencia con las malezas en las fases tempranas del crecimiento. Una vez que las plantas de soja tienen cierto tamaño, y las malezas tienden a

reaparecer, se puede aplicar como herbicida post-emergente el glifosato o una mezcla de glifosato-inhibidor de HPPD, por encima de las plantas.

5 En otra realización de esta invención, un campo en el que se sembraron las semillas que contienen el evento EE-GM3 se puede tratar con un herbicida inhibidor de HPPD, tal como IFT, antes de que las plantas de soja emerjan pero después de que las semillas se siembren (el campo se puede preparar libre de maleza antes de sembrar usando otros medios, típicamente prácticas convencionales de labranza tales como arado, arado de cincel, o preparación de semillero), en el que la actividad residual mantendrá el campo libre de malezas que mueren por el herbicida de manera que las plantas de soja que emergen y crecen no tienen competencia por las malezas (aplicación pre-emergencia de un herbicida inhibidor de HPPD). Una vez que las plantas de soja tienen determinado tamaño, y las malezas tienden a reaparecer, puede aplicarse como herbicida post-emergente glifosato - o una mezcla de glifosato-inhibidor de HPPD - por encima de las plantas.

10 En otra realización de esta invención, las plantas que comprenden los eventos EE-GM3 y EE-GM2 se pueden tratar con un herbicida inhibidor de HPPD, tal como IFT, por encima de las plantas de soja (que emergieron de las semillas que se sembraron), lo que limpia el campo de malezas que mueren por el inhibidor de HPPD, cuya aplicación puede ser junto con (por ejemplo en una mezcla en tanque pulverizador), seguida de o precedida por un tratamiento con glifosato como herbicida post-emergente por encima de las plantas (la aplicación post-emergencia de un herbicida inhibidor de HPPD (con o sin glifosato)).

15 También, de conformidad con la presente invención, las plantas de soja que alojan a EE-GM3 y EE-GM2 se pueden tratar con los siguientes insecticidas, herbicidas o fungicidas, o las semillas de soja que alojan a EE-GM3 y EE-GM2 se pueden recubrir con un recubrimiento de semilla que comprende los siguientes insecticidas, herbicidas o fungicidas:

Herbicidas de la soja:

25 Alaclor, Bentazona, Trifluralina, Clorimurón-etilo, Cloransulam-metilo, Fenoxaprop, Fomesafeno, Fluazifop, Glifosato, Imazamox, Imazaquin, Imazetapir, (S-)Metolaclo, Metribuzina, Pendimetalina, Tepraloxidim, Isoxaflutol, Glufosinato.

Insecticidas de la soja:

30 Lambda-cihalotrina, Metomil, Parationa, Tiocarb, Imidacloprid, Clotianidina, Tiametoxam, Tiacloprid, Acetamiprid, Dinotofurán, Flubendiamida, Rinaxipir, Ciazipir, Espinosad, Espinotoram, Emamectina-Benzoato, Fipronilo, Etiprol, Deltametrina, β -Ciflutrina, gamma y lambda cihalotrina, 4-[[[6-clorpiridin-3-il)metil]](2,2-difluoretil)amino]furan-2(5H)-ona, Espiroetramat, Espinodiclofeno, Triflumurón, Flonicamid, Tiodicarb, beta-Ciflutrina.

Fungicidas de la soja:

35 Azoxistrobina, Ciproconazol, Epoxiconazol, Flutriafol, Piraclostrobina, Tebuconazol, Trifloxistrobina, Protiociconazol, Tetraconazol.

Los siguientes ejemplos describen la identificación de los eventos de élite EE-GM3, EE-GM1 y EE-GM2, y de plantas que contienen un apilamiento del evento EE-GM3 con EE-GM1 o EE-GM3 con EE-GM2, y el desarrollo de herramientas para la identificación específica del evento de élite EE-GM3, EE-GM1 o EE-GM2, y sus apilamientos en muestras biológicas.

40 A menos que se indique lo contrario en los Ejemplos, todas las técnicas recombinantes se llevan a cabo de acuerdo a los protocolos estándares que se describen en "Sambrook J and Russell DW (eds.) (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York" y en "Ausubel FA, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA and Struhl K (eds.) (2006) Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Nueva York".

45 Los materiales estándares y las referencias se describen en "Croy RDD (ed.) (1993) Plant Molecular Biology LabFax, BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford and Blackwell Scientific Publications, Oxford" y en "Brown TA, (1998) Molecular Biology LabFax, 2nd Edition, Academic Press, San Diego". Los materiales estándares y métodos para las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se pueden encontrar en "McPherson MJ y Møller SG (2000) PCR (The Basics), BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford" y en "PCR Applications Manual, 3ª Edición (2006), Roche Diagnostics GmbH, Mannheim o www.roche-applied-science.com".

50 Se debería entender que una serie de parámetros en cualquier protocolo de laboratorio tal como los protocolos de PCR en los Ejemplos a continuación pueden necesitar ser ajustados a las condiciones específicas del laboratorio, y se pueden modificar ligeramente para obtener resultados similares. Por ejemplo, el uso de un método diferente para la preparación del ADN o la selección de otros cebadores en un método de PCR puede imponer otras condiciones óptimas para el protocolo de PCR. Estos ajustes serán evidentes sin embargo para una persona experta en la técnica, y se detallan además en los presentes manuales de aplicación de PCR.

55

En la descripción y los ejemplos, se hace referencia a las siguientes secuencias:

- SEC ID NO: 1: secuencia nucleotídica del fragmento Sall del vector pSF10.
- SEC ID NO: 2: secuencia nucleotídica que comprende la región 5' que flanquea el ADN extraño que comprende los genes de tolerancia a herbicida en EE-GM3.
- 5 SEC ID NO: 3: secuencia nucleotídica que comprende la región 3' que flanquea el ADN extraño que comprende los genes de tolerancia a herbicida en EE-GM3.
- SEC ID NO: 4: cebador SOY028
- SEC ID NO: 5: cebador SOY029
- SEC ID NO: 6: cebador SMP187
- 10 SEC ID NO: 7: cebador STV019
- SEC ID NO: 8: secuencia nucleotídica del amplicón
- SEC ID NO: 9: cebador 1 para la amplificación del fragmento de control (SOY01)
- SEC ID NO: 10: cebador 2 para la amplificación del fragmento de control (SOY02)
- SEC ID NO: 11: secuencia nucleotídica de pB2/P35SAcK
- 15 SEC ID NO: 12: secuencia nucleotídica que comprende la región 5' que flanquea el ADN extraño en EE-GM1
- SEC ID NO: 13: secuencia nucleotídica que comprende la región 3' que flanquea el ADN extraño en EE-GM1
- 20 SEC ID NO: 14: secuencia nucleotídica que comprende la región 5' que flanquea el ADN extraño en EE-GM2
- SEC ID NO: 15: secuencia nucleotídica que comprende la región 3' que flanquea el ADN extraño en EE-GM2
- SEC ID NO: 16: cebador SOY06
- SEC ID NO: 17: cebador SOY07
- 25 SEC ID NO: 18: cebador SOY09
- SEC ID NO: 19: cebador SOY010
- SEC ID NO: 20: secuencia nucleotídica de un ADN extraño y secuencias de flanqueo vegetales en EE-GM3
- SEC ID NO: 21: cebador SHA130
- 30 SEC ID NO: 22: cebador SHA178

Ejemplos

1. Transformación de *Glycine max* con genes de tolerancia a herbicida.

1.1. Descripción del ADN extraño que comprende los genes quiméricos 2mEPSPS y HPPD-Pf-W336

35 El plásmido pSF10 es un pUC19 derivado del vector de clonación que contiene un gen quimérico *2mepsps* y un gen quimérico *hppd-Pf-W336*, ubicado sobre un fragmento Sall de aproximadamente 7,3 kb. Una descripción completa del ADN comprendido entre los dos sitios de restricción Sall se muestran en la Tabla 1 a continuación. La secuencia nucleotídica se representa en la SEC ID NO: 1.

Tabla 1. Posiciones nucleotídicas del ADN comprendido entre los sitios de restricción Sall de pSF10 (SEC ID NO: 1)

Posiciones nucleotídicas	Orientación	Descripción y referencias
188-479	complementaria	3'nos: secuencia que incluye la región 3' sin traducir del gen de la nopalina sintasa a partir del T-ADN de pTIT37 del <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Depicker

Posiciones nucleotídicas	Orientación	Descripción y referencias
		et al., 1982, Journal of Molecular and Applied Genetics, 1, 561-573)
480-1556	complementaria	hppdPf W336: la secuencia codificante de la 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa de la cepa A32 de <i>Pseudomonas fluorescens</i> modificada por la sustitución del aminoácido Glicina 336 por un Triptófano, como se describe por Boudec y et al. (2001) Patente US US6245968B1
1557-1928	complementaria	TPotp Y: secuencia codificante de un derivado de péptido de tránsito optimizado (la posición 55 cambiada en Tirosina), que contiene una secuencia de los genes de la subunidad pequeña RuBisCO de <i>Zea mays</i> (maíz) y <i>Helianthus annuus</i> (girasol), como se describe por Lebrun y et al. (1996) documento US5510471
1929-2069	complementaria	5'tev: secuencia que incluye la secuencia líder del virus del grabado de tabaco como se describe por Carrington y Freed (1990) Journal of Virology, 64, 1590-1597
2070-3359	complementaria	Ph4a748 ABBC: secuencia que incluye la región promotora del gen H4 de la histona de <i>Arabidopsis thaliana</i> , que contiene una duplicación interna (Chabouté et al., 1987) Plant Molecular Biology, 8, 179-191.
3360-4374		Ph4a748: secuencia que incluye la región promotora del gen H4 de la histona de <i>Arabidopsis thaliana</i> (Chabouté et al., 1987) Plant Molecular Biology, 8, 179-191.
4375-4855		intron1 h3At: primer intrón del gen H de la variante H3.III de la histona de <i>Arabidopsis thaliana</i> (Chaubet et al., 1992) Journal of Molecular Biology, 225, 569-574.
4856-5227		TPotp C: secuencia codificante del péptido de tránsito optimizado, que contiene la secuencia de los genes de la subunidad pequeña de RuBisCO de <i>Zea mays</i> (maíz) y <i>Helianthus annuus</i> (girasol), como se describe por Lebrun et al. (1996) documento US5510471
5228-6565		2mepsps: secuencia codificante del gen doble mutante de la 5-enol-piruvilshikimato-3-fosfato sintasa de <i>Zea mays</i> (maíz) (Lebrun et al., 1997) documento WO9704103-A1
6566-7252		3'histonAt: secuencia que incluye la región 3' sin traducir del gen H4 de la histona de <i>Arabidopsis thaliana</i> (Chabouté et al., 1987) Plant Molecular Biology, 8, 179-191.

1.2. Evento EE-GM3

5 El fragmento pSF10 linealizado con Sall, purificado mediante HPLC, de aproximadamente 7,3 kb (que contiene el gen de tolerancia al glifosato *2mEPSPS* y el gen de tolerancia al inhibidor de HPPD *HPPD-Pf-W336*) se usó para obtener plantas de soja transformadas por medio de la transferencia directa de genes en células de soja tipo Jack (Nickell, C. D., G. R. Noel, D. J. Thomas, y R. Waller. Registration of "Jack" soybean. Crop Sci 1365. 30. 1990), seguido de la regeneración de las células vegetales transformadas en plantas de soja transgénicas fértiles.

1.2.1 Identificación del evento de élite EE-GM3

10 El evento de élite EE-GM3 se seleccionó en base a un procedimiento de selección exhaustivo basado en la buena expresión y estabilidad de los genes de tolerancia a herbicida, y se evaluó su compatibilidad con características agronómicas óptimas tales como altura de las plantas, altura hasta el nodo, sostenimiento, vigor, rendimiento de las semillas. Las plantas de soja que contienen este evento se seleccionaron a partir de un amplio intervalo de eventos de transformación diferentes obtenidos usando los mismos genes quiméricos. Los parámetros que se usan en la selección de este evento fueron: a) tolerancia aceptable a la aplicación del herbicida isoxaflutol en los ensayos de campo, b) tolerancia aceptable a la aplicación del herbicida glifosato en los ensayos de campo, c) tolerancia aceptable a la aplicación combinada de los herbicidas isoxaflutol y glifosato en los ensayos de campo, d) una inserción de los transgenes de tolerancia a herbicida en un único locus en el genoma de la planta de soja, con ausencia del vector principal, e) agronomía total similar a la de las plantas parentales que se usan para la transformación (madurez, alojamiento, susceptibilidad a las enfermedades, etc.), y f) ningún retraso significativo del

rendimiento causado por la inserción del ADN transformante (al compararse con una línea isogénica sin el evento, tal como la línea de planta que se usa para la transformación, cultivada bajo las mismas condiciones).

5 En la generación T3, se seleccionó una línea homocigótica del evento de transformación de la soja EE-GM3 para la producción de semilla. Los estudios agronómicos de campo replicados en múltiples ubicaciones se condujeron en las regiones de adaptación de la variedad parental, Jack. Las evaluaciones de campo incluyeron tolerancia a herbicidas y comportamiento agronómico. El comportamiento agronómico de las plantas que contienen EE-GM3 se encontró comparable al de Jack (cuando no se aplicaron herbicidas).

Las evaluaciones de campo mostraron también que las plantas que portan el evento EE-GM3 tienen:

- morfología vegetal similar y características de semilla comparadas con Jack,
- 10 - sin cambios en la respuesta a enfermedades de la soja comparado con Jack, y
- sin cambios en la germinación o dormancia de semilla comparado con Jack.

15 Las semillas (generación T1 o S1), cosechadas en el invernadero a partir de la planta transformante inicial (T0) (la planta transformada con el constructo para producir el evento EE-GM3) se sembraron en el campo. Se sembraron tres bloques y rociaron con 0, 2, o 4 kg/ha de glifosato. La semilla se cosechó de las plantas que demostraron el nivel deseado de tolerancia al herbicida, glifosato.

Las semillas (generación T2) cosechadas a partir de las plantas T1 auto-polinizadas cultivadas en el campo se sembraron en "planta por fila". Los análisis de Chi cuadrado de los datos de segregación por filas (total o parcialmente tolerantes) y de plantas individuales dentro de filas (tolerantes o sensibles) demuestran la herencia mendeliana esperada de una inserción individual para EE-GM3.

20 La selección e incremento de las semillas continuó hasta que se determinó que una línea era homocigótica para el evento de transformación EE-GM3, y se seleccionó para la producción de semillas de núcleo en la cuarta generación. Entonces, la semilla de generación T5 sirvió como candidato para el desarrollo de diferentes variedades. Las plantas en la sexta generación (generación T6) se cruzaron con líneas convencionales de reproducción de la soja en un programa de introgresión diseñado para mover el evento a una base más amplia de germoplasma de soja comercial. Las plantas híbridas F1 (líneas EE-GM3 x líneas convencionales) se cultivaron hasta la madurez, y se sembró la semilla F2. Las muestras de hojas de 901 plantas F2 se analizaron mediante cebadores de PCR diseñados para identificar la cigosidad del inserto EE-GM3. Se observó la relación esperada de 1:2:1 por las leyes de Mendel para una segregación de inserción individual.

30 El evento EE-GM3 seleccionado se introdujo en diferentes fondos genéticos comerciales, y se compararon los resultados de los ensayos de campo en diferentes ubicaciones. Las plantas se expusieron al herbicida glifosato y/o al herbicida isoxaflutol empleando diferentes tratamientos. Las plantas presentaron una buena tolerancia al herbicida. Centenares de variedades de cultivo de soja diferentes que contienen el evento EE-GM3 se usaron en un estudio de herencia, y se aplicaron los herbicidas. Las líneas seleccionadas a partir de este ensayo se incrementaron posteriormente en el campo y se trataron también con el herbicida. De este ensayo, se incrementaron 35 50 líneas seleccionadas, y éstas se trataron también con herbicida. Las puntuaciones de fitotoxicidad para estas últimas líneas rociadas con isoxaflutol y glifosato mostraron cierta variabilidad en la respuesta, pero el intervalo de respuestas entre las líneas reflejó una variabilidad similar como se observó a lo largo de 4 réplicas del evento EE-GM3 en el fondo Jack original, cultivado bajo el mismo tratamiento y condiciones ambientales. Por lo tanto, se observó tolerancia a los herbicidas relevantes a lo largo de un amplio intervalo de germoplasma para plantas que comprenden EE-GM3.

Además, las plantas que contienen el evento EE-GM3 tuvieron morfología normal de hoja, flor y vaina, fertilidad excelente, y no mostraron enfermedades ni susceptibilidad anormal a insectos en múltiples fondos genéticos. Durante la introgresión hacia múltiples fondos genéticos no se observaron aberraciones ni anomalías.

45 En una estación, se diseñó un estudio de 10 ubicaciones para comparar el comportamiento agronómico de la soja tolerante a doble herbicida que comprende el evento de transformación EE-GM3 con la variedad de la parental transformación, Jack y algunas variedades de soja no transgénicas. Mediante el uso de un diseño de bloques completo al azar, las plantas EE-GM3 se cultivaron en terrenos replicados, ya sea con control convencional de malezas o con los herbicidas pretendidos, glifosato e isoxaflutol. Los terrenos con plantas de soja que contienen el evento de transformación EE-GM3 se rociaron con el herbicida isoxaflutol a una tasa diana de 70 gramos i.a./Ha y con el herbicida glifosato a una tasa diana de 1060 gramos i.a./Ha. La aplicación del herbicida a estas plantas se realizó como un rocío foliar en aproximadamente la fase V4-V5 del crecimiento de la planta. Las observaciones agronómicas se realizaron en el inicio, a la mitad y al final de la estación. La densidad de la planta (parámetro; recuento de sostenimiento) fue mayor para los terrenos con Jack y con la variedad no transgénica que en los terrenos con el evento EE-GM3 por una desviación estándar. La diferencia inicial del recuento de sostenimiento puede haber sido el resultado de la calidad del lote de semillas, dado que la semilla de siembra EE-GM3 se produjo en vivero de estación contraria, mientras que la semilla de las variedades no transgénicas se produjeron en la estación de producción normal contigua a Estados Unidos. Sin embargo, el número de días para alcanzar el 50% de

emergencia y los índices de vigor de la planta fueron los mismos, indicando que los lotes de semillas fueron comparables para estos parámetros de comportamiento. En los recuentos de sostenimiento al final de estación, Jack y las variedades no transgénicas se mantuvieron diferentes de las plantas EE-GM3 por una desviación estándar. Los rendimientos de los terrenos de plantas del evento EE-GM3 fueron también más bajos que aquellos de Jack por una desviación estándar, quizás como resultado de la densidad más baja de la planta de los terrenos del evento EE-GM3. El rendimiento de las variedades no transgénicas como se puede esperar fue mayor que para Jack debido al progreso en el potencial de rendimiento encontrado en las variedades más nuevas.

En un ensayo, se realizaron puntuaciones de salud de la planta en tres fases de crecimiento: V4-5, R1 y madurez total. La primera evaluación fue justo después de la aplicación pretendida del herbicida. En el momento de la evaluación final de la salud de la planta, las plantas que contienen EE-GM3 rociadas con ambos herbicidas tuvieron la misma puntuación que las plantas Jack no rociadas, o las plantas no rociadas que comprenden EE-GM3. En las puntuaciones por el personal agrónomo, las plantas rociadas con herbicida recibieron una puntuación de salud de 3-4 (daño moderado) en las fases de crecimiento de la planta V4-5 y R1. Las plantas no rociadas (plantas Jack no transformadas o plantas de soja que contienen EE-GM3) se puntuaron como 4,6-4,8 (la puntuación de 5 indican ausencia de daño). En la puntuación final de la salud de la planta, todos los terrenos recibieron la misma puntuación de 5 (ausencia de daño).

Una estación de ensayo fue aquella de pluviosidad excepcional, y el daño del cultivo en las plantas EE-GM3 tras el herbicida pretendido fue más obvio que el observado en otras estaciones. Las evaluaciones de campo incluyeron también la monitorización de características de buena forma (reproducción, resistencia a enfermedades, fecundidad, dispersión de semilla, dormancia, persistencia). Para las características reproductivas, días para la emergencia, días para el 50% de floración y días para el 90% de maduración de las vainas, las plantas EE-GM3 y Jack no fueron diferentes. No se notó ninguna diferencia en la reacción a infestaciones naturales de enfermedades de plantas y plagas de insectos. Aunque EE-GM3 produjo un menor rendimiento final que Jack, no se encontró diferencia en la fecundidad (peso de 100 semillas). La evaluación de los parámetros de dispersión de semilla (desgranado de la vaina y mantenimiento de la planta) encontró que EE-GM3 y Jack tienen la misma puntuación de dispersión de la vaina, pero encontró que las plantas EE-GM3 son menos propensas al mantenimiento. La evaluación de las semillas cosechadas a partir de las 10 ubicaciones no encontró problemas incrementados por la germinación o prueba de dormancia.

En estos ensayos durante la estación pluviosidad excepcional, el rendimiento final de las plantas EE-GM3, a pesar del tratamiento de control de malezas, fue menor que el rendimiento de Jack por una desviación estándar (quizás como resultado de la menor densidad de plantas de los terrenos del evento EE-GM3). En la estación excepcionalmente húmeda, el daño al cultivo (blaqueamiento en el 10-30% del área de cultivo) se dio a conocer para los terrenos EE-GM3, hasta seis semanas tras la aplicación foliar de los herbicidas glifosato e isoxaflutol. Sin embargo, hacia la madurez, se asignaron puntuaciones de salud de la planta de "ausencia de daño" para todos los terrenos. Se espera que los ensayos de campo replicados en multi-ubicaciones con EE-GM3 introgresado en un fondo de la variedad de cultivo de élite de soja, cuando se comparan con las líneas hermanas casi isogénicas que no contienen el transgén, no muestren diferencia de rendimiento entre las plantas que contienen el evento EE-GM3 y las líneas casi isogénicas (en ausencia del tratamiento con el herbicida).

Adicionalmente, en un ensayo de campo replicado se encontró una tolerancia significativa del cultivo (blaqueamiento menor del 10%), en plantas de soja que comprenden EE-GM3 cuando se trataron ya sea pre- o post-emergencia con IFT (70 g i.a./ha con 0,5% de NIS, Agridex) pero también se encontró tolerancia significativa del cultivo (blaqueamiento de menos de 10%) en plantas de soja que comprenden EE-GM3 cuando se trataron con una aplicación post-emergencia de pirasulfotol (35 g i.a./ha con 0,5% de NIS, Agridex), otro herbicida inhibidor de HPPD.

1.2.2 Identificación de las regiones de flaqueo y ADN extraño del evento de élite EE-GM3

La secuencia de las regiones que flanquean el ADN extraño que comprende los genes de tolerancia a herbicida en el evento de élite EE-GM3 se determinó de la manera siguiente:

1.2.2.1. Región de flaqueo derecha (5')

El fragmento identificado que comprende la región de flaqueo 5' se secuenció, y su secuencia nucleotídica se representa en la SEC ID NO: 2. La secuencia entre el nucleótido 1 y 1451 corresponde al ADN vegetal, mientras que la secuencia entre el nucleótido 1452 y 1843 corresponde al ADN extraño.

1.2.2.2. Región de flaqueo izquierda (3')

El fragmento identificado que comprende la región de flaqueo 3' se secuenció, y su secuencia nucleotídica se representa en la SEC ID NO: 3. La secuencia entre el nucleótido 1 y 240 corresponde al ADN extraño, mientras que la secuencia entre el nucleótido 241 y 1408 corresponde al ADN vegetal.

1.2.2.3. ADN extraño que comprende los genes de tolerancia a herbicida de EE-GM3

Usando diferentes técnicas moleculares, se ha determinado que el ADN extraño del evento de élite EE-GM3, que comprende los genes de tolerancia a herbicida, contiene dos secuencias parciales de 3' histonAt en una orientación de cabeza a cabeza, seguidas de 2 copias casi completas del fragmento Sall de pSF10 ordenadas en una orientación de cabeza a cola (véase la Figura 1).

5 El ADN extraño que comprende los genes de tolerancia a herbicida de EE-GM3 contiene de ese modo, en orden, las siguientes secuencias:

- del nucleótido 1 al nucleótido 199: la secuencia nucleotídica que se corresponde con la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 1 del nucleótido 6760 al nucleótido 6958;
- 10 - del nucleótido 200 al nucleótido 624: la secuencia nucleotídica que se corresponde con la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 1 del nucleótido 6874 al nucleótido 7298;
- del nucleótido 625 al nucleótido 7909: la secuencia nucleotídica que se corresponde con la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 1 del nucleótido 7 al nucleótido 7291;
- del nucleótido 7910 al nucleótido 15163: la secuencia nucleotídica que se corresponde con la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 1 del nucleótido 12 al nucleótido 7265; y
- 15 - del nucleótido 15164 al nucleótido 15187: la secuencia nucleotídica que se corresponde con la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 del nucleótido 217 al nucleótido 240 (esta secuencia no se corresponde ni con el ADN del plásmido pSF10 ni con el ADN de la planta silvestre, por lo tanto se designa ADN de relleno).

20 Este ADN extraño es precedido inmediatamente en dirección 5' y contiguo con el ADN extraño por la secuencia de flanqueo 5' de SEC ID NO: 2 del nucleótido 1 al 1451, y es seguido inmediatamente en dirección 3' y contiguo con el ADN extraño por la secuencia de flanqueo 3' de SEC ID NO: 3 del nucleótido 241 al nucleótido 1408.

25 La secuenciación del ADN completo confirmada del ADN extraño y las secuencias de ADN de flanqueo en EE-GM3 dieron como resultado la secuencia dada a conocer en SEC ID NO: 20. En esta secuencia, el ADN insertado va desde la posición nucleotídica 1452 a la posición nucleotídica 16638, y las 2 copias casi completas a partir de pSF10 ordenadas en una orientación de cabeza a cola van desde la posición nucleotídica 2257 hasta la posición nucleotídica 16601. La secuencia de ADN de flanqueo 5' en SEC ID NO: 20 es la secuencia de la posición nucleotídica 1 hasta la posición nucleotídica 1451 en SEC ID NO: 20, y la secuencia de ADN de flanqueo 3' en SEC ID NO: 20 es la secuencia de la posición nucleotídica 16639 hasta la posición nucleotídica 17806 en SEC ID NO: 20.

1.3. Descripción del ADN extraño que comprende los genes quiméricos de la fosfinotricina acetiltransferasa

30 El plásmido pB2/P35SAcK es un vector de clonación derivado de pUC19, el cual contiene un gen quimérico *pat*. Una descripción del vector se da a continuación en la Tabla 2. La secuencia nucleotídica de éste se representa en la SEC ID NO: 11.

Tabla 2 Posiciones nucleotídicas de los constituyentes de pB2/P35SAcK (SEC ID NO: 11)

Posiciones nucleotídicas	Descripción y referencias
461-1003	Promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor
1004-1011	Secuencias sintéticas derivadas del poliligador
1012-1563	Gen <i>pat</i> sintético (secuencia de aminoácidos de <i>Streptomyces viridochromogenes</i>)
1564-1581	Secuencias sintéticas derivadas del poliligador
1582-1784	Terminador 35S del virus del mosaico de la coliflor

1.4. Evento EE-GM1 (ejemplo comparativo)

35 1.4.1 Identificación de EE-GM1

La soja resistente a herbicida se desarrolló mediante la transformación de la soja con el vector pB2/P35SAcK empleando la transferencia génica directa.

40 El evento de élite EE-GM1 se seleccionó basado en un procedimiento de selección exhaustivo basado en una buena expresión y estabilidad del gen de resistencia a herbicida y su compatibilidad con las características agronómicas óptimas.

1.4.2 Identificación de las regiones de flanqueo y del ADN extraño del evento de élite EE-GM1

1.4.2.1. Región de flanqueo derecha (5')

El fragmento identificado que comprende la región de flanqueo 5' se secuenció, y su secuencia nucleotídica se representa en la SEC ID NO: 12. La secuencia entre el nucleótido 1 y 209 corresponde al ADN vegetal, mientras que la secuencia entre el nucleótido 210 y 720 corresponde al ADN extraño.

5 1.4.2.2. Región de flanqueo izquierda (3')

El fragmento identificado que comprende la región de flanqueo 3' se secuenció, y su secuencia nucleotídica se representa en la SEC ID NO: 13. La secuencia entre el nucleótido 1 y 568 corresponde al ADN extraño, mientras que la secuencia entre el nucleótido 569 y el 1000 corresponde al ADN vegetal.

1.4.2.3. ADN extraño que comprende los genes de tolerancia a herbicida de EE-GM1

10 Usando diferentes técnicas moleculares se ha determinado que el ADN extraño del evento de élite EE-GM1, que comprende el gen de tolerancia a herbicida, comprende dos copias del gen quimérico pat en una estructura repetitiva directa (véase la Figura 3).

El ADN extraño que comprende los genes de tolerancia a herbicida de EE-GM1 contiene de ese modo, en orden, las siguientes secuencias:

- 15 - del nucleótido 1 al nucleótido 3122: la secuencia nucleotídica que corresponde a la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 11 del nucleótido 340 al nucleótido 3461;
- del nucleótido 3123 al nucleótido 3458: la secuencia nucleotídica que corresponde a la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 11 del nucleótido 1 al nucleótido 336;
- 20 - del nucleótido 3459 al nucleótido 4073: la secuencia nucleotídica que corresponde a la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 11 del nucleótido 3462 al nucleótido 4076; y
- del nucleótido 4074 al nucleótido 6780: la secuencia nucleotídica que corresponde a la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 11 del nucleótido 337 al nucleótido 3043; y
- del nucleótido 6781 al nucleótido 6790: la secuencia nucleotídica que corresponde a la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 13 del nucleótido 559 al nucleótido 568 (esta secuencia no corresponde al ADN plasmídico o al ADN vegetal silvestre, y por lo tanto se designa como ADN de relleno).
- 25

Este ADN extraño de EE-GM1 va precedido inmediatamente en dirección 5' y contiguo con el ADN extraño en la secuencia de flanqueo 5' de SEC ID NO: 12 del nucleótido 1 al 209, y es seguido inmediatamente en dirección 3' y contiguo con el ADN extraño en la secuencia de flanqueo 3' de SEC ID NO: 13 del nucleótido 569 al nucleótido 1000.

30 1.5. Evento EE-GM2

La soja resistente a herbicida se desarrolló por transformación de la soja con el vector pB2/P35SAcK empleando una transferencia génica directa.

35 El evento de élite EE-GM2 se seleccionó basado en un procedimiento de selección exhaustivo basado en una buena expresión y estabilidad del gen de resistencia a herbicida y su compatibilidad con las características agronómicas óptimas.

1.5.1. Identificación de las regiones de flanqueo y ADN extraño del evento de élite EE-GM2

1.5.1.1. Región de flanqueo derecha (5')

40 El fragmento identificado que comprende la región de flanqueo 5' se secuenció, y su secuencia nucleotídica se representa en la SEC ID NO: 14. La secuencia entre el nucleótido 1 y 311 corresponde al ADN vegetal, mientras que la secuencia entre el nucleótido 312 y 810 corresponde al ADN extraño.

1.5.1.2. Región de flanqueo izquierda (3')

El fragmento identificado que comprende la región de flanqueo 3' se secuenció, y su secuencia nucleotídica se representa en la SEC ID NO: 15. La secuencia entre el nucleótido 1 y 507 corresponde al ADN extraño, mientras que la secuencia entre el nucleótido 508 y 1880 corresponde al ADN vegetal.

45 1.5.1.3. ADN extraño que comprende los genes de tolerancia a herbicida de EE-GM2

Usando diferentes técnicas moleculares, se ha determinado que el ADN extraño del evento de élite EE-GM2, que comprende el gen de tolerancia a herbicida, comprende una copia del gen quimérico pat (véase la Figura 4).

El ADN extraño que comprende los genes de tolerancia a herbicida de EE-GM2 contiene de este modo, en orden, las siguientes secuencias:

- del nucleótido 1 al nucleótido 391: la secuencia nucleotídica que corresponde a la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 11 del nucleótido 3458 al nucleótido 3848; y
- 5 - del nucleótido 392 al nucleótido 3436: la secuencia nucleotídica que corresponde a la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 11 del nucleótido 413 al nucleótido 3457.

10 Este ADN extraño de EE-GM2 va precedido inmediatamente en dirección 5' y contiguo con el ADN extraño en la secuencia de flaqueo 5' de SEC ID NO: 14 del nucleótido 1 al 311, y es seguido inmediatamente en dirección 3' y contiguo con el ADN extraño en la secuencia de flaqueo 3' de SEC ID NO: 15 del nucleótido 508 al nucleótido 1880.

2. Desarrollo de los protocolos de identificación por la reacción en cadena de la polimerasa para EE-GM3.

2.1. Cebadores

Se desarrollaron cebadores específicos, los cuales reconocen las secuencias dentro del evento de élite.

15 Se desarrolló un cebador, el cual reconoce una secuencia dentro de la región de flaqueo 3' de EE-GM3. Un segundo cebador se seleccionó después dentro de la secuencia del ADN extraño, de manera que los cebadores se extienden una secuencia de aproximadamente 263 nucleótidos. Se encontró que los siguientes cebadores dan resultados particularmente claros y reproducibles en una reacción de PCR en ADN de EE-GM3:

SOY028: 5'-ATC.gCT.TTA.ACg.TCC.CTC.Ag-3' (SEQ ID No.: 4) (diana: ADN de inserto)

SOY029: 5'-CAA.ggC.CTC.gAg.ATT.ATC-3' (SEQ ID No.: 5) (diana: ADN vegetal)

20 Los cebadores dirigidos a una secuencia endógena se incluyen preferentemente en el cóctel de PCR. Estos cebadores sirven como un control interno en muestras desconocidas y en el control positivo del ADN. Un resultado positivo con el par de cebadores endógenos (presencia de un fragmento de 413 pb amplificado por PCR) demuestra que existe abundante ADN, de calidad adecuada, en la preparación de ADN genómico para que se genere el producto de PCR. Los cebadores endógenos se seleccionaron para reconocer el gen de la actina endógeno de soja:

25 SOY01 5'-gTC.AgC.CAC.ACA.gTg.CCT.AT -3' (SEC ID NO: 9)

SOY02 5'-gTT.ACC.gTA.CAg.gTC.TTT.CC -3' (SEC ID NO: 10)

2.2. Fragmentos amplificados

Los fragmentos amplificados esperados en la reacción de PCR son:

Para el par de cebadores SOY01-SOY02 413 pb (control endógeno)

30 Para el par de cebadores SOY028 -SOY029 263 pb (evento de élite EE-GM3)

2.3. ADN molde

35 El ADN molde se preparó a partir de una perforación de hojas de acuerdo con Edwards et al. (Nucleic Acid Research, 19, p. 1349, 1991). Cuando se usa ADN preparado con otros métodos, se debe realizar un experimento de prueba utilizando cantidades diferentes de molde. En general, 50 ng del ADN genómico molde producen los mejores resultados.

2.4. Controles positivos y negativos asignados

Para evitar falsos positivos o negativos, se determinó que los siguientes controles positivos y negativos deben incluirse en un experimento de PCR:

- 40 - Control de Mezcla Maestra (control negativo de ADN). Este es una PCR en la cual no se añade ADN a la reacción. Cuando se observa el resultado esperado, sin productos de PCR, esto indica que el cóctel de PCR no estaba contaminado con el ADN diana.
- Un control positivo de ADN (muestra de ADN genómico que se sabe que contiene las secuencias transgénicas). La amplificación exitosa de este control positivo demuestra que la PCR se realizó bajo las condiciones que permiten la amplificación de las secuencias diana.
- 45 - Un control de ADN silvestre. Este es una PCR en la cual el ADN molde proporcionado es un ADN genómico preparado a partir de una planta no transgénica. Cuando se observa el resultado esperado, sin amplificación

de un producto de la PCR transgénico pero con amplificación de un producto de la PCR endógeno, esto indica que no existe amplificación de fondo detectable del transgén en una muestra de ADN genómico.

2.5. Condiciones de PCR

5 Los resultados óptimos se obtuvieron bajo las siguientes condiciones (Al describir las diversas condiciones para resultados óptimos se quieren proporcionar ejemplos de tales condiciones. Claramente, un experto en la técnica puede variar las condiciones, reactivos y parámetros, tales como el uso de otras Taq polimerasas, y alcanzar resultados deseables):

- la mezcla de PCR para reacciones de 25 µl contiene:

	20 ng	ADN molde
10	2,5 µl	amortiguador de amplificación 10x (suministrado por el fabricante con la Taq polimerasa)
	0,5 µl	10 mM de dNTP
	0,4 µl	SOY01 (10 pmoles/µl)
	0,4 µl	SOY02 (10 pmoles/µl)
	0,7 µl	SOY028 (10 pmoles/µl)
15	0,7 µl	SOY029 (10 pmoles/µl)
	0,1 µl	Taq ADN polimerasa (5 unidades/µl)
	agua hasta 25 µl	

- el perfil de termociclaje que se sigue para los resultados óptimos es el siguiente:

		4 min. a 95°C
	Seguido de:	1 min. a 95°C
		1 min. a 57°C
		2 min. a 72°C
		Durante 5 ciclos
	Seguido de:	30 s a 92°C
		30 s a 57°C
		1 min. a 72°C
		Durante 25 ciclos
	Seguido de:	10 minutos a 72°C

2.6. Análisis del gel de agarosa

20 Para visualizar óptimamente los resultados de la PCR se determinó que se deben aplicar entre 10 y 20 µl de las muestras de PCR sobre un gel de agarosa al 1,5% (amortiguador de Tris-borato) con un marcador de peso molecular apropiado (por ejemplo marcador de 100 pb Pharmacia).

2.7. Validación de los resultados

25 Se determinó que los datos de las muestras de ADN de la planta transgénica dentro de un único experimento de PCR y un único cóctel de PCR no se deberían de aceptar a menos que 1) el control positivo de ADN muestre los productos de PCR esperados (fragmentos endógenos y transgénicos), 2) el control negativo de ADN sea negativo para la amplificación por PCR (sin fragmentos), y 3) el control de ADN silvestre muestre el resultado esperado (amplificación del fragmento endógeno).

30 Cuando se sigue el protocolo de identificación por PCR para EE-GM3, como se describió anteriormente, las líneas que muestran cantidades visibles de productos de PCR transgénicos y endógenos de los tamaños esperados indican que la planta correspondiente de la que se preparó el ADN genómico molde ha heredado el evento de élite EE-GM3. Las líneas que no muestran cantidades visibles de cualquiera de los productos transgénicos de PCR y que

muestran cantidades visibles de los productos endógenos de PCR indican que la planta correspondiente de la que se preparó el ADN genómico molde no comprende el evento de élite. Las líneas que no muestran cantidades visibles de los productos endógenos y transgénicos indican que la calidad y/o la cantidad del ADN genómico no permitió que se genere un producto de PCR. Estas plantas no se pueden puntuar. La preparación del ADN genómico se debe repetir, y se tiene que realizar un nuevo experimento de PCR con los controles apropiados.

2.8. Uso de un protocolo de PCR de discriminación para identificar EE-GM3

Antes de intentar identificar desconocidos, se realizó un experimento de ensayo, con todos los controles apropiados. El protocolo desarrollado puede requerir la optimización de componentes que pueden diferir entre los laboratorios (preparación del ADN molde, Taq ADN polimerasa, calidad de los cebadores, dNTP, termociclador, etc.).

La amplificación de la secuencia endógena juega un papel clave en el protocolo. Se tienen que alcanzar condiciones de termociclaje y PCR que amplifiquen cantidades equimolares de tanto la secuencia endógena como transgénica en un molde de ADN genómico transgénico conocido. Cada vez que el fragmento endógeno especificado no se amplifica, o cada vez que las secuencias especificadas no se amplifican con las mismas intensidades de tinción con bromuro de etidio, según se considera por la electroforesis en gel de agarosa, se puede requerir la optimización de las condiciones de la PCR.

El material de hojas de un número de plantas de soja, algunas de las que contienen EE-GM3, se ensayaron de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente. Las muestras del evento de élite EE-GM3 y de soja silvestre se tomaron como controles positivo y negativo, respectivamente.

La Figura 2 ilustra el resultado obtenido con el protocolo de identificación por PCR del evento de élite para EE-GM3 en un número de muestras de plantas de soja. Se encontró que las muestras en las líneas 2 y 3 contienen el evento de élite EE-GM3 conforme se detecta la banda de 263 pb, mientras que las muestras en las líneas 4 a 8 no comprenden EE-GM3. Las líneas 6 y 7 comprenden muestras de otros eventos de transformación de soja obtenidos usando los mismos genes quiméricos de tolerancia a herbicida; la línea 8 contiene el ADN de plantas de soja silvestre, y la línea 9 representa la muestra del control negativo (agua), las líneas 1 y 10 representan el marcador de peso molecular (marcador de 100 pb).

2.9. Ensayo de dPCR para la detección de EE-GM3 en semillas abultadas

Se establece un ensayo de PCR discriminante (dPCR) para detectar la presencia de niveles bajos de EE-GM3 en semillas abultadas. Se detectó exitosamente bajo condiciones repetibles un nivel mínimo de 0,4% (p/p) de semillas transgénicas en un volumen de semillas no transgénicas. Por tanto, se determinó que el Límite de Detección es 0,4% (p/p).

Se aplicaron los siguientes cebadores en esta reacción de PCR diana:

Cebador directo dirigido a la secuencia de T-ADN:

SHA130 5' - CTA.TAT.TCT.ggT.TCC.AAT.TTA.TC -3' (SEC ID NO: 12)

Cebador inverso dirigido a la secuencia de flanqueo 3'

SMP178 5' - TgA.ggC.ACg.TAT.TgA.TgA.CC - 3' (SEC ID NO: 13)

El fragmento amplificado esperado en la reacción de PCR a partir de estos cebadores es de 115 pb.

La reacción de PCR diana se realiza sobre aproximadamente 200 ng de ADN molde preparado de semillas abultadas molidas de acuerdo con un kit de extracción y purificación de ADN Genra Puregene modificado (Qiagen). Cuando se usa el ADN preparado con otros métodos, se debe realizar un experimento de ensayo usando muestras con niveles relativos conocidos de EE-GM3.

Una reacción de PCR del sistema de referencia validado, que se dirige a una secuencia endógena, se debe realizar idealmente en un experimento de PCR separado para verificar la conveniencia de la muestra de ADN para el análisis de PCR, para evitar resultados falsos negativos.

Para muestras de ensayo desconocidas, el experimento de PCR debe incluir idealmente las muestras de control apropiadas positiva y negativa, es decir:

- Control de Mezcla Maestra (control negativo de ADN). Este es una PCR en la cual no se añade ADN a la reacción. Cuando se observa el resultado esperado (sin productos de PCR) tanto para la reacción diana como del sistema de referencia, esto indica que el cóctel de PCR no estaba contaminado con el ADN diana.
- Un control positivo de ADN (muestra de ADN genómico que se sabe que contiene las secuencias transgénicas). La amplificación exitosa de este control positivo demuestra que la PCR se realizó bajo las condiciones que permiten la amplificación de las secuencias diana.

- En esta PCR también se puede añadir un control de ADN silvestre. Este es una PCR en la cual el ADN molde proporcionado es un ADN genómico preparado a partir de una planta no transgénica. Cuando se observa el resultado esperado, sin amplificación de un producto de la PCR transgénico pero con amplificación de un producto de la PCR endógeno, esto indica que no existe amplificación de fondo detectable del transgén en una muestra de ADN genómico.

Los resultados óptimos se obtienen bajo las siguientes condiciones:

- la mezcla de PCR para reacciones de 25 µl contiene:

200 ng de ADN molde

5 µl de amortiguador de reacción 5x

0,25 µl de dNTP 20 mM

0,7 µl de SHA130 (10 pmoles/l)

0,4 µl de SMP178 (10 pmoles/l)

0,1 µl de GO-taq ADN polimerasa (5 unidades/l)

Añádase agua hasta 25 µl

- el perfil de termociclaje que se sigue para resultados óptimos es el siguiente:

4 min. a 95°C

Seguido de:

1 min. a 95°C

1 min. a 57°C

2 min. a 72°C

Durante 5 ciclos

Seguido de:

30 s a 92°C

30 s a 57°C

1 min. a 72°C

Durante 30 ciclos

Seguido de:

10 minutos a 72°C

Para visualizar óptimamente los resultados de la PCR, se determinó que se deberían aplicar 25 µl del producto de la PCR sobre un gel de agarosa al 1,5% (amortiguador Tris-borato) con un marcador de peso molecular apropiado (por ejemplo marcador de 50 pb).

Cuando se sigue el método de PCR como se describió anteriormente, las líneas que muestran cantidades visibles de los productos de PCR diana y del sistema de referencia de los tamaños esperados indican que la muestra de ensayo de la que se preparó el ADN genómico molde contuvo los niveles de evento de élite EE-GM3 por encima del límite de detección de la reacción diana.

Las líneas que no muestran cantidades visibles de los productos de PCR diana pero que muestran cantidades visibles del producto de PCR del sistema de referencia indican que la muestra de ensayo de la que se preparó el ADN genómico molde contuvo niveles del evento de élite EE-GM3 por debajo del límite de detección de la reacción diana.

Las líneas que no muestran cantidades visibles de los productos endógenos y transgénicos de la PCR indican que la calidad y/o cantidad del ADN genómico no permitió que se genere un producto de PCR.

Estas plantas no se pueden puntuar. La preparación del ADN genómico se debe repetir, y se ha de realizar un nuevo experimento de PCR, con los controles apropiados.

3. Uso de un fragmento de integración específico como una sonda para la detección del material que comprende EE-GM3.

Se obtiene un fragmento de integración específico de EE-GM3 por amplificación mediante PCR usando cebadores específicos SOY028 (SEC ID NO: 4) y SOY029 (SEC ID NO: 5) que producen un amplicón con la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 8, o mediante síntesis química, y se marca. Este fragmento de integración se usa como una sonda específica para la detección de EE-GM3 en muestras biológicas. El ácido nucleico se extrae de las muestras de acuerdo con los procedimientos estándares. Este ácido nucleico se pone en contacto después con la sonda específica bajo condiciones de hibridación que se optimizan para permitir la formación de un híbrido. La formación del híbrido se detecta después para indicar la presencia del ácido nucleico EE-GM3 en la muestra. Opcionalmente, el ácido nucleico en las muestras se amplifica usando los cebadores específicos antes de contactar con la sonda específica. Como alternativa, el ácido nucleico se marca antes de contactar con la sonda específica en lugar del fragmento de integración. Opcionalmente, la sonda específica se adjunta a un vehículo sólido (tal como, pero sin limitarse a, un filtro, tira o perlas) antes de contactar con las muestras.

4. Protocolo de identificación por reacción en cadena de la polimerasa para EE-GM1 (ejemplo comparativo)

4.1. Cebadores

Se desarrollaron cebadores específicos que reconocen secuencias dentro del evento de élite. Más particularmente, se desarrolló un cebador que reconoce una secuencia dentro de la región de flanqueo 5' de EE-GM1. Un segundo cebador se seleccionó después dentro de la secuencia del ADN extraño de manera que los cebadores abarcan una secuencia de aproximadamente 183 nucleótidos. Se encontró que los siguientes cebadores dan resultados particularmente claros y reproducibles en una reacción de PCR sobre el ADN de EE-GM1:

SOY06: 5'- ggC.gTT.CgT.AgT.gAC.TgA.gg -3' (SEC ID NO: 16)
(diana: ADN vegetal)

SOY07: 5'-gTT.TTA.CAA.CgT.CgT.gAC.Tgg-3' (diana: ADN vegetal) (SEC ID NO: 17)

Los cebadores dirigidos a una secuencia endógena están incluidos preferiblemente en el cóctel de PCR. Estos cebadores sirven como un control interno en muestras desconocidas y en el control positivo del ADN. Un resultado positivo con el par de cebadores endógenos demuestra que existe abundante ADN de calidad adecuada en la preparación de ADN genómico para que se genere un producto de PCR. Los cebadores endógenos se seleccionaron para reconocer un gen constitutivo en *Glycine max*:

SOY01: 5'-gTC.AgC.CAC.ACA.gTg.CCT.AT-3' (SEC ID NO: 9)
(ubicado en el gen de actina 1 de *Glycine max* (Acceso J01298))

SOY02: 5'-gTT.ACC.gTA.CAg.gTC.TTT.CC-3' (SEC ID NO: 10)
(ubicado en el gen de actina 1 de *Glycine max* (Acceso J01298))

4.2. Fragmentos amplificados

Los fragmentos amplificados esperados en la reacción de PCR son:

Para el par de cebadores SOY01-SOY02: 413 pb (control endógeno)

Para el par de cebadores SOY06-SOY07: 183 pb (Evento de élite EE-GM1)

4.3. ADN molde

El ADN molde se preparó de una perforación de hojas de acuerdo con Edwards et al. (Nucleic Acid Research, 19, p. 1349, 1991). Cuando se usa el ADN preparado con otros métodos, se debe realizar un experimento de ensayo utilizando cantidades diferentes de molde. Por lo general, 50 ng del ADN genómico molde producen los mejores resultados.

4.4. Controles asignados positivo y negativo

Para evitar falsos positivos o negativos, se determinó que los siguientes controles positivos y negativos se deben incluir en un experimento de PCR:

- Control de Mezcla Maestra (control negativo de ADN). Este es una PCR en la cual no se añade ADN a la reacción. Cuando se observa el resultado esperado, sin productos de PCR, esto indica que el cóctel de PCR no estaba contaminado con el ADN diana.

- Un control positivo de ADN (muestra de ADN genómico que se sabe que contiene las secuencias transgénicas). La amplificación exitosa de este control positivo demuestra que la PCR se realizó bajo las condiciones que permiten la amplificación de las secuencias diana.
- 5 - Un control de ADN silvestre. Este es una PCR en la cual el ADN molde proporcionado es un ADN genómico preparado a partir de una planta no transgénica. Cuando se observa el resultado esperado, sin amplificación de un producto de la PCR transgénico pero con amplificación de un producto de la PCR endógeno, esto indica que no existe amplificación de fondo detectable del transgén en una muestra de ADN genómico.

4.5. Condiciones de PCR

Los resultados óptimos se obtuvieron bajo las siguientes condiciones:

- 10 - la mezcla de PCR para reacciones de 25 µl contiene:

2,5 µl de ADN molde

2,5 µl de amortiguador de amplificación 10x (suministrado con Taq polimerasa)

0,5 µl dNTP 10 mM

0,5 µl SOY06 (10 pmoles/µl)

0,5 µl SOY07 (10 pmoles/µl)

0,25 µl SOY01 (10 pmoles/µl)

0,25 µl SOY02 (10 pmoles/µl)

0,1 µl Taq ADN polimerasa (5 unidades/µl)

agua hasta 25 µl

- el perfil de termociclaje que se sigue para resultados óptimos es el siguiente:

	4 min. a 95°C
Seguido de:	1 min. a 95°C
	1 min. a 57°C
	2 min. a 72°C
	Durante 5 ciclos
Seguido de:	30 s a 92°C
	30 s a 57°C
	1 min. a 72°C
	Durante 25 ciclos
Seguido de:	5 minutos a 72°C

4.6. Análisis del gel de agarosa

- 15 Para visualizar óptimamente los resultados de la PCR, se determinó que se deben aplicar entre 10 y 20 µl de las muestras de PCR sobre un gel de agarosa al 1,5% (amortiguador Tris-borato) con un marcador de peso molecular apropiado (por ejemplo marcador de 100 pb Pharmacia).

4.7. Validación de los resultados

- 20 Se determinó que los datos a partir de las muestras de ADN de plantas transgénicas en un único experimento de PCR y un único cóctel de PCR no se deben aceptar a menos que 1) el control positivo de ADN muestre los productos de PCR esperados (fragmentos transgénicos y endógenos), 2) el control negativo de ADN sea negativo para la amplificación por PCR (ausencia de fragmentos), y 3) el control de ADN silvestre muestre el resultado esperado (amplificación del fragmento endógeno).

Cuando se sigue el protocolo de identificación por PCR para EE-GM1 como se describió anteriormente, las líneas que muestran cantidades visibles de los productos de PCR endógeno y transgénico de los tamaños esperados

indican que la planta correspondiente de la cual se preparó el ADN genómico molde heredó el evento de élite EE-GM1. Las líneas que no muestran cantidades visibles ya sea de cualquier producto de PCR transgénico y que muestran cantidades visibles del producto de PCR endógeno indican que la planta correspondiente de la cual se preparó el ADN genómico molde no comprende el evento de élite. Las líneas que no muestran cantidades visibles de los productos de PCR endógenos y transgénicos indican que la calidad y/o cantidad del ADN genómico no dejó que se generara un producto de PCR. Estas plantas no se pudieron puntuar. La preparación del ADN genómico se debe repetir, y se debe realizar un nuevo experimento de PCR, con los controles apropiados.

4.8. Uso de un protocolo de PCR de discriminación para identificar EE-GM1 (ejemplo comparativo)

Antes de intentar identificar desconocidos, se ha de realizar un experimento de ensayo, con todos los controles apropiados. El protocolo desarrollado puede requerir la optimización de componentes que pueden diferir entre los laboratorios (preparación del ADN molde, Taq ADN polimerasa, calidad de los cebadores, dNTP, termociclador, etc.).

La amplificación de la secuencia endógena juega un papel clave en el protocolo. Se tienen que alcanzar condiciones de termociclaje y PCR que amplifiquen cantidades equimolares de tanto la secuencia endógena como transgénica en un molde de ADN genómico transgénico conocido. Cada vez que el fragmento endógeno especificado no se amplifica, o cada vez que las secuencias especificadas no se amplifican con las mismas intensidades de tinción con bromuro de etidio, según se considera por la electroforesis en gel de agarosa, se puede requerir la optimización de las condiciones de la PCR.

El material de hoja de *Glycine max* de una serie de plantas, algunas de las cuales comprenden EE-GM1, se ensayaron de acuerdo al protocolo que se describió anteriormente. Las muestras del evento de élite EE-GM1 y de *Glycine max* silvestre se tomaron como controles positivo y negativo, respectivamente.

La Figura 5 ilustra el resultado obtenido con el protocolo de identificación por PCR del evento de élite para EE-GM1 en una serie de muestras de planta de soja (líneas 1 a 14). Se encontró que las muestras en la línea 1 contienen el evento de élite conforme se detecta la banda de 185 pb, mientras que las muestras en las líneas 2, 3 y 4 no contienen EE-GM1. La línea 2 contiene otro evento de élite de soja, la línea 3 representa un control de *Glycine max* no transgénico, la línea 4 representa la muestra de control negativo (agua), y la línea 5 representa el marcador de peso molecular (100 pb).

5. Uso de un fragmento de integración específico como una sonda para la detección del material que comprende EE-GM1 (ejemplo comparativo).

Se obtiene un fragmento de integración específico de EE-GM1 mediante la amplificación por PCR usando cebadores específicos SOY06 (SEC ID NO: 16) y SOY07 (SEC ID NO: 17), o mediante síntesis química, y se marca. Este fragmento de integración se usa como una sonda específica para la detección de EE-GM1 en muestras biológicas. El ácido nucleico se extrae de las muestras de acuerdo con los procedimientos estándares. Este ácido nucleico se pone en contacto después con la sonda específica bajo condiciones de hibridación, que se optimizan para permitir la formación de un híbrido. La formación del híbrido se detecta después para indicar la presencia de ácido nucleico EE-GM1 en la muestra. Opcionalmente, el ácido nucleico en las muestras se amplifica usando los cebadores específicos antes del contacto con la sonda específica. Como alternativa, en lugar del fragmento de integración, el ácido nucleico se marca antes del contacto con la sonda específica. Opcionalmente, la sonda específica se une a un vehículo sólido (tal como, pero no se limita a, un filtro, tira o perlas), antes del contacto con las muestras.

6. Protocolo de identificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa para EE-GM2.

6.1. Cebadores

Se desarrollaron cebadores específicos que reconocen secuencias dentro del evento de élite. Más particularmente, se desarrolló un cebador el cual reconoce una secuencia dentro de la región de flaqueo 3' de EE-GM2. Un segundo cebador se seleccionó después dentro de la secuencia del ADN extraño de manera que los cebadores abarcan una secuencia de aproximadamente 150 nucleótidos. Se encontró que los siguientes cebadores dan resultados particularmente claros y reproducibles en una reacción de PCR en ADN de EE-GM2:

SOY09: 5'- TgT.ggT.TAT.ggC.ggT.gCC.ATC -3' (SEC ID NO: 18)
(diana: ADN vegetal)

SOY010: 5'-TgC.TAC.Agg.CAT.CgT.ggT.gTC-3' (SEC ID NO: 19)
(diana: ADN vegetal)

Los cebadores que se dirigen a una secuencia endógena se incluyen preferentemente en el cóctel de la PCR. Estos cebadores sirven como un control interno en muestras desconocidas y en el control positivo del ADN. Un resultado

positivo con el par de cebadores endógenos demuestra que existe abundante ADN de calidad adecuada en la preparación de ADN genómico para que se genere un producto de PCR. Los cebadores endógenos se seleccionaron para reconocer un gen constitutivo de *Glycine max*:

SOY01: 5'-gTC.AgC.CAC.ACA.gTg.CCT.AT-3' (SEC ID NO: 9)
(ubicado en el gen de actina 1 de *Glycine max* (Acceso J01298))

SOY02: 5'-gTT.ACC.gTA.CAg.gTC.TTT.CC-3' (SEC ID NO: 10)
(ubicado en el gen de actina 1 de *Glycine max* (Acceso J01298))

6.2. Fragmentos amplificados

5 Los fragmentos amplificados esperados en la reacción de PCR son:

Para el par de cebadores SOY01-SOY02: 413 pb (control endógeno)

Para el par de cebadores SOY09-SOY010: 151 pb (Evento de élite EE-GM2)

6.3. ADN molde

10 El ADN molde se preparó de una perforación de hojas de acuerdo con Edwards et al. (Nucleic Acid Research, 19, p. 1349, 1991). Cuando se usa el ADN preparado con otros métodos, se debe realizar un experimento de ensayo utilizando cantidades diferentes de molde. Por lo general, 50 ng del ADN genómico molde producen los mejores resultados.

6.4. Controles asignados positivo y negativo

Para evitar falsos positivos o negativos, se determinó que los siguientes controles positivos y negativos se deben incluir en un experimento de PCR:

- 15 - Control de Mezcla Maestra (control negativo de ADN). Este es una PCR en la cual no se añade ADN a la reacción. Cuando se observa el resultado esperado, sin productos de PCR, esto indica que el cóctel de PCR no estaba contaminado con el ADN diana.
- Un control positivo de ADN (muestra de ADN genómico que se sabe que contiene las secuencias transgénicas). La amplificación exitosa de este control positivo demuestra que la PCR se realizó bajo las condiciones que permiten la amplificación de las secuencias diana.
- 20 - Un control de ADN silvestre. Este es una PCR en la cual el ADN molde proporcionado es un ADN genómico preparado a partir de una planta no transgénica. Cuando se observa el resultado esperado, sin amplificación de un producto de la PCR transgénico pero con amplificación de un producto de la PCR endógeno, esto indica que no existe amplificación de fondo detectable del transgén en una muestra de ADN genómico.

6.5. Condiciones de PCR

25 Los resultados óptimos se obtuvieron bajo las siguientes condiciones:

- la mezcla de PCR para reacciones de 25 µl contiene:

2,5 µl de ADN molde

2,5 µl de amortiguador de amplificación 10x (suministrado con Taq polimerasa)

0,5 µl de dNTP 10 mM

0,5 µl de SOY09 (10 pmoles/µl)

0,5 µl de SOY10 (10 pmoles/µl)

0,25 µl de SOY01 (10 pmoles/µl)

0,25 µl de SOY02 (10 pmoles/µl)

0,1 µl de Taq ADN polimerasa (5 unidades/µl)

agua hasta 25 µl

- el perfil de termociclaje que se sigue para resultados óptimos es el siguiente:

	4 min. a 95°C
Seguido de:	1 min. a 95°C
	1 min. a 57°C
	2 min. a 72°C
	Durante 5 ciclos
Seguido de:	30 s a 92°C
	30 s a 57°C
	1 min. a 72°C
	Durante 25 ciclos
Seguido de:	5 minutos a 72°C

6.6. Análisis del gel de agarosa

5 Para visualizar óptimamente los resultados de la PCR, se determinó que se deben aplicar entre 10 y 20 µl de las muestras de PCR sobre un gel de agarosa al 1,5% (amortiguador Tris-borato) con un marcador de peso molecular apropiado (por ejemplo marcador de 100 pb Pharmacia).

6.7. Validación de los resultados

10 Se determinó que los datos a partir de las muestras de ADN de plantas transgénicas en un único experimento de PCR y un único cóctel de PCR no se deben aceptar a menos que 1) el control positivo de ADN muestre los productos de PCR esperados (fragmentos transgénicos y endógenos), 2) el control negativo de ADN sea negativo para la amplificación por PCR (ausencia de fragmentos), y 3) el control de ADN silvestre muestre el resultado esperado (amplificación del fragmento endógeno).

15 Cuando se sigue el protocolo de identificación por PCR para EE-GM2 como se describió anteriormente, las líneas que muestran cantidades visibles de los productos de PCR endógeno y transgénico de los tamaños esperados indican que la planta correspondiente de la cual se preparó el ADN genómico molde heredó el evento de élite EE-GM2. Las líneas que no muestran cantidades visibles ya sea de cualquier producto de PCR transgénico y que muestran cantidades visibles del producto de PCR endógeno indican que la planta correspondiente de la cual se preparó el ADN genómico molde no comprende el evento de élite. Las líneas que no muestran cantidades visibles de los productos de PCR endógenos y transgénicos indican que la calidad y/o cantidad del ADN genómico no dejó que se generara un producto de PCR. Estas plantas no se pudieron puntuar. La preparación del ADN genómico se debe repetir, y se debe realizar un nuevo experimento de PCR, con los controles apropiados.

6.8. Uso de un protocolo de PCR de discriminación para identificar EE-GM2

25 Antes de intentar identificar desconocidos, se ha de realizar un experimento de ensayo, con todos los controles apropiados. El protocolo desarrollado puede requerir la optimización de componentes que pueden diferir entre los laboratorios (preparación del ADN molde, Taq ADN polimerasa, calidad de los cebadores, dNTP, termociclador, etc.).

30 La amplificación de la secuencia endógena juega un papel clave en el protocolo. Se tienen que alcanzar condiciones de termociclaje y PCR que amplifiquen cantidades equimolares de tanto la secuencia endógena como transgénica en un molde de ADN genómico transgénico conocido. Cada vez que el fragmento endógeno especificado no se amplifica, o cada vez que las secuencias especificadas no se amplifican con las mismas intensidades de tinción con bromuro de etidio, según se considera por la electroforesis en gel de agarosa, se puede requerir la optimización de las condiciones de la PCR.

El material de hoja de *Glycine max* de una serie de plantas, algunas de las cuales comprenden EE-GM2, se ensayaron de acuerdo al protocolo que se describió anteriormente. Las muestras del evento de élite EE-GM2 y de *Glycine max* silvestre se tomaron como controles positivo y negativo, respectivamente.

35 La Figura 6 ilustra el resultado obtenido con el protocolo de identificación por PCR del evento de élite para EE-GM2 en una serie de muestras de planta de soja (líneas 1 a 14). Se encontró que las muestras en la línea 1 contienen el evento de élite conforme se detecta la banda de 185 pb, mientras que las muestras en las líneas 2, 3 y 4 no contienen EE-GM2. La línea 2 contiene otro evento de élite de soja, la línea 3 representa un control de *Glycine max*

no transgénico, la línea 4 representa la muestra de control negativo (agua), y la línea 5 representa el marcador de peso molecular (100 pb).

7. Uso de un fragmento de integración específico como una sonda para la detección del material que comprende EE-GM2.

5 Se obtiene un fragmento de integración específico de EE-GM2 mediante la amplificación por PCR usando cebadores específicos SOY09 (SEC ID NO: 18) y SOY010 (SEC ID NO: 19), o mediante síntesis química, y se marca. Este fragmento de integración se usa como una sonda específica para la detección de EE-GM2 en muestras biológicas. El ácido nucleico se extrae de las muestras de acuerdo con los procedimientos estándares.

10 Este ácido nucleico se pone en contacto después con la sonda específica bajo condiciones de hibridación, que se optimizan para permitir la formación de un híbrido. La formación del híbrido se detecta después para indicar la presencia de ácido nucleico EE-GM2 en la muestra. Opcionalmente, el ácido nucleico en las muestras se amplifica usando los cebadores específicos antes del contacto con la sonda específica. Como alternativa, en lugar del fragmento de integración, el ácido nucleico se marca antes del contacto con la sonda específica. Opcionalmente, la sonda específica se une a un vehículo sólido (tal como, pero no se limita a, un filtro, tira o perlas), antes del contacto con las muestras.

8. Generación de plantas de soja que comprenden EE-GM3 y EE-GM1 (ejemplo comparativo) o EE-GM3 y EE-GM2, y evaluación del comportamiento agronómico de las plantas de ese tipo.

20 Se obtuvo una planta de soja que contiene una combinación de los eventos de élite EE-GM3 y EE-GM1 por el cruzamiento convencional entre una planta de soja parental que comprende EE-GM3 y una planta de soja parental que comprende EE-GM1. Las plantas de la progenie que comprenden ambos eventos se identifican usando los protocolos de identificación por PCR para EE-GM1 y EE-GM3 como se describe en este documento. Específicamente, los cruzamientos se realizaron con plantas que contienen EE-GM3 y varias líneas de EE-GM1. Las plantas F1 resultantes se cultivaron y rociaron con glifosato y glufosinato. Las semillas F2 se cosecharon de plantas F1 y se plantaron (las plantas F2 no se rociaron). Se retiraron las plantas únicamente F2. Filas de plantas F2:F3 se cultivaron y rociaron con glifosato y glufosinato. Las filas homocigóticas para ambas EE-GM3 y EE-GM1 se identificaron y posteriormente se cosecharon. Los datos de segregación de este ensayo mostraron una segregación Mendeliana esperada de los eventos.

30 Una planta de soja que contiene una combinación de los eventos de élite EE-GM3 y EE-GM2 se obtuvo por cruzamiento convencional entre una planta de soja parental que comprende EE-GM3 y una planta de soja parental que comprende EE-GM2. Las plantas de la progenie que comprenden ambos eventos se identifican usando los protocolos de identificación por PCR para EE-GM2 y EE-GM3 como se describe en este documento. Específicamente, se realizaron los cruzamientos con plantas que contienen EE-GM3 y plantas que contienen EE-GM2. Las plantas F1 resultantes se cruzaron hasta 4 líneas convencionales. Las F1 de estos cruzamientos se cultivaron en el campo y se rociaron con glifosato y glufosinato. Las semillas F2 cosechadas de las plantas F1 resistentes a ambos herbicidas se plantaron después. Las plantas F2 se rociaron con tanto con glifosato como con glufosinato. Novecientas plantas tolerantes a ambos herbicidas se cosecharon y plantaron en un ensayo de campo. Los datos de la segregación mendeliana esperada para estos eventos se obtienen en este ensayo. Aproximadamente 40 líneas homocigotas para la tolerancia a ambos herbicidas se seleccionaron para la uniformidad agronómica para estudios adicionales. Estas líneas tuvieron buena tolerancia a ambos herbicidas, con buenas características agronómicas.

Los ensayos de campo con plantas de soja de ese tipo que comprenden los eventos combinados en diferentes tipos de germoplasma comerciales se realizan en múltiples localizaciones y se evalúan varios parámetros agronómicos de las plantas, incluyendo altura de la planta, altura hasta el nodo, sostenimiento, vigor, rendimiento de semillas, y niveles de tolerancia a glifosato, isoxaflutol y glufosinato.

45 9. Introgresión de EE-GM3 y EE-GM1 (ejemplo comparativo) o EE-GM2 dentro de las variedades de cultivo preferidas.

50 El evento de élite EE-GM3 y el evento de élite EE-GM1 o EE-GM2 se introducen por retrocruzamiento repetido en variedades de cultivo comerciales de soja tal como, pero sin limitarse a, cultivo de soja 7631014 (documento US2009252860); variedad de cultivo de soja 7431014 (documento US2009252859); variedad de cultivo de soja 7925084 (documento US2009252858); variedad de cultivo de soja 7311153 (documento US2009252857); variedad de cultivo de soja S070159 (documento US2009252856); variedad de cultivo de soja 7535357 (documento US2009246353); variedad de cultivo de soja S070160 (documento US2009246352); variedad de cultivo de soja 26074414 (documento US2009249508); variedad de cultivo de soja 7509171 (documento US2009249507); variedad de cultivo de soja S070158 (documento US2009246351); variedad de cultivo de soja 7511119 (documento US2009249506); variedad de cultivo de soja 7113111 (documento US2009238945); variedad de cultivo de soja S06-02RM018047 (documento US7592518); variedad de cultivo de soja 7013345 (documento US2009232957); variedad de cultivo de soja 7041461 (documento US2009235376); variedad de cultivo de soja 7549450 (documento US2009232956); variedad de cultivo de soja 7317090 (documento US2009232955); variedad de cultivo de soja

2N2V58015 (documento US2009226597); variedad de cultivo de soja 7243182 (documento US2009226596);
variedad de cultivo de soja 7143182 (documento US2009226595); variedad de cultivo de soja 7043182 (documento
US2009220673); variedad de cultivo de soja S070157 (documento US2009222950); variedad de cultivo de soja
306924721 (documento US2009220672); variedad de cultivo de soja 7614385 (documento US2009220671);
5 variedad de cultivo de soja 7925118 (documento US2009214750); variedad de cultivo de soja 7821295 (documento
US2009214749); variedad de cultivo de soja 7811336 (documento US2009214748); variedad de cultivo de soja
S070150 (documento US2009214747); variedad de cultivo de soja 6214260 (documento US2009214746); variedad
de cultivo de soja S070152 (documento US2009214745); variedad de cultivo de soja 7429331 (documento
US2009214751); variedad de cultivo de soja 26034631 (documento US2009208634); variedad de cultivo de soja
10 S07-03JR108674 (documento US7560621); variedad de cultivo de soja S07-03KL016279 (documento US7560620);
variedad de cultivo de soja S06-CL959411 (documento US7554017); VARIEDAD DE CULTIVO DE SOJA
SG3870NRR (documento US2009158453); VARIEDAD DE CULTIVO DE SOJA HFPR-G (CA2645702); variedad de
cultivo de soja S06-02JR423016 (documento US7521606); variedad de cultivo de soja S06-01JR119814 (documento
US7518039); variedad de cultivo de soja S06-01JR119448 (documento US7518038); variedad de cultivo de soja
15 6540220 (documento US2009055960); variedad de cultivo de soja S060292 (documento US2009055959); variedad
de cultivo de soja S050228 (documento US2009055958); variedad de cultivo de soja S06-02JR423003 (documento
US7491873); variedad de cultivo de soja S06-02JR423005 (documento US7491872); variedad de cultivo de soja
S06-02JR409114 (documento US7485782); variedad de cultivo de soja S06-SJ144056 (documento US7473823);
variedad de cultivo de soja (documento US7470835); variedad de cultivo de soja 6910450 (documento
20 US2008282369); VARIEDAD DE CULTIVO DE SOJA 6223012 (documento US7446246); VARIEDAD DE CULTIVO
DE SOJA 6549250 (documento US7446245); variedad de cultivo de soja 17731225 (documento US2008271204);
variedad de cultivo de soja 6928285 (documento US2008271203); variedad de cultivo de soja 6736054 (documento
US2008271169); variedad de cultivo de soja S060299 (documento US2008271199); variedad de cultivo de soja
S060294 (documento US2008271202); variedad de cultivo de soja 6943322 (documento US2008271201); variedad
25 de cultivo de soja 5343260 (documento US2008263719); variedad de cultivo de soja 6439359 (documento
US2008263704); variedad de cultivo de soja 6238359 (documento US2008263703); variedad de cultivo de soja
6547272 (documento US2008263702); variedad de cultivo de soja 6929431 (documento US2008263701); variedad
de cultivo de soja 6703392 (documento US2008263700); variedad de cultivo de soja 6044483 (documento
US2008263699); variedad de cultivo de soja S050224 (documento US2008263698); variedad de cultivo de soja
30 6719022 (documento US2008263697); variedad de cultivo de soja 5826056 (documento US2008263696); variedad
de cultivo de soja 6265047 (documento US2008263724); variedad de cultivo de soja 6928331 (documento
US2008263695); variedad de cultivo de soja 6719331 (documento US2008263694); variedad de cultivo de soja
6636454 (documento US2008263693); variedad de cultivo de soja 6226454 (documento US2008263718); variedad
de cultivo de soja Q0073801 (documento US2008256657); VARIEDAD DE CULTIVO DE SOJA 6326393
35 (documento US2008256652); VARIEDAD DE CULTIVO DE SOJA 6408448 (documento US2008256651); variedad
de cultivo de soja 6449315 (documento US2008250524); variedad de cultivo de soja S060296 (documento
US2008250523); variedad de cultivo de soja 6012078 (documento US2008250522); variedad de cultivo de soja
6342078 (documento US2008250521); variedad de cultivo de soja 6419156 (documento US2008250520); variedad
de cultivo de soja 5723264 (documento US2008250519); variedad de cultivo de soja S050225 (documento
40 US2008250518); variedad de cultivo de soja S060298 (documento US2008244783); variedad de cultivo de soja
6935331 (documento US2008244782); variedad de cultivo de soja 6819456 (documento US2008244787); variedad
de cultivo de soja S060297 (documento US2008244781); variedad de cultivo de soja 6135319 (documento
US2008244786); variedad de cultivo de soja 6819331 (documento US2008244780); variedad de cultivo de soja
6137445 (documento US2008244779); variedad de cultivo de soja 6917445 (documento US2008244778); variedad
45 de cultivo de soja 6111333 (documento US2008244777); variedad de cultivo de soja S050229 (documento
US2008244776); variedad de cultivo de soja 6114011 (documento US2008244775); variedad de cultivo de soja
6900358 (documento US2008244784); variedad de cultivo de soja 6345184 (documento US2008244774); variedad
de cultivo de soja 6836085 (documento US2008244773); variedad de cultivo de soja 6635047 (documento
US2008244772); variedad de cultivo de soja 6139105 (documento US2008244771); VARIEDAD DE CULTIVO DE
50 SOJA 6434385 (documento US2008244770); VARIEDAD DE CULTIVO DE SOJA S060295 (documento
US2008244769); variedad de cultivo de soja 6035184 (documento US2008244768); variedad de cultivo de soja
S060293 (documento US2008209590); variedad de cultivo de soja 6733322 (documento US2008209594);
VARIEDAD DE CULTIVO DE SOJA 6421326 (documento US2008209593); variedad de cultivo de soja S060077
(documento US2008209589); VARIEDAD DE CULTIVO DE SOJA 6600375 (documento US2008209592); variedad
55 de cultivo de soja S06-CL821457 (documento US7420104); variedad de cultivo de soja S07-02KG294306
(documento US7414178); variedad de cultivo de soja S06-BA046119 (documento US7414175); variedad de cultivo
de soja S07-02KG294307 (documento US7411114); variedad de cultivo de soja SG3865N (documento
US2008189802); variedad de cultivo de soja 6701475 (documento US7408097); variedad de cultivo de soja 1335025
(documento US2008178316); variedad de cultivo de soja 1686017 (documento US2008178315); variedad de cultivo
60 de soja 2388028 (documento US2008178314); variedad de cultivo de soja 2387029 (documento US2008178313);
variedad de cultivo de soja S06-WW152330 (documento US7388129); variedad de cultivo de soja 6424090
(documento US7385118); variedad de cultivo de soja 6723322 (documento US7385115); variedad de cultivo de soja
SG4377NRR (documento US7385114); variedad de cultivo de soja S06-02JR111334 (documento US7381864);
variedad de cultivo de soja 6141287 (documento US7378577); variedad de cultivo de soja MT110501 (documento
65 US7378576); variedad de cultivo de soja (documento US7378575); variedad de cultivo de soja S06-WW169267
(documento US7375261); variedad de cultivo de soja 6223392 (documento US7371939); variedad de cultivo de soja

S06-CL968413 (documento US7371937); variedad de cultivo de soja S06-CL951107 (documento US7368636);
 variedad de cultivo de soja S06-MT9152077 (documento US7361810); variedad de cultivo de soja 4211676
 (documento US2008092253); variedad de cultivo de soja S06-M059029 (documento US7355101); variedad de
 5 cultivo de soja 6548193 (documento US7345228); variedad de cultivo de soja 6440261 (documento US7345227);
 variedad de cultivo de soja S060291 (documento US7342151); variedad de cultivo de soja S06-MT9206166
 (documento US7339094); variedad de cultivo de soja S06-WW013107 (documento US7339093); variedad de cultivo
 de soja S06-M03256 (documento US7335820); variedad de cultivo de soja 6134466 (documento US7332656);
 10 variedad de cultivo de soja S06-01JR123373 (documento US7329800); variedad de cultivo de soja S06-MT9211059
 (documento US7326831); variedad de cultivo de soja 26170838 (documento US2008016590); variedad de cultivo de
 soja 306612412 (documento US2008016588); variedad de cultivo de soja 26660135 (documento US2008016587);
 variedad de cultivo de soja 306734323 (documento US2008016586); variedad de cultivo de soja S06-01JR122235
 (documento US7317144); VARIEDAD DE CULTIVO DE SOJA 5900450 (documento US7314986); variedad de
 15 cultivo de soja S06-MT116260 (documento US7314984); variedad de cultivo de soja S06-SJ143606 (documento
 US7312381); variedad de cultivo de soja S06-98181-G01-35167 (documento US7309819); VARIEDAD DE CULTIVO
 DE SOJA 26082635 (documento US7304219); variedad de cultivo de soja BA922834 (documento US7304217);
 variedad de cultivo de soja 01JR123480 (documento US7304216); variedad de cultivo de soja M061422 (documento
 US7304215); variedad de cultivo de soja 17082821 (documento US2007277262); variedad de cultivo de soja
 17621620 (documento US2007277261); variedad de cultivo de soja 00977706 (documento US2007277260);
 20 variedad de cultivo de soja S060182 (documento US2007277259); variedad de cultivo de soja 26312034 (documento
 US7301078); variedad de cultivo de soja 26143837 (documento US7301077); variedad de cultivo de soja 435.TCS
 (documento US2007271626); variedad de cultivo de soja 495.RC (documento US2007271625); variedad de cultivo
 de soja 5306230 (documento US7297845); variedad de cultivo de soja S06-WW167686 (documento US7291772);
 25 variedad de cultivo de soja 6141145 (documento US2007245426); variedad de cultivo de soja S050232 (documento
 US2007226829); variedad de cultivo de soja 5333301 (documento US2007226828); VARIEDAD DE CULTIVO DE
 SOJA S050215 (documento US2007226827); VARIEDAD DE CULTIVO DE SOJA 3235020 (documento
 US2007226826); variedad de cultivo de soja 5720482 (documento US2007226825); variedad de cultivo de soja
 S050216 (documento US2007226824); variedad de cultivo de soja 5512112 (documento US2007226823); variedad
 de cultivo de soja 3233021 (documento US2007226822); VARIEDAD DE CULTIVO DE SOJA 1336024 (documento
 30 US2007226821); variedad de cultivo de soja 5348287 (documento US2007226820); variedad de cultivo de soja
 5204220 (documento US2007226819); variedad de cultivo de soja 6188027 (documento US2007226818); variedad
 de cultivo de soja 4183026 (documento US2007226817); variedad de cultivo de soja S06-WW157958 (documento
 US7271325); variedad de cultivo de soja 5733056 (documento US2007209091); variedad de cultivo de soja
 90501911 (documento US2007209090); variedad de cultivo de soja S050221 (documento US2007204361);
 35 VARIEDAD DE CULTIVO DE SOJA 5802205 (documento US2007204360); variedad de cultivo de soja 1000642
 (documento US2007204359); variedad de cultivo de soja 5420128 (documento US2007204358); variedad de cultivo
 de soja S050222 (documento US2007199094); variedad de cultivo de soja S050217 (documento US2007199093);
 VARIEDAD DE CULTIVO DE SOJA S050223 (documento US2007199092); variedad de cultivo de soja S050218
 (documento US2007199091); variedad de cultivo de soja 5419227 (documento US2007199089); variedad de cultivo
 de soja 5319227 (documento US2007199088); variedad de cultivo de soja 5723045 (documento US2007199087);
 40 VARIEDAD DE CULTIVO DE SOJA 5051007 (documento US2007199086); variedad de cultivo de soja 5826175
 (documento US2007192893); variedad de cultivo de soja S050231 (documento US2007192892); VARIEDAD DE
 CULTIVO DE SOJA 5826376 (documento US2007192891); VARIEDAD DE CULTIVO DE SOJA 5628386
 (documento US2007192890); variedad de cultivo de soja 5138236 (documento US2007186307); variedad de cultivo
 de soja 5608398 (documento US2007186306); VARIEDAD DE CULTIVO DE SOJA S050230 (documento
 45 US2007186305); VARIEDAD DE CULTIVO DE SOJA 5624126 (documento US2007180561); VARIEDAD DE
 CULTIVO DE SOJA 5019225 (documento US2007180560); VARIEDAD DE CULTIVO DE SOJA 5549483
 (documento US2007180559); VARIEDAD DE CULTIVO DE SOJA 4189010 (documento US2007180551);
 VARIEDAD DE CULTIVO DE SOJA 1486018 (documento US2007180550); VARIEDAD DE CULTIVO DE SOJA
 S050235 (documento US2007180549); VARIEDAD DE CULTIVO DE SOJA 5023230 (documento US2007180548);
 50 VARIEDAD DE CULTIVO DE SOJA S050238 (documento US2007174930); VARIEDAD DE CULTIVO DE SOJA
 5830261 (documento US2007174928); VARIEDAD DE CULTIVO DE SOJA S050226 (documento US7247772);
 VARIEDAD DE CULTIVO DE SOJA 5806063 (documento US7247771); VARIEDAD DE CULTIVO DE SOJA
 S050233 (documento US7244881); VARIEDAD DE CULTIVO DE SOJA 5726085 (documento US7241939);
 variedad de cultivo de soja MT000792 (documento US7238867); variedad de cultivo de soja 5521161 (documento
 55 US7235718); variedad de cultivo de soja WW109447 (documento US7235717); variedad de cultivo de soja
 BA947474 (documento US7220898); variedad de cultivo de soja 5939002 (documento US7217870); variedad de
 cultivo de soja 5726175 (documento US7217869); variedad de cultivo de soja 5432082 (documento US7217868);
 variedad de cultivo de soja SG0850RR (documento US7211715); variedad de cultivo de soja SG1750NRR
 (documento US7208658); variedad de cultivo de soja MT017827 (documento US7208657); variedad de cultivo de
 60 soja 4N2V74028 (documento US7205458); variedad de cultivo de soja CL431203 (documento US7202400);
 variedad de cultivo de soja 4N0S63222 (documento US7199288); variedad de cultivo de soja 5520279 (documento
 US7196253); variedad de cultivo de soja 5834401 (documento US7196252); variedad de cultivo de soja 5621161
 (documento US7196251); variedad de cultivo de soja CL722114 (documento US7196250); variedad de cultivo de
 soja 5741081 (documento US7193140); variedad de cultivo de soja CL727422 (documento US7186895); variedad
 65 de cultivo de soja 4N2V55022 (documento US7183468); variedad de cultivo de soja 5083011 (documento
 US7173169); variedad de cultivo de soja 5626085 (documento US7169976); VARIEDAD DE CULTIVO DE SOJA

S050051 (documento US7169974); VARIEDAD DE CULTIVO DE SOJA 4506816 (documento US2006294626);
 variedad de cultivo de soja WW152201 (documento US7132594); variedad de cultivo de soja CL727636 (documento
 US7132593); variedad de cultivo de soja M08851 (documento US7126047); variedad de cultivo de soja 4324401
 (documento US7105728); variedad de cultivo de soja S050164 (documento US7105727); variedad de cultivo de soja
 5 4136015 (documento US2006195931); variedad de cultivo de soja 3133014 (documento US2006195930); variedad
 de cultivo de soja S040132 (documento US2006195929); variedad de cultivo de soja 4328386 (documento
 US2006195928); variedad de cultivo de soja 1339013 (documento US2006195927); VARIEDAD DE CULTIVO DE
 SOJA 4423183 (documento US2006195925); variedad de cultivo de soja S040131 (documento US2006195924);
 10 variedad de cultivo de soja 4929388 (documento US2006195923); variedad de cultivo de soja 4817034 (documento
 US2006195922); variedad de cultivo de soja 4916816 (documento US7098385); variedad de cultivo de soja 4713487
 (documento US2006191032); variedad de cultivo de soja 4348019 (documento US2006191031); variedad de cultivo
 de soja S040122 (documento US2006191030); variedad de cultivo de soja S040133 (documento US2006185031);
 variedad de cultivo de soja CL821418 (documento US7091404); VARIEDAD DE CULTIVO DE SOJA 4441080
 (documento US7091403); variedad de cultivo de soja 4805442 (documento US2006179509); variedad de cultivo de
 15 soja 4921237 (documento US2006179508); variedad de cultivo de soja 4417380 (documento US2006174369);
 variedad de cultivo de soja 4405070 (documento US2006174368); variedad de cultivo de soja 4417779 (documento
 US7084328); variedad de cultivo de soja S040125 (documento US2006168678); variedad de cultivo de soja
 4909380 (documento US7081572); variedad de cultivo de soja S050162 (documento US7081571); variedad de
 cultivo de soja 6084016 (documento US7081570); variedad de cultivo de soja S050163 (documento US7078600);
 20 variedad de cultivo de soja S040135 (documento US7078598); variedad de cultivo de soja S040117 (documento
 US7078597); variedad de cultivo de soja M03393 (documento US7071391); variedad de cultivo de soja 4145306
 (documento US7064253); variedad de cultivo de soja 900213 (documento US2006117405); variedad de cultivo de
 soja 1000126 (documento US2006117404); variedad de cultivo de soja 901023 (documento US2006117403);
 25 variedad de cultivo de soja S040130 (documento US7053280); variedad de cultivo de soja 4706198 (documento
 US7053279); variedad de cultivo de soja S040118 (documento US7053278); variedad de cultivo de soja S040119
 (documento US7053277); variedad de cultivo de soja S040123 (documento US7053276); variedad de cultivo de soja
 4442112 (documento US7049497); VARIEDAD DE CULTIVO DE SOJA 917013 (documento US7045689); variedad
 de cultivo de soja S040124 (documento US7045691); variedad de cultivo de soja 4238491 (documento US7045690);
 30 variedad de cultivo de soja S010136 (documento US7041882); variedad de cultivo de soja 900613 (documento
 US7030297); variedad de cultivo de soja 4337175 (documento US7030301); variedad de cultivo de soja S040121
 (documento US7030300); variedad de cultivo de soja 4216033 (documento US7030299); variedad de cultivo de soja
 S040128 (documento US7022901); variedad de cultivo de soja S040120 (documento US7022900); variedad de
 cultivo de soja S040127 (documento US7019199); variedad de cultivo de soja S040134 (documento US7015378);
 35 variedad de cultivo de soja S040129 (documento US7015377); variedad de cultivo de soja 4513420 (documento
 US7005564); variedad de cultivo de soja 943013 (documento US2006031958); variedad de cultivo de soja S030136
 (documento US2006021081); variedad de cultivo de soja 927013 (documento US2006021080); variedad de cultivo
 de soja 1000109 (documento US2006015962); variedad de cultivo de soja 90046112 (documento US2006010530);
 40 variedad de cultivo de soja 90897327 (documento US2006010529); variedad de cultivo de soja 90362421
 (documento US2006010528); variedad de cultivo de soja 03022253 (documento US2006010527); variedad de
 cultivo de soja 02022433 (documento US2006010526); variedad de cultivo de soja 02022323 (documento
 US2006010525); variedad de cultivo de soja 02912951 (documento US2006010524); variedad de cultivo de soja
 0102115 (documento US2006010523); variedad de cultivo de soja 915034 (documento US2006010522); variedad de
 45 cultivo de soja 0509255 (documento US2006010521); variedad de cultivo de soja 4803070 (documento US6982368);
 variedad de cultivo de soja 4704310 (documento US6979762); variedad de cultivo de soja SJ919784 (documento
 US2005268362); variedad de cultivo de soja CL615261 (documento US2005268361); Novel soybean (documento
 US2004199964); variedad de cultivo de soja 0509214 (documento US2005210542); variedad de cultivo de soja
 70826751 (documento US2005193442); variedad de cultivo de soja 0509243 (documento US2005193441); variedad
 de cultivo de soja 0509246 (documento US2005193440); variedad de cultivo de soja 0509253 (documento
 US2005193439); variedad de cultivo de soja 0509247 (documento US2005193438); variedad de cultivo de soja
 50 0509252 (documento US2005193437); variedad de cultivo de soja 0509241 (documento US2005193436); variedad
 de cultivo de soja 0509249 (documento US6884927); variedad de cultivo de soja 0509244 (documento
 US2005183158); variedad de cultivo de soja 0509240 (documento US2005183157); variedad de cultivo de soja
 0509239 (documento US2005183156); variedad de cultivo de soja 0509254 (documento US2005183155); variedad
 de cultivo de soja 0509245 (documento US2005183154); variedad de cultivo de soja 0509251 (documento
 55 US2005183153); variedad de cultivo de soja 4283008 (documento US6888050); variedad de cultivo de soja 2386009
 (documento US2005183152); variedad de cultivo de soja 3282002 (documento US6870080); variedad de cultivo de
 soja 0509248 (documento US2005183151); variedad de cultivo de soja 5091007 (documento US6906249 ());
 60 variedad de cultivo de soja 0509236 (documento US2005166281); variedad de cultivo de soja 0509235 (documento
 US2005166280); variedad de cultivo de soja 0509237 (documento US2005166279); variedad de cultivo de soja
 SG5322NRR (documento US2005164390); variedad de cultivo de soja SG5030NRR (documento US2005166278);
 variedad de cultivo de soja SG4911NRR (documento US2005166277); variedad de cultivo de soja S030153
 (documento US2005160504); variedad de cultivo de soja S030158 (documento US2005144680); VARIEDAD DE
 CULTIVO DE SOJA S030160 (documento US2005144679); variedad de cultivo de soja S030161 (documento
 US2005144678); variedad de cultivo de soja S030157 (documento US2005144677); variedad de cultivo de soja
 65 S030155 (documento US2005144676); variedad de cultivo de soja S030156 (documento US2005144675);
 VARIEDAD DE CULTIVO DE SOJA S030159 (documento US2005144674); variedad de cultivo de soja S030154

(documento US6900376); variedad de cultivo de soja S020030 (documento US2005114929); variedad de cultivo de soja S030010 (documento US2005114928); variedad de cultivo de soja SG1431RR (documento US2005097629); VARIEDAD DE CULTIVO DE SOJA SG1330NRR (documento US2005097642); variedad de cultivo de soja S030150 (documento US2005071900); VARIEDAD DE CULTIVO DE SOJA S022209 (documento US2005050601); variedad de cultivo de soja S022217 (documento US2005050600); variedad de cultivo de soja S022219 (documento US2005050599); variedad de cultivo de soja S030151 (documento US2005050598); variedad de cultivo de soja 0491735 (documento US2005022272); variedad de cultivo de soja S022218 (documento US2005022271); variedad de cultivo de soja 6190006 (documento US2004268447); variedad de cultivo de soja SG1120RR (documento US2004250316); variedad de cultivo de soja 0487681 (documento US2004237153); variedad de cultivo de soja 0491717 (documento US2004237152); variedad de cultivo de soja S022220 (documento US2004237151); variedad de cultivo de soja 0491715 (documento US2004237150); variedad de cultivo de soja 0491712 (documento US2004237149); variedad de cultivo de soja 0491718 (documento US2004237148); variedad de cultivo de soja 99271316 (documento US2004221344); variedad de cultivo de soja S022212 (documento US2004221343); variedad de cultivo de soja 0491737 (documento US2004221342); variedad de cultivo de soja S022211 (documento US2004221341); variedad de cultivo de soja S022210 (documento US2004221340); variedad de cultivo de soja S022213 (documento US2004221339); variedad de cultivo de soja 0491725 (documento US2004221346); variedad de cultivo de soja 03129016 (documento US2004221329); variedad de cultivo de soja S022208 (documento US2004221328); variedad de cultivo de soja S022207 (documento US2004221345); variedad de cultivo de soja 02932 (documento US2004210968); variedad de cultivo de soja 94137321 (documento US2004205862); variedad de cultivo de soja 94106224 (documento US2004205861); variedad de cultivo de soja 94143901 (documento US2004205859); VARIEDAD DE CULTIVO DE SOJA 0487685 (documento US2004205858); VARIEDAD DE CULTIVO DE SOJA 92440927 (documento US2004205857); variedad de cultivo de soja 0487686 (documento US2004205856); variedad de cultivo de soja S022215 (documento US2004205855); variedad de cultivo de soja S022214 (documento US2004205854); VARIEDAD DE CULTIVO DE SOJA 0491726 (documento US2004205849); VARIEDAD DE CULTIVO DE SOJA 92478609 (documento US2004205853); variedad de cultivo de soja 922013 (documento US6781040); VARIEDAD DE CULTIVO DE SOJA 0491727 (documento US2004205852); VARIEDAD DE CULTIVO DE SOJA 0491728 (documento US2004205851); variedad de cultivo de soja 1465003 (documento US2004098766); variedad de cultivo de soja 3186004 (documento US2004019936); variedad de cultivo de soja 7085005 (documento US2004205850); variedad de cultivo de soja S022204 (documento US2004199958); variedad de cultivo de soja S022206 (documento US2004199957); variedad de cultivo de soja 0491731 (documento US2004199956); variedad de cultivo de soja 0491733 (documento US2004199955); variedad de cultivo de soja 0491738 (documento US2004199954); variedad de cultivo de soja 0491732 (documento US2004199953); variedad de cultivo de soja 0491729 (documento US2004199952); variedad de cultivo de soja S020011 (documento US2004199951); variedad de cultivo de soja 0491739 (documento US2004199950); variedad de cultivo de soja 0491730 (documento US2004199949); variedad de cultivo de soja 13873 (documento US2004199948); variedad de cultivo de soja 954011 (documento US2004181822); variedad de cultivo de soja 010022 (documento US2004181831); variedad de cultivo de soja 4181001 (documento US2003229926); variedad de cultivo de soja 0491721 (documento US2004168228); variedad de cultivo de soja 0491723 (documento US6911581); variedad de cultivo de soja 0491716 (documento US2004168226); variedad de cultivo de soja 0491713 (documento US2004168225); variedad de cultivo de soja 0491711 (documento US2004168224); variedad de cultivo de soja 0491722 (documento US2004168223); variedad de cultivo de soja 0491724 (documento US2004168222); variedad de cultivo de soja 0491720 (documento US2004168221); variedad de cultivo de soja 0487682 (documento US2004168220); variedad de cultivo de soja 0491714 (documento US2004168219); variedad de cultivo de soja 0491719 (documento US2004168218); variedad de cultivo de soja DP 5634 RR (documento US2003177540); variedad de cultivo de soja S56-D7 (documento US2004098765); variedad de cultivo de soja 926877 (documento US2004064859); variedad de cultivo de soja SE73753 (documento US2004055059); variedad de cultivo de soja SN83594 (documento US2004055058); variedad de cultivo de soja SE71112 (documento US2004055056); variedad de cultivo de soja SE73090 (documento US2004055054); variedad de cultivo de soja SN79526 (documento US2004055053); variedad de cultivo de soja SW90702 (documento US2004055052); variedad de cultivo de soja SN79525 (documento US2004055051); variedad de cultivo de soja SE90345 (documento US2004055050); variedad de cultivo de soja 0149928 (documento US2004055049); variedad de cultivo de soja SN83780 (documento US2004055048); variedad de cultivo de soja 0053840 (documento US2004055047); variedad de cultivo de soja 924001 (documento US2004055046); variedad de cultivo de soja 0004747 (documento US2004055057); variedad de cultivo de soja 0037357 (documento US2004055045); variedad de cultivo de soja SN83366 (documento US2004055044); variedad de cultivo de soja SN76208 (documento US2004055043); variedad de cultivo de soja 0037370 (documento US2004055042); variedad de cultivo de soja SX95512 (documento US2004049821); variedad de cultivo de soja 0096008 (documento US2004049820); variedad de cultivo de soja SN83544 (documento US2004049819); variedad de cultivo de soja 0088401 (documento US2004049818); variedad de cultivo de soja SN64195 (documento US2004049817); variedad de cultivo de soja 0034754 (documento US2004049816); variedad de cultivo de soja SN71173 (documento US2004049815); variedad de cultivo de soja SN83211 (documento US2004049814); variedad de cultivo de soja 92422749 (documento US2004045058); variedad de cultivo de soja 0120311 (documento US2004045057); variedad de cultivo de soja S010344 (documento US2004003438); variedad de cultivo de soja 70876922 (documento US2004003437); variedad de cultivo de soja 924496 (documento US2004003436); variedad de cultivo de soja 19705120 (documento US2003237116); variedad de cultivo de soja 19704220 (documento US2003235914); variedad de cultivo de soja 19704280 (documento US2003237115); variedad de cultivo de soja 19704210 (documento US2003237114); variedad de cultivo de soja S37-N4 (documento

US2003237113); variedad de cultivo de soja 19602310 (documento US2003233685); variedad de cultivo de soja 19704120 (documento US2003233684); variedad de cultivo de soja 19704230 (documento US2003233683); variedad de cultivo de soja 1000126 (documento US2003233682); variedad de cultivo de soja 93831526 (documento US2003221226); variedad de cultivo de soja 0322581 (documento US2003221225); variedad de cultivo de soja 0332149 (documento US2003213028); variedad de cultivo de soja 0332144 (documento US2003213027); variedad de cultivo de soja 924788 (documento US2003213026); variedad de cultivo de soja 924861 (documento US2003213025); variedad de cultivo de soja 928070 (documento US2003213024); variedad de cultivo de soja S010354 (documento US2003213023); variedad de cultivo de soja S010360 (documento US2003213022); variedad de cultivo de soja S010361 (documento US2003213021); variedad de cultivo de soja S010363 (documento US2003213020); variedad de cultivo de soja S010364 (documento US2003213019); variedad de cultivo de soja 0332148 (documento US2003208805); variedad de cultivo de soja 0332147 (documento US2003208804); variedad de cultivo de soja 0332146 (documento US2003208803); variedad de cultivo de soja 0332135 (documento US2003208802); variedad de cultivo de soja 1000144 (documento US2003208801); variedad de cultivo de soja 0332143 (documento US2003208800); variedad de cultivo de soja 0332145 (documento US2003208799); variedad de cultivo de soja S010345 (documento US2003204884); variedad de cultivo de soja 0332131 (documento US2003204883); variedad de cultivo de soja 0332130 (documento US2003204882); variedad de cultivo de soja 0332129 (documento US2003204881); variedad de cultivo de soja 0332122 (documento US2003204880); variedad de cultivo de soja S010350 (documento US2003204879); variedad de cultivo de soja S010355 (documento US2003204878); variedad de cultivo de soja 031766 (documento US2003204877); variedad de cultivo de soja S010353 (documento US2003204876); variedad de cultivo de soja 0322580 (documento US2003200579); variedad de cultivo de soja 0322579 (documento US2003200578); variedad de cultivo de soja S010347 (documento US2003200577); variedad de cultivo de soja S010349 (documento US2003200576); variedad de cultivo de soja 0332141 (documento US2003200575); variedad de cultivo de soja 0332142 (documento US2003200574); variedad de cultivo de soja 0332133 (documento US2003200573); variedad de cultivo de soja 0332134 (documento US2003200572); variedad de cultivo de soja 0332139 (documento US2003200571); variedad de cultivo de soja 0332137 (documento US2003200570); variedad de soja XB33U08 (documento US7598435); variedad de soja XB27D08 (documento US7592519); variedad de soja XB41M08 (documento US7589261); variedad de soja XB05J08 (documento US7589260); variedad de soja XB33T08 (documento US7589259); variedad de soja XB30Y08 (documento US7586025); variedad de soja XB40U08 (documento US7582813); variedad de soja XB29M08 (documento US7582811); VARIEDAD DE SOJA 93Y10 (documento US2009144843); VARIEDAD DE SOJA D4325666 (documento US2009055957); VARIEDAD DE SOJA D4125897 (documento US2009055956); VARIEDAD DE SOJA D4698573 (documento US2009055955); VARIEDAD DE SOJA D4356652 (documento US2009019592); VARIEDAD DE SOJA D4456885 (documento US2009019591); VARIEDAD DE SOJA D4698013 (documento US2009019590); VARIEDAD DE SOJA D4637114 (documento US2009019589); VARIEDAD DE SOJA D4102367 (documento US2009019595); VARIEDAD DE SOJA D4266582 (documento US2009019594); VARIEDAD DE SOJA D4422801 (documento US2009019593); VARIEDAD DE SOJA D4520980 (documento US2009019588); VARIEDAD DE SOJA D4521369 (documento US2009019587); VARIEDAD DE SOJA D4223057 (documento US2009019586); VARIEDAD DE SOJA D4682156 (documento US2009019585); VARIEDAD DE SOJA D4233569 (documento US2009019584); VARIEDAD DE SOJA D4925614 (documento US2009019583); VARIEDAD DE SOJA D4203144 (documento US2009019604); VARIEDAD DE SOJA D4102536 (documento US2009019582); VARIEDAD DE SOJA D4865324 (documento US2009019581); VARIEDAD DE SOJA D4825495 (documento US2009019580); VARIEDAD DE SOJA D4659251 (documento US2009019579); VARIEDAD DE SOJA D4258962 (documento US2009019578); VARIEDAD DE SOJA D4253969 (documento US2009019577); VARIEDAD DE SOJA D4696658 (documento US2009019603); VARIEDAD DE SOJA D4256925 (documento US2009019576); VARIEDAD DE SOJA D4253681 (documento US2009019575); VARIEDAD DE SOJA D4789254 (documento US2009019574); VARIEDAD DE SOJA D4713125 (documento US2009019573); VARIEDAD DE SOJA D4526223 (documento US2009019572); VARIEDAD DE SOJA D4556201 (documento US2009019571); VARIEDAD DE SOJA D4012368 (documento US2009019570); VARIEDAD DE SOJA D4452019 (documento US2009019569); VARIEDAD DE SOJA D4201483 (documento US2009019568); VARIEDAD DE SOJA D4463892 (documento US2009019567); VARIEDAD DE SOJA D4159630 (documento US2009019566); VARIEDAD DE SOJA D4470236 (documento US2009019565); VARIEDAD DE SOJA D4063284 (documento US2009019564); VARIEDAD DE SOJA D4021792 (documento US2009013429); VARIEDAD DE SOJA D4902530 (documento US2009013428); VARIEDAD DE SOJA D4367012 (documento US2009013427); VARIEDAD DE SOJA D4923560 (documento US2009013426); VARIEDAD DE SOJA D4253854 (documento US2009013425); VARIEDAD DE SOJA D4210110 (documento US2009007290); VARIEDAD DE SOJA D4523081 (documento US2009007289); VARIEDAD DE SOJA D4328762 (documento US2009007288); VARIEDAD DE SOJA D4483789 (documento US2009007287); VARIEDAD DE SOJA D4311702 (documento US2009007286); VARIEDAD DE SOJA D4127789 (documento US2008313765); VARIEDAD DE SOJA D4361423 (documento US2008313764); VARIEDAD DE SOJA D4208814 (documento US2008313763); VARIEDAD DE SOJA D4201139 (documento US2008313762); VARIEDAD DE SOJA D4120384 (documento US2008313761); VARIEDAD DE SOJA D4572906 (documento US2008313760); VARIEDAD DE SOJA D4301279 (documento US2008313759); VARIEDAD DE SOJA D4422957 (documento US2008313758); VARIEDAD DE SOJA D4256958 (documento US2008313757); VARIEDAD DE SOJA 4074328 (documento US2008282366); VARIEDAD DE SOJA XB47Q06 (documento US2008244767); VARIEDAD DE SOJA XB26R06 (documento US2008244766); VARIEDAD DE SOJA 4991629 (documento US2008216190); VARIEDAD DE SOJA 4158090 (documento US2008216189); variedad de soja XB40K07 (documento US2008209582); VARIEDAD DE SOJA D0069201 (documento US2008178345); VARIEDAD DE SOJA D0064801 (documento US2008178320); VARIEDAD DE SOJA D0063801 (documento US2008178344); VARIEDAD

DE SOJA D0061501 (documento US2008178343); VARIEDAD DE SOJA 4938051 (documento US2008178319);
 VARIEDAD DE SOJA 4880500 (documento US2008178318); VARIEDAD DE SOJA 4835953 (documento
 US2008178317); VARIEDAD DE SOJA 4684181 (documento US2008178342); VARIEDAD DE SOJA 4427363
 (documento US2008178340); VARIEDAD DE SOJA 4676311 (documento US2008178339); VARIEDAD DE SOJA
 5 4953710 (documento US2008178337); VARIEDAD DE SOJA 4857548 (documento US2008178336); VARIEDAD DE
 SOJA 4551757 (documento US2008178335); VARIEDAD DE SOJA 4027271 (documento US2008178334);
 VARIEDAD DE SOJA 4274171 (documento US2008178333); VARIEDAD DE SOJA 0341931 (documento
 US2008178332); VARIEDAD DE SOJA 4282159 (documento US2008178331); VARIEDAD DE SOJA 4852004
 (documento US2008178330); VARIEDAD DE SOJA 4688589 (documento US2008178329); VARIEDAD DE SOJA
 10 4614131 (documento US2008178327); VARIEDAD DE SOJA 4201823 (documento US2008178326); VARIEDAD DE
 SOJA 92M22 (documento US2008178350); VARIEDAD DE SOJA 4174206 (documento US2008178322);
 VARIEDAD DE SOJA 4305498 (documento US2008178321); VARIEDAD DE SOJA 4423586 (documento
 US2008172761); VARIEDAD DE SOJA 4568207 (documento US2008172756); VARIEDAD DE SOJA 4840308
 (documento US2008172755); VARIEDAD DE SOJA 4256323 (documento US2008172754); VARIEDAD DE SOJA
 15 4789516 (documento US7399907); VARIEDAD DE SOJA 90Y40 (documento US2008168581); VARIEDAD DE
 SOJA 4959932 (documento US7396983); VARIEDAD DE SOJA 4062885 (documento US7394000); variedad de
 soja 4858197 (documento US7390940); variedad de soja 4092390 (documento US7390939); variedad de soja
 4735486 (documento US7390938); variedad de soja 4219527 (documento US7388132); variedad de soja 4599695
 (documento US7388131); variedad de soja 4554257 (documento US7388130); variedad de soja 4896902
 (documento US7385113); variedad de soja 4367308 (documento US7385112); variedad de soja 4589609
 (documento US7385111); variedad de soja 4640250 (documento US7385110); variedad de soja 4540394
 (documento US7385109); variedad de soja 4297661 (documento US7385108); variedad de soja 4958786
 (documento US7381866); variedad de soja 4440685 (documento US7375262); variedad de soja 4008211
 (documento US7371938); variedad de soja 4778469 (documento US7368637); variedad de soja 4766295
 25 (documento US7355103); variedad de soja 4436909 (documento US7355102); variedad de soja 4812469
 (documento US7351886); variedad de soja 4761767 (documento US7351885); variedad de soja 4142393
 (documento US7329801); variedad de soja 4502135 (documento US7326832); variedad de soja 4353363
 (documento US7321082); variedad de soja 91B42 (documento US7317143); VARIEDAD DE SOJA 0330739
 (documento US2007271622); variedad de soja 0384279 (documento US7294768); VARIEDAD DE SOJA 4175567
 30 (documento US2007256187); VARIEDAD DE SOJA 4336643 (documento US2007256186); VARIEDAD DE SOJA
 4671685 (documento US2007256185); VARIEDAD DE SOJA 4309194 (documento US2007256190); VARIEDAD DE
 SOJA 0330738 (documento US2007256184); VARIEDAD DE SOJA 0045477 (documento US2007256183);
 VARIEDAD DE SOJA 0437973 (documento US2007256182); VARIEDAD DE SOJA 0457028 (documento
 US2007256181); VARIEDAD DE SOJA 0367478 (documento US2007256180); VARIEDAD DE SOJA 0358232
 35 (documento US2007256179); VARIEDAD DE SOJA 0417158 (documento US2007256178); VARIEDAD DE SOJA
 4559809 (documento US2007256177); VARIEDAD DE SOJA 0196172 (documento US2007256176); VARIEDAD DE
 SOJA 4785923 (documento US2007256175); VARIEDAD DE SOJA 4587513 (documento US2007256174);
 VARIEDAD DE SOJA 0409670 (documento US2007256173); VARIEDAD DE SOJA 4010165 (documento
 US2007256172); VARIEDAD DE SOJA 0421133 (documento US2007256171); VARIEDAD DE SOJA 0240187
 40 (documento US2007256170); VARIEDAD DE SOJA 0387907 (documento US2007256169); VARIEDAD DE SOJA
 0232405 (documento US2007256168); VARIEDAD DE SOJA 0146529 (documento US2007256167); VARIEDAD DE
 SOJA 4788561 (documento US2007256166); VARIEDAD DE SOJA 457114 (documento US2007256165);
 VARIEDAD DE SOJA 0149217 (documento US2007256164); VARIEDAD DE SOJA 4247825 (documento
 US2007254366); VARIEDAD DE SOJA 0212938 (documento US2007256163); VARIEDAD DE SOJA 0146565
 45 (documento US2007256162); VARIEDAD DE SOJA 4647672 (documento US2007256161); VARIEDAD DE SOJA
 0215818 (documento US2007256160); VARIEDAD DE SOJA 0384531 (documento US2007256159); VARIEDAD DE
 SOJA 4878185 (documento US2007254365); VARIEDAD DE SOJA 4498438 (documento US2007256158);
 VARIEDAD DE SOJA 0436052 (documento US2007256157); VARIEDAD DE SOJA 4782157 (documento
 US2007256156); VARIEDAD DE SOJA 0385457 (documento US2007256155); VARIEDAD DE SOJA 0385240
 50 (documento US2007256154); VARIEDAD DE SOJA 4735316 (documento US2007256153); VARIEDAD DE SOJA
 0277524 (documento US2007256152); VARIEDAD DE SOJA 0276951 (documento US2007256151); variedad de
 soja XB37L07 (documento US2007245429); variedad de soja XB35X07 (documento US2007226837); variedad de
 soja XB35S07 (documento US2007226836); variedad de soja XB35F07 (documento US2007226835); variedad de
 soja XB34R07 (documento US2007226834); variedad de soja XB34L07 (documento US2007226833); variedad de
 soja XB34D07 (documento US2007226832); variedad de soja XB33G07 (documento US2007226831); variedad de
 55 soja 98Y11 (documento US2007169220); variedad de soja 0137335 (documento US7241941); variedad de soja
 XB15E07 (documento US2007150980); variedad de soja 92M52 (documento US2007150979); variedad de soja
 XB47R07 (documento US2007136888); variedad de soja XB46V07 (documento US2007136887); variedad de soja
 XB57E07 (documento US2007136886); variedad de soja XB54X07 (documento US2007136885); variedad de soja
 60 XB54V07 (documento US2007136884); variedad de soja XB52Q07 (documento US2007136883); variedad de soja
 XB37M07 (documento US2007136882); variedad de soja XB37J07 (documento US2007136881); variedad de soja
 XB34Q07 (documento US2007136880); variedad de soja XB32S07 (documento US2007136879); variedad de soja
 XB32J07 (documento US2007136878); variedad de soja XB31R07 (documento US2007136877); variedad de soja
 XB31J07 (documento US2007136876); variedad de soja XB29K07 (documento US2007136875); variedad de soja
 65 XB31H07 (documento US2007136874); variedad de soja XB30G07 (documento US2007136873); variedad de soja
 XB30E07 (documento US2007136872); variedad de soja XB25E07 (documento US2007136871); variedad de soja

XB26X07 (documento US2007136870); variedad de soja XB23L07 (documento US2007136869); variedad de soja
 XB19Z07 (documento US2007136868); variedad de soja XB19E07 (documento US2007136867); variedad de soja
 XB18M07 (documento US2007136866); variedad de soja XB18K07 (documento US2007136865); variedad de soja
 XB18J07 (documento US2007136864); variedad de soja XB17W07 (documento US2007136863); variedad de soja
 5 XB17U07 (documento US2007136862); variedad de soja XB15B07 (documento US2007136861); variedad de soja
 XB12R07 (documento US2007136860); variedad de soja XB11J07 (documento US2007136859); variedad de soja
 XB04E07 (documento US2007136858); variedad de soja XB02K07 (documento US2007136857); variedad de soja
 XB49V07 (documento US2007136856); variedad de soja XB48X07 (documento US2007136855); variedad de soja
 10 92M75 (documento US2007136854); variedad de soja XB48W07 (documento US2007136853); variedad de soja
 XB44G07 (documento US2007136852); variedad de soja XB42K07 (documento US2007136851); variedad de soja
 XB42H07 (documento US2007136850); variedad de soja XB41J07 (documento US2007136849); variedad de soja
 XB40Y07 (documento US2007136848); variedad de soja XB40X07 (documento US2007136847); variedad de soja
 XB39E07 (documento US2007136846); variedad de soja XB38W07 (documento US2007136845); variedad de soja
 XB38S07 (documento US2007136844); variedad de soja XB23V07 (documento US2007136843); variedad de soja
 15 XB31M07 (documento US2007130652); variedad de soja XB28E07 (documento US2007130651); variedad de soja
 XB25S07 (documento US2007130650); variedad de soja XB21N07 (documento US2007130649); variedad de soja
 XB03Q07 (documento US2007130648); variedad de soja XB49Q07 (documento US2007130647); variedad de soja
 XB06M07 (documento US2007130646); variedad de soja S04-97130-15-02 (documento US7196249); variedad de
 soja S04-97026-N99-42648-01 (documento US7189896); variedad de soja S05-97016-G99-21212 (documento
 20 US7186894); variedad de soja S05-99048-19 (documento US7164064); variedad de soja 92B14 (documento
 US7161065); variedad de soja 98R31 (documento US2007006350); variedad de soja S05-97177-N00-22972
 (documento US7132592); variedad de soja XB25G06 (documento US2006225160); variedad de soja 91M70
 (documento US2006174381); variedad de soja XB24R06 (documento US2006162029); variedad de soja S03-95368-
 N98-52902 (documento US7078594); variedad de soja S05-97130-51 (documento US7078599); variedad de soja
 25 XB11L06 (documento US2006130187); variedad de soja 94B13 (documento US7064251); variedad de soja 94B74
 (documento US7064250); variedad de soja XB27J06 (documento US2006112462); variedad de soja XB29N06
 (documento US2006112460); variedad de soja XB28T06 (documento US2006112459); variedad de soja XB16W06
 (documento US2006112458); variedad de soja XB18C06 (documento US2006112456); variedad de soja XB 10M06
 (documento US2006107391); variedad de soja XB06K06 (documento US2006107390); variedad de soja XB28V06
 30 (documento US2006107389); variedad de soja XB004A06 (documento US2006107388); variedad de soja XB12L06
 (documento US2006107387); variedad de soja XB005A06 (documento US2006107386); variedad de soja XB25H06
 (documento US2006107385); variedad de soja XB39W06 (documento US2006107384); variedad de soja XB27K06
 (documento US2006107383); variedad de soja XB29R06 (documento US2006107382); variedad de soja XB16S06
 (documento US2006107381); variedad de soja XB36V06 (documento US2006107380); variedad de soja XB07N06
 35 (documento US2006107379); variedad de soja XB23H06 (documento US2006107378); variedad de soja XB35C06
 (documento US2006107377); variedad de soja XB32L06 (documento US2006107376); variedad de soja XB58P06
 (documento US2006107375); variedad de soja XB36M06 (documento US2006107374); variedad de soja XB22G06
 (documento US2006107373); variedad de soja XB36Q06 (documento US2006107372); variedad de soja 91M61
 (documento US2006107371); variedad de soja XB32A06 (documento US2006107370); variedad de soja XB19V06
 40 (documento US2006107369); variedad de soja XB43C06 (documento US2006107368); variedad de soja XB22N06
 (documento US2006107367); variedad de soja XB38E06 (documento US2006107366); variedad de soja XB37U06
 (documento US2006107365); variedad de soja XB37Q06 (documento US2006107364); variedad de soja XB00D06
 (documento US2006107363); variedad de soja XB14N06 (documento US2006107362); variedad de soja XB31H06
 (documento US2006107361); variedad de soja XB21Z06 (documento US2006107360); variedad de soja XB005B06
 45 (documento US2006107359); variedad de soja XB15W06 (documento US2006107358); variedad de soja XB33N06
 (documento US2006107357); variedad de soja XB18W06 (documento US2006107356); variedad de soja XB32M06
 (documento US2006107355); variedad de soja XB19F06 (documento US2006107354); variedad de soja S03-95021-
 55-138-AB (documento US7026531); variedad de soja 94M41 (documento US7002061); variedad de soja 91M50
 (documento US6998518); variedad de soja 92B13 (documento US6989475); variedad de soja 93B68 (documento
 50 US6989474); variedad de soja 93B09 (documento US6979759); variedad de soja 92M00 (documento US6972352);
 variedad de soja XB08P05 (documento US2005120433); variedad de soja XB26V05 (documento US2005150023);
 variedad de soja XB21R05 (documento US2005108795); variedad de soja XB28E05 (documento US2005114942);
 variedad de soja XB58K05 (documento US2005114941); variedad de soja XB27B05 (documento US2005114940);
 variedad de soja XB21S05 (documento US2005150022); variedad de soja XB26U05 (documento US2005138695);
 55 variedad de soja XB35K05 (documento US2005150021); variedad de soja XB18S05 (documento US2005120436);
 variedad de soja XB25C05 (documento US2005120435); variedad de soja 90M01 (documento US2005120434);
 variedad de soja XB22H05 (documento US2005150020); variedad de soja XB22K05 (documento US2005114939);
 variedad de soja XB58G05 (documento US2005114938); variedad de soja XB57U05 (documento US2005120432);
 variedad de soja XB49M05 (documento US2005120431); variedad de soja XB20D05 (documento US2005144683);
 60 variedad de soja XB41B05 (documento US2005150019); variedad de soja XB38T05 (documento US2005120430);
 variedad de soja XB13T05 (documento US2005120429); variedad de soja XB19Y05 (documento US2005120428);
 variedad de soja XB43D05 (documento US2005120427); variedad de soja XB40E05 (documento US2005120426);
 variedad de soja XB39N05 (documento US2005120425); variedad de soja 93M01 (documento US2005120424);
 VARIEDAD DE SOJA XB31W05 (documento US2005223439); variedad de soja XB32C05 (documento
 65 US2005114937); variedad de soja XB40D05 (documento US2005120423); variedad de soja 92M61 (documento
 US2005120422); variedad de soja 91M91 (documento US2005114936); variedad de soja XB33Y05 (documento

US2005120421); variedad de soja XB34A05 (documento US2005120420); variedad de soja XB13U05 (documento US2005114935); variedad de soja XB12K05 (documento US2005114934); variedad de soja XB30P05 (documento US2005120419); variedad de soja XB57T05 (documento US2005114933); variedad de soja XB17S05 (documento US2005114932); variedad de soja XB25Y05 (documento US2005114930); variedad de soja XB25S05 (documento US2005150017); variedad de soja XB43W04 (documento US2004177420); variedad de soja XB44W04 (documento US2004177419); variedad de soja XB53J04 (documento US2004199960); variedad de soja XB43V04 (documento US2004216192); variedad de soja XB49K04 (documento US2004172668); variedad de soja XB27P04 (documento US2004205864); variedad de soja XB29L04 (documento US2004177418); variedad de soja XB29K04 (documento US2004177417); variedad de soja XB41U04 (documento US2004231017); variedad de soja XB34D04 (documento US2004177416); variedad de soja XB09J04 (documento US2004172711); variedad de soja XB32Y04 (documento US2004194169); variedad de soja XB44D04 (documento US2004172710); variedad de soja XB44C04 (documento US2004172709); variedad de soja XB10L04 (documento US2004172708); variedad de soja XB19U04 (documento US2004172707); variedad de soja XB02F04 (documento US2004172706); variedad de soja XB25X04 (documento US2004172705); variedad de soja XB26L04 (documento US2004172704); variedad de soja XB11F04 (documento US2004172703); variedad de soja XB40Z04 (documento US2004177415); variedad de soja XB40Y04 (documento US2004181833); variedad de soja XB007C04 (documento US2004181832); variedad de soja 96M20 (documento US2004172702); variedad de soja XB39J04 (documento US2004172701); variedad de soja XB29A04 (documento US2004172700); variedad de soja XB35P04 (documento US2004172699); variedad de soja XB58Z04 (documento US2004177414); variedad de soja XB43R04 (documento US2004172698); variedad de soja XB35L04 (documento US2004172697); variedad de soja XB06H04 (documento US2004172696); variedad de soja XB59U04 (documento US2004172695); variedad de soja XB64C04 (documento US2004172694); variedad de soja 95M80 (documento US2004172693); variedad de soja XB35Q04 (documento US2004177413); variedad de soja XB04D04 (documento US2004177412); variedad de soja XB08L04 (documento US2004177411); variedad de soja XB18Q04 (documento US2004177410); variedad de soja XB16Q04 (documento US2004177409); variedad de soja XB55K04 (documento US2004172692); variedad de soja XB57M04 (documento US2004172691); variedad de soja XB25L04 (documento US2004205863); variedad de soja XB48T04 (documento US2004194168); variedad de soja XB42X04 (documento US2004199959); variedad de soja XB31T04 (documento US2004177408); variedad de soja XB31U04 (documento US2004194167); variedad de soja XB30E04 (documento US2004177407); variedad de soja XB31R04 (documento US2004177406); variedad de soja S03-95341-A98-60618 (documento US6909033); variedad de soja SN97-6946 (documento US2004168227); variedad de soja 94M70 (documento US6864408); variedad de soja 92M70 (documento US6797866); variedad de soja 92M71 (documento US6858782); variedad de soja 91M40 (documento US6828490); variedad de soja 93M80 (documento US6849789); variedad de soja XB39N03 (documento US6864407); variedad de soja 93M90 (documento US6846975); variedad de soja 90M90 (documento US6852913); variedad de soja 92M72 (documento US6960708); variedad de soja 91M90 (documento US6849788); variedad de soja 92M50 (documento US6855876); variedad de soja 92M30 (documento US6951974); variedad de soja 93M60 (documento US6797865); variedad de soja 93M40 (documento US6791016); variedad de soja 93M41 (documento US6835875); variedad de soja XB15P03 (documento US6797864); variedad de soja XB24H03 (documento US6936752); variedad de soja XB05A03 (documento US6815585); variedad de soja 92M80 (documento US6849787); variedad de soja XB33S03 (documento US6855875); variedad de soja XB48P03 (documento US6797863); variedad de soja XB29X03 (documento US6806406); variedad de soja XB02C03 (documento US6800795); variedad de soja XB29W03 (documento US6858781); variedad de soja 91M10 (documento US6958437); variedad de soja 92M10 (documento US6916975); variedad de soja XB10G03 (documento US6806405); variedad de soja 92M31 (documento US6846974); variedad de soja XB38D03 (documento US6806404); variedad de soja XB34N03 (documento US6803508); variedad de soja XB30W03 (documento US6809236); variedad de soja XB37J03 (documento US6844488); variedad de soja SE72581 (documento US2004148665); variedad de soja SE90076 (documento US2004148664); variedad de soja SD82997 (documento US2004148663); variedad de soja 0037393 (documento US2004148662); variedad de soja 0088414 (documento US2004148661); variedad de soja 0149926 (documento US2004148660); variedad de soja 0037209 (documento US2004148659); variedad de soja 93B36 (documento US6833498); variedad de soja 90B74 (documento US6812384); variedad de soja 90B51 (documento US6818809); variedad de soja 91B03 (documento US6815584); variedad de soja 95B43 (documento US6818808); variedad de soja 95B42 (documento US6815583); variedad de soja 92B47 (documento US6812383); variedad de soja SE90346 (documento US2004055055); variedad de soja 0007583 (documento US2004010824); variedad de soja 0008079 (documento US2004010823); variedad de soja S02-AP98041-2-333-01 (documento US2003121076); variedad de soja S02-98041-2-251-01 (documento US2003182694); variedad de soja S02-AP98041-2-262-02 (documento US2003196220); variedad de soja S02-95021-55-240-BA (documento US2003188348); variedad de soja APA94-31572 (documento US2003061641); variedad de soja AP98041-1-203 (documento US2003056251); variedad de soja APA95-15294 (documento US2003061640); variedad de soja AP98041-4-117 (documento US2003056250); variedad de soja 91B33 (documento US6580018); variedad de soja 93B85 (documento US6605762); variedad de soja 92B76 (documento US6610911); variedad de soja 92B38 (documento US6605761); variedad de soja 94B24 (documento US6613967); variedad de soja 94B73 (documento US6605760); variedad de soja 93B86 (documento US6610910); variedad de soja 91B12 (documento US6583343); variedad de soja 95B34 (documento US6605759); variedad de soja 94B23 (documento US6605758); variedad de soja 90B11 (documento US6583342); variedad de soja 91B92 (documento US6586659); variedad de soja 95B96 (documento US6605757); variedad de soja 93B72 (documento US6566589); variedad de soja 95B97 (documento US6613966); variedad de soja 92B95 (documento US6608243); variedad de soja 93B47 (documento US6583341); variedad de soja 97B52 (documento US6605756); variedad de soja 93B15

(documento US6617499); variedad de soja 94B54 (documento US6613965); variedad de soja 93B67 (documento US6573433); variedad de soja 93B87 (documento US6727410); variedad de soja 96B51 (documento US6613964); variedad de soja 92B84 (documento US6730829); variedad de soja 92B12 (documento US6605755); variedad de soja 90A07 (documento US6320105); variedad de soja 93B26 (documento US6342659); variedad de soja 96B21 (documento US6369301); variedad de soja 92B63 (documento US6326529); variedad de soja 93B46 (documento US6323402); variedad de soja 92B75 (documento US6362400); variedad de soja 93B08 (documento US6323401); variedad de soja 97B62 (documento US6323400); variedad de soja 92B37 (documento US6323399); variedad de soja 92B56 (documento US6339186); variedad de soja 93B66 (documento US6307131); variedad de soja 92B62 (documento US6346657); variedad de soja 92B36 (documento US6369300); variedad de soja 90B73 (documento US6316700); variedad de soja 95B95 (documento US6323398); variedad de soja 93B65 (documento US6229074); variedad de soja 92B24 (documento US6284950); variedad de soja 94B53 (documento US6235976); variedad de soja 94B22 (documento US6140557); variedad de soja 93B84 (documento US6143956); variedad de soja 95B32 (documento US6229073); variedad de soja 95B53 (documento US6147283); variedad de soja 93B35 (documento US6153816); variedad de soja 93B07 (documento US6143955); variedad de soja 92B74 (documento US6124526); variedad de soja 92B35 (documento US6166296); variedad de soja 94B45 (documento US6162968); variedad de soja 96B01 (documento US6143954); variedad de soja 93B53 (documento US6335197).

Se observó que la introgresión de los eventos de élite en estas variedades de cultivo no influye significativamente en ninguna de las características agronómicas o fenotípicas deseables de estas variedades de cultivo (sin retrasar en el rendimiento), mientras que la expresión del transgén, como se determina por la tolerancia a glifosato y/o isoxaflutol o glufosinato, cumple los niveles aceptables en el comercio.

Los apilamientos se pueden combinar además ventajosamente con uno o más eventos de soja disponibles en el mercado, que incluyen, pero no se limitan a, otros eventos de tolerancia a herbicida, tales como los eventos descritos en las peticiones USDA-APHIS: 09-349-01p, 09-201-01p, 09-183-01p, 09-082-01p, 09-015-01p, 06-354-01p, 06-271-01p, 06-178-01p, 98-238-01p, 98-014-01p, 97-008-01p, 96-068-01p, 95-335-01p, 93-258-01p, (véase, por ejemplo, www.aphis.usda.gov/brs/not_reg.html), o el evento MON89788 (tolerancia a glifosato) descrito en el doc US 2006-282915, evento DP-305423-1 (rico en ácido oleico/tolerancia al inhibidor de ALS) descrito en el documento WO 2008/054747, MON87701 descrito en el documento US2009130071, el evento 3560.4.3.5 descrito en el documento US2009036308, o el evento DP-305423-1 descrito en el documento US2008312082, o el evento BPS-CV127-9 (Evento 127) del documento WO 2010/080829.

Como se usa en las reivindicaciones a continuación, a menos que se indique claramente lo contrario, el término "planta" se entiende que incluye tejidos de las plantas, en cualquier fase de maduración, así como cualquiera de las células, tejidos u órganos tomados de o derivados de cualquier planta de ese tipo, incluyendo, sin limitación, cualquiera de semillas, hojas, tallos, flores, raíces, células individuales, gametos, cultivos de células, cultivos de tejidos, o protoplastos.

La semilla de referencia que comprende el evento de élite EE-GM3 se depositó como 32-RRMM-0531 en el NCIMB (Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen AB9YA, Scotland) el 12 de octubre de 2009, con el número de acceso NCIMB 41659 en el NCIMB, y se confirmó su viabilidad. Un nombre alternativo para EE-GM3 es evento FG-072, o MST-FGØ72-3.

La semilla de referencia que comprende el evento de élite EE-GM1 se depositó como 32RRMM0368 en el NCIMB (Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen AB9YA, Scotland) el 12 de octubre de 2009, con el número de acceso NCIMB 41658 en el NCIMB. Un nombre alternativo para EE-GM1 es LL27, A2704-12, o ACS-GMØ5-3.

La semilla de referencia que comprende el evento de élite EE-GM2 se depositó como 32CON0688 en el NCIMB (Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen AB9YA, Scotland) el 12 de octubre de 2009, con el número de acceso NCIMB 41660 en el NCIMB. Un nombre alternativo para EE-GM2 es LL55, A5547-127, o ACS-GMØ6-4.

La semilla de referencia que comprende el evento de élite EE-GM3 y EE-GM1 se depositó como soja 111606 en la ATCC (American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, Va. 20110-2209, USA) el 11 de junio de 2010, con el número de acceso de la ATCC PTA-11041.

La semilla de referencia que comprende el evento de élite EE-GM3 y EE-GM2 se depositó como soja 05SHX2XEB en la ATCC (American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, Va. 20110-2209, USA) el 11 de junio de 2010, con el número de acceso de la ATCC PTA-11042.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Bayer Bioscience N.V.

55 M.S Technologies LLP

MASON Justin Thomas

- LETTOW Leslie James
EBY Mark Alan
EBY William H.
WELZ Gunter
- 5 VERHAEGHE Steven
DE BEUCKELEER Marc
HABEX veerle
FERRULO Jean-Marc
<120> Plantas de soja tolerantes a herbicidas, y métodos para identificarlas
- 10 <130> BCS 09-2010
<140> tba
<141> 2010-11-23
<150> 09014565.7
<151> 2009-11-23
- 15 <150> 61/263,707
<151> 2009-11-23
<150> 61/367,251
<151> 2010-07-23
<160> 22
- 20 <170> PatentIn version 3.3
<210> 1
<211> 7296
<212> ADN
<213> Artificial
- 25 <220>
<223> fragmento Sall del vector pSF10
<220>
<221> terminador
<222> (188)..(479)
- 30 <223> 3'nos: secuencia que incluye la región no traducida 3' del gen de nopalina sintasa del T-ADN de pTiT37 de Agrobacterium tumefaciens -complementaria
<220>
<221> característica diversa
<222> (480)..(1556)
- 35 <223> hppdPf W336: la secuencia codificante de la 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa de la cepa A32 de Pseudomonas fluorescens modificada mediante sustitución del aminoácido Glicina 336 por un triptófano - complementaria
<220>

- <221> péptido de tránsito
 <222> (1557)..(1928)
 <223> TPotp Y: secuencia codificante de un derivado de péptido de tránsito optimizado (la posición 55 se cambió a tirosina), que contiene la secuencia de los genes de la subunidad pequeña de RuBisCO de Zea mays (maíz) y Helianthus annuus (girasol)-complementaria
- 5 <220>
 <221> 5'UTR
 <222> (1929)..(2069)
 <223> 5'tev: secuencia que incluye la secuencia líder del virus del grabado del tabaco - complementaria
- 10 <220>
 <221> promotor
 <222> (2070)..(3359)
 <223> Ph4a748 ABBC: secuencia que incluye la región promotora del gen de histona H4 de Arabidopsis thaliana, que contiene una duplicación interna - complementaria
- 15 <220>
 <221> promotor
 <222> (3360)..(4374)
 <223> Ph4a748: secuencia que incluye la región promotora del gen de histona H4 de Arabidopsis thaliana
- <220>
- 20 <221> intrón
 <222> (4375)..(4855)
 <223> intrón1 h3At: primer intrón del gen II de la variante de histona H3.III de Arabidopsis thaliana
- <220>
 <221> péptido de tránsito
- 25 <222> (4856)..(5227)
 <223> TPotp C: secuencia codificante del péptido de tránsito optimizado, que contiene la secuencia de los genes de la subunidad pequeña de RuBisCO de Zea mays (maíz) y Helianthus annuus (girasol)
- <220>
 <221> característica diversa
- 30 <222> (5228)..(6565)
 <223> 2mepsps: la secuencia codificante del gen mutante doble de la 5-enol-piruvilshikimato-3-fosfato sintasa de Zea mays (maíz) (Lebrun et al., 1997)
- <220>
 <221> terminador
- 35 <222> (6566)..(7252)
 <223> 3'histonAt: secuencia que incluye la región on traducida 3' del gen de histona H4 de Arabidopsis thaliana (chabouté et al., 1987)

ES 2 623 923 T3

<400> 1
gtcgcactcta gcagatctgg ccggcccacc ggtgggcat atgggcccgc ggccgcgaat 60
tcgagctcgg tacctacctg gcgaaagggg gatgtgctgc aaggcgatta agttgggtaa 120
cgccagggtt ttcccagtcg cgacgttgta aaacgacggc cagtgaattg cggccgcaat 180
tcccgatcta gtaacataga tgacaccgcg cgcgataatt taccctagtt tgccgctat 240
atthtgtttt ctatcgcgta ttaaatgtat aattgcggga ctctaatacat aaaaacccat 300
ctcataaata acgtcatgca ttacatgtta attattacat gcttaacgta attcaacaga 360
aattatatga taatcatcgc aagaccggca acaggattca atcttaagaa actttattgc 420
caaatgtttg aacgatcggg gaaattcgtc gagtcaccct cggccgggct ttttgacgct 480
taatcggcgg tcaatacacc acgacgcacc tggtcacgtt cgatggactc gaacagcgcc 540
ttgaagtcc actcgccaaa cccatcgtcg cccttgcgct ggatgaattc gaagaacacc 600
gggcccatac gggtttccga gaagatctgc agcagcaggc gtttgcgccc ttccacggaa 660
gatccgtcca gcaggatacc gcgtgcctgc agttgatcca ccggctcgcc gtggtcaggc 720
aggcggcctt cgagcatttc gtaataagtg tctggcggcg cggatcatgaa gcgcatgccg 780
atthtcttca acgcttccca ggtcttgacc aggtcgtcgg tgaggaacgc cacgtgctgg 840
atgccttcgc cgttgaactg catcaggaac tcttcgatct gccccgcgcc ctgggacgac 900
tcttcgttca gcgggatgcg gatcatgccg tccggcgcac tcatggcctt ggaagtcagg 960
ccggtgtact cgcccttgat atcgaagtaa cgcgcttcac ggaagttgaa caatthtctc 1020
tagaagttgg cccagtagac catgcggcgg cgatagacgt tgtgggtcag gtggtcgatg 1080
actthtgagac ctgcaccgac cggattgctc tccacacctt cgaggtacac gaagtcgatg 1140
tcgtagatcg agctgccttc gccgaaacgg tcgatcaggt acaacggcgc gccgccgatg 1200
cccttgatcg ccggcagggt caatthcatc ggcccgggtg caatatggat cggctggggc 1260
ccgagttcca gggcgcgggt gtaggccttt tgcgagtcct tcacgcggaa cgccatgccg 1320
cacaccgacg ggcctgtgtc ggccgcaaag taggaggcga tgctgttggg ctggttgttg 1380
aggatcaggt tgatctcgcc ctggcggtac aggtgcacgt tcttggaaacg gtgggtcgcg 1440
actthtggtga agcccatgat ctcgaagatc ggctccaggg taccggcgt cggcgcgcg 1500
aattcgatga attcaaagcc catcaggccc attgggtttt cgtatagatc tgccatgcac 1560
cggatccttc cgccgttgct gacgttgccg aggtctctgg aggagcggcg ggcgacgggg 1620
aggctggcgg tggacttgag cccctggaac ggagcgcagg cggtgccga cgaggccatc 1680
atcacggtgg gcgccataga cagcggcggc aggtacgaca gcgtctcga cttctgttg 1740
ccgtaggccg gccacacctg catatattga actcttcac cgttgctggg aagggtggag 1800
aagtcgttag cttcttggt ggtggggaag gcggcggttg acttaaggcc ggtgaacgga 1860
gccaccatgt tggcctgagc aggggcggtc cggttaacgg tcgcgactga ggaggagatc 1920
gaagccatgg ctatcgttcg taaatggtga aaatthcag aaaattgctt ttgctthaaa 1980
agaaatgatt taaattgctg caatagaagt agaattgctt attgcttgag attcgthtgt 2040
thtgtatatg thtgtthtgc aattctagag tcgagagaaa thgatgtctg tagaagaaga 2100
agaacggtta agagtagatt tgggtgagaa agatgtgaaa thgtthttat aggcaaagac 2160
ggagagtcta thttthgagc aatcagatcg catatthaat ctaacggctg agatatcgat 2220
ccgtgtgtac aataaaatga tgtataaac gtcgatctgt thtaatcgac ggttcatatt 2280

ES 2 623 923 T3

agtgatccgc gtgatggcag tgatagccac taagaatcgt cttttgtttt acatgtggcg 2340
 ccacaaatta gggtaatgaa gcggcaatat tttggaactc ggaaaataaa attgcgccat 2400
 cacattattt gaaaattttc acatgctttt attttaaaaa cccacgaatt acaagttaca 2460
 accgaaaaag atttataata tagtgattta tactaatttt gtagtagctt aatgtatatt 2520
 gatactggaa aaacaatgac aatcatacga tccgtgtgta caataaaatg atgtataaac 2580
 cgtcgatctg ttttaatcga cggttcatat tagtgatccg cgtgatggca gtgatagcca 2640
 ctaagaatcg tctttgtttt tacatgtggc gccacaaatt agggtaatga agcggcaata 2700
 ttttggaact cggaaaataa aattgcgcca tcacattatt tgaaaatttt cacatgcttt 2760
 tatttttaaaa acccacgaat tacaagttac aaccgaaaaa gatttataat atagtattt 2820
 atactaattt ttagtagctt taatgtatat tgatactgga aaaacaatga caatcatatg 2880
 ttagtattat caagttatcg tattgatatt gatattggaa catacaatgg gtattgcctt 2940
 ctttcgacca taaatatcac caaatttaca aagtttgtgt ataccaagtt atcaattgta 3000
 aatgggatgt caacatttta atttcccttt gagaaactat agaccacaag aacacacttc 3060
 aatagataaa gtaactatth acataagagg ttttaaaatc acattaacaa aaataattac 3120
 caaccggcac tcacaaatac aaacagagca cacgacatgt caaagccaca agtaaattcg 3180
 ttgagtggcg gtttcattac aattgtgtca cttgcagcac aaactatctt gctctgggaa 3240
 tcatctcagc atcaaagatc atgctcactt caggggaact tagtgtatcc atgcctcgac 3300
 tcatatttct cctcgacctg caggcatgca agctctagag cggccgccac cgcggtggag 3360
 gtactcgagt cgcgacgtac gttcgaacaa ttggttttaa aagcttgcat gcctgcaggt 3420
 cgaggagaaa tatgagtcga ggcattggata cactaagttc ccctgaagtg agcatgatct 3480
 ttgatgctga gatgattccc agagcaagat agtttgtgct gcaagtgaca caattgtaat 3540
 gaaaccacca ctcaacgaat ttacttgtgg ctttgacatg tcgtgtgctc tgtttgtatt 3600
 tgtgagtgcc ggttggaat tatttttgtt aatgtgattt taaaacctct tatgtaaata 3660
 gttactttat ctattgaagt gtgttcttgt ggtctatagt ttctcaaagg gaaattaaaa 3720
 tgttgacatc ccatttacia ttgataactt ggtatacaca aactttgtaa atttggatg 3780
 atttatggtc gaaagaaggc aataccattt gtatgttcca atatcaatat caatacgata 3840
 acttgataat actaacatat gattgtcatt gtttttccag tatcaatata cattaagcta 3900
 ctacaaaatt agtataaatc actatattat aaatcttttt cggttgtaac ttgtaattcg 3960
 tgggttttta aaataaaagc atgtgaaaat tttcaaataa tgtgatggcg caattttatt 4020
 ttccgagttc caaaatattg ccgcttcatt accctaattt gtggcgccac atgtaaaaca 4080
 aaagacgatt cttagtggct atcactgcca tcacgcggat cactaatatg aaccgtcgat 4140
 taaaacagat cgacggttta tacatcattt tattgtacac acggatcgat atctcagccg 4200

ES 2 623 923 T3

ttagatttaa tatgcatct gattgctcaa aaaatagact ctccgtcttt gcctataaaa 4260
 acaatttcac atctttctca cccaaatcta ctcttaaccg ttcttcttct tctacagaca 4320
 tcaatttctc tcgactctag aggatccaag cttatcgatt tcgaaccctt caggcgaaga 4380
 acaggtatga tttgtttgta attagatcag gggtttaggt ctttccatta ctttttaatg 4440
 ttttttctgt tactgtctcc gcgatctgat tttacgacaa tagagtttctg ggttttgtcc 4500
 cattccagtt tgaataaaa ggtccgtctt ttaagtttgc tggatcgata aacctgtgaa 4560
 gattgagctt agtcgattta ttggatgatc cattcttcat cgttttttct ttgcttcgaa 4620
 gttctgtata accagatttg tctgtgtgcg attgtcatta cctagccgtg tatcgagaac 4680
 tagggtttct gagtcaattt tgcccccttt ggttatatct ggttcgataa cgattcatct 4740
 ggattagggg ttaagtggg gacgtttagt attccaattt cttcaaaatt tagttatgga 4800
 taatgaaaa cccaattga ctgttcaatt tcttgttaa tgcgcagatc cccatggctt 4860
 cgatctctc ctcatgctcg accgttagcc ggaccgcccc tgctcaggcc aacatgggtg 4920
 ctccgttcac cggccttaag tccaacgccc cttccccac caccaagaag gctaacgact 4980
 tctccacct tccagcaac ggtggaagag ttcaatgtat gcagggtggt ccggcctacg 5040
 gcaacaagaa gttcgagacg ctgtcgtacc tgccgcccgt gtctatggcg cccaccgtga 5100
 tgatggcctc gtcggccacc gccgctgctc cgttccaggg gctcaagtcc accgccagcc 5160
 tccccgtcg cgcgctcc tccagaagcc tcggcaacgt cagcaacggc ggaaggatcc 5220
 ggtgcatggc cggcgccgag gagatcgtgc tgcagcccat caaggagatc tccggcaccg 5280
 tcaagctgcc ggggtccaag tcgctttcca accggatcct cctactcgcc gccctgtccg 5340
 aggggacaac agtggttgat aacctgctga acagtgagga tgtccactac atgctcgggg 5400
 ccttgaggac tcttggctc tctgtcgaag cggacaaagc tgccaaaaga gctgtagttg 5460
 ttggctgtgg tggaaagtcc ccagttgagg atgctaaaga ggaagtgcag ctcttcttgg 5520
 ggaatgctgg aatcgcaatg cggtccttga cagcagctgt tactgctgct ggtggaaatg 5580
 caacttacgt gcttgatgga gtaccaagaa tgagggagag acccattggc gacttgggtg 5640
 tcggattgaa gcagcttggg gcagatgttg attgtttcct tggcactgac tgcccacctg 5700
 ttcgtgtcaa tggaaatcga gggctacctg gtggcaaggc caagctgtct ggctccatca 5760
 gcagtcagta cttgagtgcc ttgctgatgg ctgctcctt ggctcttggg gatgtggaga 5820
 ttgaaatcat tgataaatta atctccattc cgtacgtcga aatgacattg agattgatgg 5880
 agcgttttgg tgtgaaagca gagcattctg atagctggga cagattctac attaaggag 5940
 gtcaaaaata caagtcccct aaaaatgcct atgttgaagg tgatgcctca agcgaagct 6000
 atttcttggc tgggtctgca attactggag ggactgtgac tgtggaagg tgtggcacca 6060

ES 2 623 923 T3

ccagtttgca gggatgatgtg aagtttgctg aggtactgga gatgatggga gcaagggtta 6120
 catggaccga gactagcgtg actgttactg gcccaccgag ggagccattt gggaggaaac 6180
 acctcaaggc gattgatgtc aacatgaaca agatgacctga tgtcgccatg actcttgctg 6240
 tggttgccct ctttgccgat ggcccgacag ccatcagaga cgtggcttcc tggagagtaa 6300
 aggagaccga gaggatggtt gcatccgga cggagctaac caagctggga gcatctggtt 6360
 aggaagggcc ggactactgc atcatcacgc cgccggagaa gctgaacgtg acggcgatcg 6420
 acacgtacga cgaccacagg atggcgatgg ctttctccct tgccgcctgt gccgaggtcc 6480
 ccgtcaccat ccgggaccct gggatgcacc ggaagacctt ccccactac ttcgatgtgc 6540
 tgagcacttt cgtcaagaat taagctctag aactagtgga tccccgatc cgcgtttgtg 6600
 tttctggtt ttctcactta agcgtctgag ttttactttt gtattgggtt tggcgtttag 6660
 tagtttgcgg tagcgttctt gttatgtgta attacgcttt ttcttcttgc ttcagcagtt 6720
 tcggttgaaa tataaatcga atcaagttt actttatcag cgttgtttta aattttggca 6780
 ttaaattggt gaaaattgct tcaattttgt atctaataag aagagacaac atgaaattcg 6840
 acttttgacc tcaaatcttc gaacatttat ttcttgattt cacgatggat gaggataacg 6900
 aaaggcggtt tcctatgtcc gggaaagttc ccgtagaaga caatgagcaa agctactgaa 6960
 acgcggacac gacgtcgcag tggtagcgat atgagttaa cccgactcaat tcctttatta 7020
 agacataaac cgattttggt taaagtgtaa cagttagctg atataaaacc gaaacaaacc 7080
 ggtacaagtt tgattgagca acttgatgac aaacttcaga attttggtta ttgaatgaaa 7140
 atcatagtct aatcgtaaaa aatgtacaga agaaaagcta gagcagaaca aagattctat 7200
 attctggttc caatttatca tcgctttaac gtcctcaga tttgatcggg ctgcaggaat 7260
 taaacgcccg ggcacgtggg atcctctaga gtcgac 7296

<210> 2

<211> 1843

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> región de flanco 5' del ADN extraño que comprende genes de tolerancia a herbicida en EE-GM3

<220>

<221> característica diversa

10 <222> (1)..(1451)

<223> ADN vegetal flanqueante 5'

<220>

<221> característica diversa

<222> (1452)..(1843)

15 <223> ADN de inserto o extraño

<400> 2

ES 2 623 923 T3

gacttccatg tctagattca ttgtactaag atttcaaacg atatatatat atatatatat 60
 atatatattc aattacatct ttttcaaaaa acatatatgc atcgtatfff ctaatacatt 120
 tttttatata tgttattagt taaaatttat taaaaatcat aaaattaagt aagtttcaca 180
 taacatccaa tgattttctc gtaattttaa gactggacta aagaatatag tagtaacact 240
 tctcttcaaa taatatactt tatttgcccg aggaatagca ttgccatatt gaactattag 300
 gaaagctgaa catcaattgg tacacttggg tggttccac ggtttattat tgtctacatc 360
 tggatcatcca agcagagggtt atatcttcta taactcgaca aatcttcgtt gtgcctatat 420
 agagttgctt gtacgactaa aacgcttata ataatcgtta tacaatctat gattcacagt 480
 tatgatacgt gtatgcaata aatgaataga tagataaata tgatacaatt atacaattat 540
 tctaaaatat atagaataca atatatgtat gtataaaaaa ttcataaaac accaataagc 600
 atataattgc aattttgcaa aaccaaatta agaataaac tcaaataatta ctagaacaa 660
 aaaaaattat aaatcattgt cttcataaat taattctaag tatctacaaa tagaaataat 720
 atgaatttta tataaaaaag taatataaat tttattcctt tcttaaatat atgaaaaata 780
 atacttctat atttctatac atgtttctat acatgctgtt caatgtctga tagtgatagg 840
 aaactctact gtattttcaa aagttttttt ttgtttaaat atatfttttg tcatgtaatt 900
 gtgtgtgttt tcatttacgt ccatgtaaaa agaaaatatt ttagttctat taaaatattt 960
 tttttatttt ttatccttaa aatactttaa ataatafttt ttcctattta aagcattttt 1020
 tataatttaa agcgtatttt aaaacgtttt tagaataaaa acataaaaca aacacatttt 1080
 aaaatgattg aaatgaaaaa taaaactaat gaaaacgaaa acaatactaa attacaggaa 1140
 agaaaaatat attcaaacct ttatgtttaa aggtttttga atatfttctt gattcgtttg 1200
 aaatatgtga agaaaattaa aatatcaagt agtaggttac aacagttcgg gtgcaacagt 1260
 gactatgaca gcaagataat agggccaata tatttgata cctctcttaa gacgtaaaca 1320
 ttttgagcga gaaaataatg gaaaaaaat aagtcattca aatgataata gatataataa 1380
 ttatftttta ttttaaatat cttattaata tttttatttt tttatcatat tataaattat 1440
 attatattta tgtagctttg ctcatgtctt tctacgggaa ctttcccgga cataggaacc 1500
 gccctttcgt tatcctcatc catcgtgaaa tcaggaaata aatgttcgaa gatttgaggt 1560
 caaaagtcga atttcatgtt gtctcttcta tttagataca aaattgaagc aatfttcacc 1620
 aatftaatgc caaaatttaa aacaacgctg tcctgatttc acgatggatg aggataacga 1680
 aagggcgggt cctatgtccg ggaaagttcc cgtagaagac aatgagcaa gctactgaaa 1740
 cgcggacacg acgtcgcatt ggtacggata tgagttaaac cgactcaatt cttttattaa 1800
 gacataaacc gattttggtt aaagtgtaac agtgagctga tat 1843

<210> 3

<211> 1408

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> secuencia flanqueante 3' de ADN extraño que comprende genes de tolerancia a herbicida en EE-GM3

<220>

<221> característica diversa

ES 2 623 923 T3

<222> (1)..(240)

<223> ADN de inserto o extraño

<220>

<221> característica diversa

5 <222> (241)..(1408)

<223> ADN vegetal

<400> 3

taacagtgag ctgatataaa accgaaacaa accggtacaa gtttgattga gcaacttgat	60
gacaaacttc agaatttttg ttattgaatg aaaatcatag tctaactgta aaaaatgtac	120
agaagaaaag ctagagcaga acaagattc tatattctgg ttccaattta tcatcgcttt	180
aacgtccctc agatttgatc gggctgcagg aattaatgtg gttcatccgt ctttttgta	240
atgcggtcat caatacgtgc ctcaaagatt gccaaataga ttaatgtggt tcatctccct	300
atatgttttg cttgttggat tttgctatca catgtttatt gctccaaact aattataata	360
aatgacttt caaatgattg gtgttgacat tcttttcaaa ttgttcgctg aagaaaagat	420
aatctcgagg ctttgatttg ttaatgcttt cattaataaa taaataaaat aactctttcc	480
aaatttcaat tcatgccttt atattgtgtg gttcatcctc atcttatgtc actattatca	540
tttcatgttt gagactttac ttggccatat ttgagaagac cttcttcatt ataggcaatt	600
ttatctccac aataatataa gagaatatct tgaattaata attattgagg atatattata	660
gggttctatg tggaactaaa gacatggta cccattaag agagagtata gaggaattac	720
ttttatttgc cacgaggcga cgcgacttgt atttattttg gaattgtact tttgcgtgag	780
cagtgtggct ctatgttggg gcctccactt gttggtgttt tatatatgtg aaaggaggat	840
gagggatgat gttcatttct ttgcattatt tttgttattc gcgcgaatga tatatgccct	900
gtttttgaag attgataggg aagtccatat ataggaattg aagtgtcaaa aggggtgtgag	960
tatgtgctat gataatcacc caattaatgt acatctggtg tgggtgttga atttgtaggt	1020
cattaattaa tattcctctt ggtgaagttt ggagtctttt tgcaattaca attctgtttt	1080
gtaagtgatt atgatggact ttagatggt tctcaaacag taggtgtaaa gaaaaatggg	1140
ccctggatg aaaatttggt ttcactcttt ctcatcata tctttaaaaa aagaatgata	1200
attttgtaat aaaaataaaa aatatataaa tttttctca aatcaaacaa cttttatttt	1260
ttatgccaac aataattttg ttaaagatgg agatttcaat tattatataa gagttcatta	1320
tagttgaaaa ttgaatgaat gtatatgttt acgttttttg tctcaagtga aactaagatc	1380
aaatattcat atctattgag ctggtctt	1408

10 <210> 4

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> cebador SOY028

<400> 4

atcgctttaa cgtcctcag 20

ES 2 623 923 T3

<210> 5
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> cebador SOY029
 <400> 5
 caaggcctcg agattatc 18
 <210> 6
 10 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador SMP187
 15 <400> 6
 atatcaacc gtagctcgac 20
 <210> 7
 <211> 23
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador STV019
 <400> 7
 ggcattaaat tggtgaaaat tgc 23
 25 <210> 8
 <211> 263
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> secuencia nucleotídica del amplicón de PCR que usa los cebadores SOY028 - SOY029
 <400> 8
 atcgctttaa cgtccctcag atttgatcgg gctgcaggaa ttaatgtggt tcatccgtct 60
 ttttgttaat gcggtcatca atacgtgcct caaagattgc caaatagatt aatgtggttc 120
 atctccctat atgttttgct tgttgattt tgctatcaca tgtttattgc tccaaactaa 180
 ttataataaa atgactttca aatgattggt gttgacattc ttttcaaatt gttcgctgaa 240
 gaaaagataa tctcgaggcc ttg 263
 <210> 9

ES 2 623 923 T3

<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
5 <223> cebador 1 para la amplificación del fragmento de control (SOY01)
<400> 9
gtcagccaca cagtcctat 20
<210> 10
<211> 20
10 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> cebador 2 para la amplificación del fragmento de control (SOY02)
<400> 10
15 gttaccgtac aggtcttcc 20
<210> 11
<211> 4076
<212> ADN
<213> Artificial
20 <220>
<223> secuencia nucleotídica de pB2/P35SAcK
<220>
<221> promotor
<222> (461)..(1003)
25 <223> secuencia del promotor Camv35S
<220>
<221> característica diversa
<222> (1004)..(1011)
<223> secuencia codificante sintética para fosfinoacetiltransferasa
30 <220>
<221> característica diversa
<222> (1582)..(1784)
<223> terminador de CaMV 35S
<400> 11
35 tcgcgcggtt cggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca 60

ES 2 623 923 T3

cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg	120
ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc	180
accatatgca aacaaacata cacagcgact tatgctcaaa ttacaacggt atatatcctg	240
ccacatatgc ggtgtgaaat accgcacaga tgcgtaagga gaaaataccg catcaggcgc	300
cattcgccat tcaggctgcg caactgttgg gaagggcgat cgggtgcggc ctcttcgcta	360
ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagtgggt aacgccaggg	420
ttttcccagt cagcagcttg taaaacgacg gccagtgaat tcccatggag tcaaagattc	480
aaatagagga cctaacagaa ctcgccgtaa agactggcga acagttcata cagagtctct	540
tacgactcaa tgacaagaag aaaatcttcg tcaacatggt ggagcacgac acgcttgtct	600
actccaaaaa tatcaaagat acagtctcag aagaccaaag ggcaattgag acttttcaac	660
aaaggtaat atccggaaac ctctcggat tccattgcc agctatctgt cactttattg	720
tgaagatagt gaaaaggaa ggtggctcct acaaatgcca tcattgcgat aaaggaaagg	780
ccatcgttga agatgcctct gccgacagtg gtcccaaaga tggaccccca cccacgagga	840
gcatcgtgga aaaagaagac gttccaacca cgtcttcaaa gcaagtggat tgatgtgata	900
tctccactga cgtaagggat gacgcacaat cccactatcc ttcgcaagac ccttcctcta	960
tataaggaag ttcatttcat ttggagagga cagggatccc ggggatccac catgtctccg	1020
gagaggagac cagttgagat taggccagct acagcagctg atatggccgc ggtttgtgat	1080
atcgtaacc attacattga gacgtctaca gtgaacttta ggacagagcc acaaacacca	1140
caagagtgga ttgatgatct agagaggttg caagatagat acccttggtt ggttgctgag	1200
gttgaggggtg ttgtggctgg tattgcttac gctgggccct ggaaggctag gaacgcttac	1260
gattggacag ttgagagtac tgtttacgtg tcacataggc atcaaaggtt gggcctagga	1320
tccacattgt acacacattt gcttaagtct atggaggcgc aaggttttaa gtctgtgggtt	1380
gctgttatag gccttccaaa cgatccatct gttaggttgc atgaggcttt gggatacaca	1440
gccccgggta cattgcgcgc agctggatac aagcatggtg gatggcatga tgttggtttt	1500
tggcaaaggg attttgagtt gccagctcct ccaaggccag ttaggccagt taccagatc	1560
tgagtcgacc tgcaggcatg cccgctgaaa tcaccagtct ctctctacaa atctatctct	1620
ctctataata atgtgtgagt agttcccaga taaggaatt agggttctta tagggtttcg	1680
ctcatgtgtt gagcatataa gaaaccctta gtatgtattt gtatttgtaa aatacttcta	1740
tcaataaaat ttctaattcc taaaaccaa atccagggcg agctcgaatt cgagctcggg	1800
acccggggat cctctagagt cgacctgacg gcatgcaagc ttggcgtaat catggtcata	1860
gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgct cacaattcca cacaacatac gagccggaag	1920

ES 2 623 923 T3

cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaata agtgagctaa ctcacattaa ttgcgttgcg 1980
ctcactgccc gctttccagt cgggaaacct gtcgtgccag ctgcattaa gaatcggcca 2040
acgcgcgggg agaggcgggt tgcgtattgg gcgctcttcc gcttcctcgc tactgactc 2100
gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg cgtaatacgy 2160
gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa 2220
ggccaggaac cgtaaaaagg ccgctgttgc ggcgtttttc cataggctcc gccccctga 2280
cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga aaccgcagag gactataaag 2340
ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct 2400
taccggatac ctgtccgctt ttctcccttc gggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg 2460
ctgtaggtat ctcagttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc 2520
ccccgtttag cccgaccgct gcgccttata cgtaactat cgtcttgagt ccaaccgggt 2580
aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcagggta 2640
tgtaggcggg gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca ctagaagaac 2700
agtatttggg atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc 2760
ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cggtggtttt tttgtttgca agcagcagat 2820
tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc 2880
tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat tttggtcatg agattatcaa aaaggatctt 2940
cacctagatc cttttaaatt aaaaatgaag ttttaaatca atctaaagta tatatgagta 3000
aacttggctc gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct 3060
atctcgttca tccatagtty cctgactccc cgtcgtgtag ataactacga tacgggaggg 3120
cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac ccacgctcac cggctccaga 3180
tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc agaagtggtc ctgcaacttt 3240
atccgcctcc atccagtcta ttaattgtyt ccgggaagct agagtaagta gttcgccagt 3300
taatagttty cgcaacgtyt ttgccattgc tacaggcatc gtggtgtcac gctcgtcgtt 3360
tggtatggct tcattcagct ccggttccca acgatcaagg cgagttacat gatccccat 3420
gttgtgcaaa aaagcggtya gtccttcggy tcctccgatc gttgtcagaa gtaagttggc 3480
cgcagtgtta tcaactcaggy ttatggcagc actgcataat tctcttactg tcatgccatc 3540
cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagty ctcaaccaag tcattctgag aatagtytat 3600
gcggcgaccg agttgctctt gcccgcgtyc aatacgggat aataccgtyc cacatagcag 3660
aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacy ttcttcgggy cgaaaactct caaggatctt 3720
accgctgtyt agatccagty cgatgtaacc cactcgtgca cccaactgat cttcagcatc 3780
tttactttc accagcgtty ctgggtgagc aaaaacaggy aggcaaatg ccgcaaaaaa 3840
gggaataagg gcgacacggy aatgtytaat actcactatc ttcctttttc aatattatgy 3900
aagcatttat caggyttatt gtctcatgag cggatacata tttgaatgta tttagaaaaa 3960
taaacaataa ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagty ccacctgagc tctaagaaac 4020
cattattatc atgacattaa cctataaaaa taggcgtatc acgagccctt ttcgtyc 4076

<210> 12

<211> 720

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

ES 2 623 923 T3

- <223> secuencia nucleotídica que comprende la región 5' que flanquea al ADN extraño en EE-GM1
- <220>
- <221> característica diversa
- <222> (1)..(209)
- 5 <223> ADN vegetal
- <220>
- <221> característica diversa
- <222> (210)..(720)
- <223> ADN extraño
- 10 <400> 12
- | | |
|--|-----|
| gagaagaaaa aggaaggcat taagagaccc tcctggcaca accctagaca ctctaagatc | 60 |
| ctttttcaaa cctgctccca ccatttcgag tcaagagata gataaataga cacatctcat | 120 |
| tgcaccgatc gggggcgttc gtagtgactg agggggtaa agaccaagaa gtgagttatt | 180 |
| tatcagccaa gcattctatt cttcttatgt cgggtcgggc ctcttcgcta ttacgccagc | 240 |
| tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagtgggt aacgccaggg ttttccagt | 300 |
| cacgacgttg taaaacgacg gccagtgaat tcccatggag tcaaagattc aaatagagga | 360 |
| cctaacagaa ctcgccgtaa agactggcga acagttcata cagagtctct tacgactcaa | 420 |
| tgacaagaag aaaatcttcg tcaacatggt ggagcacgac acgcttgct actccaaaa | 480 |
| tatcaaatgac acagtctcag aagaccaaag ggcaattgag acttttcaac aaagggtaat | 540 |
| atccggaaac ctctcggat tccattgccc agctatctgt cactttattg tgaagatagt | 600 |
| ggaaaaggaa ggtggctcct acaaatgcca tcattgcatg aaaggaaagg ccatcggtga | 660 |
| agatgcctct gccgacagtg gtcccaaaga tggaccccca cccacgagga gcatcggtga | 720 |
- <210> 13
- <211> 1000
- <212> ADN
- 15 <213> Artificial
- <220>
- <223> secuencia nucleotídica que comprende la región 3' que flanquea al ADN extraño en EE-GM1
- <220>
- <221> característica diversa
- 20 <222> (1)..(568)
- <223> ADN extraño
- <220>
- <221> característica diversa
- <222> (569)..(1000)
- 25 <223> ADN vegetal
- <400> 13

ES 2 623 923 T3

```

ttcgggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg ttcagcccga      60
ccgctgcgcc ttatccggtg actatcgtct tgagtccaac ccggtgaagac acgacttatc      120
gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac      180
agagtctctg aagtgggtgc ctaactacgg ctacactaga agaacagtat ttggtatctg      240
cgctctgctg aagccagtta ccttcggaaa aagagttggt agctcttgat ccggcaaaca      300
aaccaccgct ggtagcggtg gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa      360
aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacgggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa      420
ctcacgtaa gggatttttg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt      480
aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat gagtaactt ggtctgacag      540
ttaccaatgc ttaatcagtg aggcaccttt aatctagatg atctgtctca actttaccaa      600
aagttttgag cacatgtttg gattcacctt aaataatcta aaatcacagc ttgtttgatc      660
ccaaaggagt taattctaag taaaattgat tgagttaaaa caattgtgtt agatagagaa      720
atcttctttg aataaaaaaca tctagacaca aatcatttca cttcaaaata attttaaaca      780
aaataaattt tgcaattcat tcatcacaac aaacatttga attaactata atcaattcaa      840
attgttacag tgtgttgcac tcatatcatt cctaataagt ctacattaaa gattaagagt      900
gagaatgaga ggaagagaga acggtttcag ggtaaacctt ttgtttgtaa gaaccatcaa      960
acagtggaac cggatcatcc ttgctgcaaa acatagcttt      1000

```

<210> 14

<211> 810

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> secuencia nucleotídica que comprende la región 5' que flanquea al ADN extraño en EE-GM2

<220>

<221> característica diversa

10 <222> (1)..(311)

<223> ADN vegetal

<220>

<221> característica diversa

<222> (312)..(810)

15 <223> ADN extraño

<400> 14

ES 2 623 923 T3

```

gtcatcgtcg tcgcgctgga gttcttgtgg tgccgctggt cgcactggag tttgggtgtt    60
gttgttcatg cttgctgctgc taatccccctt ttgtatgcga aaatcggggt tgggtcgggt   120
cgggtcagcc caacacgacc taatttgtgt tacgaaaatt tcaacaaaaa aaaaaagtta   180
tcttccgcca ttatcgccat tccgccacga tcattaaggc tatggcggcc gcaatggcgc    240
cgccatatga aacccgcaat gccatcgcta tttggtggca tttttccaaa aacccgcaat   300
gtcataacct catcgttgtc agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc atggttatgg   360
cagcactgca taattctctt actgtcatgc catccgtaag atgcttttct gtgactgggt   420
agtactcaac caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc tcttgcccgg   480
cgtcaatacg ggataatacc gcgccacata gcagaacttt aaaagtgtc atcattggaa   540
aacgttcttc ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt   600
aacccactcg tgcacccaac tgatcttcag catcttttac tttcaccagc gtttctgggt   660
gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggaa aacgccaggg ttttcccagt   720
cacgagttg taaaacgacg gccagtgaat tccatggag tcaaagattc aaatagagga   780
cctaacagaa ctcgccgtaa agactggcga                                     810

```

<210> 15

<211> 1880

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> secuencia nucleotídica que comprende la región 3' que flanquea al ADN extraño en EE-GM2

<220>

<221> característica diversa

10 <222> (1)..(507)

<223> ADN extraño

<220>

<221> característica diversa

<222> (508)..(1880)

15 <223> ADN vegetal

<400> 15

```

cttttaaatt aaaaatgaag ttttaaata atctaaagta tatatgagta aacttggctt    60
gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct atttcgttca   120
tccatagttg cctgactccc cgtcgtgtag ataactacga tacgggaggg cttaccatct   180

```

ES 2 623 923 T3

ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac ccacgctcac cggctccaga tttatcagca 240
 ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc 300
 atccagtcta ttaattgttg ccgggaagct agagtaagta gttcgccagt taatagtttg 360
 cgcaacgttg ttgccattgc tacaggcatc gtggtgtcac gctcgtcgtt tggtaggct 420
 tcattcagct ccggttccca acgatcaagg cgagttacat gatccccat gttgtgcaaa 480
 aaagcggtta gctccttcgg tcctccgatg gcaccgccat aaccacaatt taacaacttt 540
 ataaatgact tagtatatta gcaatttatac ttgtcacatg cacatatttt ataactataa 600
 taggagtttg agtttaaag atgtaatgaa ttttggattg catgttgttt tgtactatat 660
 tggtagcttt ttccaatgaa gtgttaaatt tgtatttttc atattcaggg tcacgtttga 720
 ctttctctag tcaactgccct aattaagccc tttctcttgc actcttgatg cttacttaac 780
 ctgggcatca ggcatatgta atgttatcaa tcaactatc acgtttcatg catttattaa 840
 tcttcattga tggccttgtc tcgctcttgc ccctttttcc aatttatgct tcaaatcttt 900
 gacatgttcc atgtccttat tccttttctc tgtaactggt cattttcgtt atgaaccatg 960
 aagataaact actattgtta aagtctcggg tcaaatttaa cttttctgct tttcccata 1020
 taattgaata agacttggtc gtggttggtc tcattgcata tacctttatt atatgcatag 1080
 aagtgtttt tttgcctaac ttgtacattt ttttatggca gtgatganga tgtagagagg 1140
 cttatcgagc ttgtgaaggg aatttcttgc aagattaatc taatctcatt caatccgcac 1200
 agtggatcat tcttcaaacc aaccaaatac gaaaggatga ttgaattccg aaatacattg 1260
 gctggggcag gattgatagt atttttaaga cttagtagag gtgatgatca attggcttcc 1320
 tgtggtcaat tgggtaagcc tggcaccatt caagctccat ttcttctgtg accagagcaa 1380
 ttccaaatgg caattggaag ttcaactga ttctttgtgg aggttctgtg gcaaattgat 1440
 cttacagtta ttaacgaaga attatatagg acacttgtgg tgggggtagc tagggatgac 1500
 ttcatactga caatgcaaga ccaagagcta aattaggggg atgtctgtct gttttcatat 1560
 tgtacttttc ctttttacag ttaattgata ttttttttt tattaatgtg acggatccag 1620
 attacttact ggctaagaaa taagaaataa aaatgattta aatataattt tagtcgaagt 1680
 ctgtattttt tagtttccca aattaaaatt tgcatttttt aatctctcat ttataaaatg 1740
 cttttttaag ttcttcttag ctgatttttg gcaacttggg tgcacaatgt gcaactatcg 1800
 taacaatatt tttcttgaag tttaaagaga ctaaaatata tgttttacca taactcat 1860
 gttagtataa ccattatttg 1880

<210> 16

<211> 20

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> cebador SOY06

<400> 16

ggcgttcgta gtgactgagg 20

10 <210> 17

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

ES 2 623 923 T3

<220>
 <223> cebador SOY 07
 <400> 17
 gttttacaac gtcgtgactg g 21
 5 <210> 18
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 10 <223> cebador SOY 09
 <400> 18
 tgtggftatg gcggtgccat c 21
 <210> 19
 <211> 21
 15 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> SOY 010
 <400> 19
 20 tgctacaggc atcgtggtgt c 21
 <210> 20
 <211> 17806
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> secuencia nucleotídica de un ADN extraño y secuencias vegetales de flanqueo en EE-GM3
 <400> 20
 gacttccatg tctagattca ttgtactaag atttcaaacg atatatatat atatatatat 60
 atatatatattc aattacatct ttttcaaaaa acatatatgc atcgtatattt ctaatacatt 120
 tttttatata tgttattagt taaaatttat taaaaatcat aaaattaagt aagtttcaca 180
 taacatccaa tgattttctc gtaattttaa gactggacta aagaatatag tagtaacact 240
 tctcttcaaa taatatactt tattttqcccq aqqaataqca ttqccatatt qaactattaq 300

ES 2 623 923 T3

gaaagctgaa catcaattgg tacacttggg tggttcccac ggtttattat tgtctacatc 360
 tggatcatcca agcagagggtt atatcttcta taactcgaca aatcttcggt gtgcctatat 420
 agagttgctt gtacgactaa aacgcttata ataatcgtta tacaatctat gattcacagt 480
 tatgatacgt gtatgcaata aatgaataga tagataaata tgatacaatt atacaattat 540
 tctaaaatat atagaataca atatatgtat gtataaaaaa ttcataaaac accaataagc 600
 atataattgc aattttgcaa aaccaaatta agaataaac tcaaatatta ctagaacaa 660
 aaaaaattat aaatcattgt cttcataaat taattctaag tatctacaaa tagaaataat 720
 atgaatttta tataaaaaag taatataaat tttattcctt tcttaaattt atgaaaaata 780
 atacttctat atttctatac atgtttctat acatgctgtt caatgtctga tagtgatagg 840
 aaactctact gtattttcaa aagttttttt ttgtttaaat atattttttg tcatgtaatt 900
 gtgtgtgttt tcatttacgt ccatgtaaaa agaaaatatt ttagttctat taaaatattt 960
 tttttatttt ttatccttaa aatactttaa ataataattt ttcctattta aagcattttt 1020
 tataatttaa agcgtattt aaaacgtttt tagaataaaa acataaaaca aacacatttt 1080
 aaaatgattg aaatgaaaa taaaactaat gaaaacgaaa acaatactaa attacaggaa 1140
 agaaaaatat attcaaacct ttatgtttaa aggtttttga atatttctct gattcgtttg 1200
 aaatatgtga agaaaattaa aatatcaagt agtaggttac aacagttcgg gtgcaacagt 1260
 gactatgaca gcaagataat agggccaata tatttggata cctctcttaa gacgtaaaca 1320
 ttttgagcga gaaaataatg gaaaaaaaaat aagtcattca aatgataata gatataataa 1380
 ttatttttta ttttaaatat cttattaata tttttatttt tttatcatat tataaattat 1440
 attatattta ttagctttg ctcatgtct tctacgggaa ctttcccgga cataggaacc 1500
 gcccttctgt taccctcatc catcgtgaaa tcaggaaata aatgttcgaa gatttgaggt 1560
 caaaagtcga atttcatggt gtctcttcta ttagatata aaattgaagc aattttcacc 1620
 aatttaatgc caaaatttaa aacaacgctg tcctgatttc acgatggatg aggataacga 1680
 aagggcgggt cctatgtccg ggaaagtcc cgtagaagac aatgagcaaa gctactgaaa 1740
 cgcgacacg acgtcgatt ggtacggata tgagttaaac cgactcaatt cttttattaa 1800
 gacataaacc gattttggtt aaagtgtaac agtgagctga tataaaaccg aaacaaccg 1860
 gtacaagttt gattgagcaa cttgatgaca aacttcagaa ttttggttat tgaatgaaaa 1920
 tcatagtcta atcgtaaaaa atgtacagaa gaaaagctag agcagaacaa agattctata 1980
 ttctggttcc aatttatcat cgctttaacg tcctcagat ttgatcgggc tgcaggaatt 2040
 aaacgcccg gcacgtggga tcctctagag tcgactctag cagatctggc cggcccaccg 2100
 gtgggccata tgggcccgcg gccgcgaatt cgagctcggg acctacctgg cgaaaggggg 2160

ES 2 623 923 T3

atgtgctgca aggcgattaa gttgggtaac gccagggttt tcccagtcac gacgttgtaa 2220
 aacgacggcc agtgaattgc ggccgcaatt cccgatctag taacatagat gacaccgcg 2280
 gcgataattt atcctagttt gcgcgctata ttttgttttc tatcgcgtat taaatgtata 2340
 attgcgggac tctaatacata aaaacccatc tcataaataa cgtcatgcat tacatgttaa 2400
 ttattacatg cttaacgtaa ttcaacagaa attatatgat aatcatcgca agaccggcaa 2460
 caggattcaa tcttaagaaa ctttattgcc aaatgtttga acgatcgggg aaattcgtcg 2520
 agtcaccctc ggccgggctt tttgacgctt aatcggcggg caatacacca cgacgcacct 2580
 ggtcacgttc gatggactcg aacagcgcct tgaagttcca ctcgccaac ccatcgtcgc 2640
 ccttgcgctg gatgaattcg aagaacaccg ggccatcag ggtttccgag aagatctgca 2700
 gcagcaggcg tttgtcgctt tccacggaag atccgtccag caggataccg cgtgcctgca 2760
 gttgatccac cggtcgcggc tggtcaggca ggcggccttc gagcatttcg taataagtgt 2820
 ctggcggcgc ggtcatgaag cgcagtcgga ttttcttcaa cgcgtcccag gtcttgacca 2880
 ggctcgtcggg gaggaacgcc acgtgctgga tgccttcgcc gttgaactgc atcaggaact 2940
 cttcgatctg ccccgcgccc ttggacgact cttcgttcag cgggatgcgg atcatgccgt 3000
 ccggcgcact catggccttg gaagtcaggc cgggtgactc gcccttgata tcgaagtaac 3060
 gcgcttcacg gaagtgaac aatttctcgt agaagttggc ccagtagacc atgcggccgc 3120
 gatagacgtt gtgggtcagg tggtcgatga ctttgagacc tgcaccgacc ggattgcgct 3180
 ccacaccttc gaggtacacg aagtcgatgt cgtagatcga gctgccttcg ccgaaacggt 3240
 cgatcaggta caacggcgcg ccgccgatgc cttgatcgc cggcaggttc aattccatcg 3300
 gccgggtgct aatatggatc ggctgggcgc cgagttccag ggcgcggttg taggcctttt 3360
 gcgagtcctt cacgcggaac gccatgccgc acaccgacgg gccgtgttcg gccgcaaagt 3420
 aggaggcgat gctggtgggc tcggtgttga ggatcagggt gatctcgccc tggcgggtaca 3480
 ggtgcacggt cttggaacgg tgggtcgcga ctttggtgaa gccatgatc tcgaagatcg 3540
 gctccagggt acccggcgtc ggcgacgcga attcgatgaa ttcaaagccc atcaggccca 3600
 ttgggttttc gtatagatct gccatgcacc ggatccttcc gccgttgctg acgttgccga 3660
 ggcllctgga ggagcggcgg gcgacgggga ggctggcggg ggacttgagc ccctggaacg 3720
 gagcgacggc ggtggccgac gaggccatca tcacggtggg cgccatagac agcggcggca 3780
 ggtacgacag cgtctcgaac ttcttggtgc cgtaggccgg ccacacctgc atatattgaa 3840
 ctcttccacc gttgctggga agggtgagaa agtcggttagc cttcttggtg gtggggaagg 3900
 cggcgttgga ctttaaggccg gtgaacggag ccaccatggt ggcctgagca ggggcgggtcc 3960
 ggctaacggt cgcgactgag gaggagatcg aagccatggc tatcgttcgt aaatggtgaa 4020
 aattttcaaa aaattqctt tqtcttaaaa qaaatqattt aaattqctgc aataqaaqta 4080

ES 2 623 923 T3

gaatgcttga ttgcttgaga ttcgtttggt ttgtatatgt tgtgttgaga attctagagt 4140
 cgagagaaat tgatgtctgt agaagaagaa gaacgggtaa gagtagattt gggtagagaaa 4200
 gatgtgaaat tgtttttata ggcaaagacg gagagtctat tttttgagca atcagatcgc 4260
 atattaaatc taacggctga gatatcgatc cgtgtgtaca ataaaatgat gtataaacg 4320
 tcgatctggt ttaatcgacg gttcatatta gtgatccgcg tgatggcagt gatagccact 4380
 aagaatcgtc ttttgtttta catgtggcgc cacaaattag ggtaatgaag cggcaatatt 4440
 ttggaactcg gaaaaataaa ttgcgccatc acattatttg aaaattttca catgctttta 4500
 ttttaaaaac ccacgaatta caagttacaa ccgaaaaaga tttataatat agtgatttat 4560
 actaattttg tagtagctta atgtatatgt aactggaaa aacaatgaca atcataatcg 4620
 atccgtgtgt acaataaaat gatgtataaa ccgctgatct gttttaatcg acggttcata 4680
 ttagtgatcc gcgtgatggc agtgatagcc actaagaatc gtcttttggt ttacatgtgg 4740
 cgccacaaat tagggtaatg aagcggcaat attttggaa tcggaaaata aaattgcgcc 4800
 atcacattat ttgaaaattt tcacatgctt ttattttaaa aaccacgaa ttacaagtta 4860
 caaccgaaaa agatttataa tatagtgatt tatactaatt ttgtagtagc ttaatgtata 4920
 ttgataactgg aaaaacaatg acaatcatat gttagtatta tcaagttatc gtattgatat 4980
 tgatattgga acatacaatg ggtattgcct tctttcgacc ataaatatca ccaaatttac 5040
 aaagtttggt tataccaagt tatcaattgt aaatgggatg tcaacatttt aatttcctt 5100
 tgagaaacta tagaccacaa gaacacactt caatagataa agtaactatt tacataagag 5160
 gttttaaaat cacattaaca aaaataatta ccaaccggca ctcaaaata caaacagagc 5220
 acacgacatg tcaagccac aagtaaattc gttgagtggg ggtttcatta caattgtgtc 5280
 acttgacgca caaactatct tgctctgga atcatctcag catcaaagat catgctcact 5340
 tcaggggaac ttagtgtatc catgcctcga ctcatatttc tcctcgacct gcaggcatgc 5400
 aagctctaga gcggccgcca ccgcggtgga ggtactcgag tcgcgacgta cgttcgaaca 5460
 attggtttta aaagcttgca tgcctgcagg tcgaggagaa atatgagtcg aggcatggat 5520
 aactaaagt cccctgaagt gagcatgatc tttgatgctg agatgattcc cagagcaaga 5580
 tagtttggtc tgcaagtgac acaattgtaa tgaaaccacc actcaacgaa ttactttgtg 5640
 gctttgacat gtcgtgtgct ctgtttgtat ttgtgagtgc cggttggtta ttatttttgt 5700
 taatgtgatt ttaaacctc ttatgtaaat agttacttta tctattgaag tgtgttcttg 5760
 tggcttatag tttctcaaag ggaaatata atgttgacat cccatttaca attgataact 5820
 tggatacac aaactttgta aatttgggta tatttatggt cgaaagaagg caatacccat 5880
 tgtatgttcc aatatcaata tcaatcagat aacttgataa tactaacata tgattgtcat 5940

ES 2 623 923 T3

tgtttttcca gtatcaatat acattaagct ----- tagtataaat cactatatta 6000
 taaatctttt tcggttgtaa cttgtaattc gtgggttttt aaaataaaag catgtgaaaa 6060
 ttttcaaata atgtgatggc gcaattttat tttccgagtt ccaaaatatt gccgcttcat 6120
 taccctaatt tgtggcgcca catgtaaaac aaaagacgat tcttagtggc tatcaactgcc 6180
 atcacgcgga tcaactaatat gaaccgtcga ttaaacaaga tcgacggttt atacatcatt 6240
 ttattgtaca cacggatcga tatctcagcc gttagattta atatgcatc tgattgctca 6300
 aaaaatagac tctccgtctt tgcctataaa aacaatttca catctttctc acccaaactc 6360
 actcttaacc gttcttcttc ttctacagac atcaatttct ctcgactcta gaggatccaa 6420
 gcttatcgat ttcgaacccc tcaggcgaag aacaggtagt atttgtttgt aattagatca 6480
 ggggtttagg tctttccatt actttttaat gttttttctg ttactgtctc cgcgatctga 6540
 ttttacgaca atagagtttc gggttttgtc ccattccagt ttgaaaataa aggtccgtct 6600
 ttttaagttg ctggatcgat aaacctgtga agattgagtc tagtcgattt attggatgat 6660
 ccattcttca tcgttttttt cttgcttcga agttctgtat aaccagattt gtctgtgtgc 6720
 gattgtcatt acctagccgt gtatcgagaa ctagggtttt cgagtcgaatt ttgcccttt 6780
 tggttatatac tggttcgata acgattcatc tggattaggg ttttaagtgg tgacgtttag 6840
 tattccaatt tctcaaaat ttagttatgg ataataaaaa tccccaattg actgttcaat 6900
 ttcttgtaa atgctcagat ccccatggct tcgatctcct cctcagtcgc gaccgttagc 6960
 cggaccgccc ctgctcaggc caacatggtg gctccgttca ccggccttaa gtccaacgcc 7020
 gccttcccca ccaccaagaa ggctaacgac ttctccacc ttcccagcaa cggtggaaga 7080
 gttcaatgta tgcaggtgtg gccggcctac ggcaacaaga agttcgagac gctgtcgtac 7140
 ctgccgccgc tgtctatggc gccaccgtg atgatggcct cgtcggccac cgccgtcgtc 7200
 ccgttccagg ggtcaagtc caccgccagc ctccccgtcg cccgccgctc ctccagaagc 7260
 ctcggaacg tcagcaacgg cggaaggatc cgggtcatgg ccggcgccga ggagatcgtg 7320
 ctgcagccca tcaaggagat ctccggcacc gtcaagctgc cggggtccaa gtcgctttcc 7380
 aaccggatcc tctactcgc cgccctgtcc gaggggacaa cagtggttga taacctgctg 7440
 aacagtgagg atgtccacta catgctcggg gccttgagga ctcttggctc ctctgtcgaa 7500
 gcggaacaaag ctgcacaaag agctgtagtt gttggctgtg gtggaaagtt cccagttgag 7560
 gatgctaaag aggaagtgca gctcttcttg gggaatgctg gaatcgcaat gcggtccttg 7620
 acagcagctg ttactgctgc tgggtgaaat gcaacttacg tgcttgatgg agtaccaaga 7680
 atgagggaga gacccattgg cgacttggtt gtcggattga agcagcttgg tgcagatggt 7740
 gattgtttcc ttggcactga ctgcccacct gttcgtgtca atggaatcgg agggtacct 7800
 ggtggcaagg tcaagctgtc tggctccatc agcagtcagt acttgagtgc cttgctgatg 7860

ES 2 623 923 T3

gctgctcctt tggctcttgg ggatgtggag attgaaatca ttgataaatt aatctccatt 7920
 ccgtacgtcg aaatgacatt gagattgatg gacggttttg gtgtgaaagc agagcattct 7980
 gatagctggg acagattcta cattaagggg ggtcaaaaat acaagtcccc taaaaatgcc 8040
 tatgttgaag gtgatgcctc aagcgcaagc tatttcttgg ctggtgctgc aattactgga 8100
 gggactgtga ctgtggaagg ttgtggcacc accagtttgc agggatgatg gaagtttgct 8160
 gaggtactgg agatgatggg agcgaagggt acatggaccg agactagcgt aactgttact 8220
 ggcccaccgc gggagccatt tgggaggaaa cacctcaagg cgattgatgt caacatgaac 8280
 aagatgcctg atgtcgccat gactcttgct gtggttgccc tctttgccga tggcccgaca 8340
 gccatcagag acgtggcttc ctggagagta aaggagaccg agaggatggt tgcgatccgg 8400
 acggagctaa ccaagctggg agcatctggt gaggaagggc cggactactg catcatcacg 8460
 ccgccggaga agctgaacgt gacggcgatc gacacgtacg acgaccacag gatggcgatg 8520
 gctttctccc ttgccgctg tggcgaggtc cccgtcacca tccgggacct tgggtgcacc 8580
 cggaagacct tccccgacta cttcgatgtg ctgagcactt tcgtcaagaa ttaagctcta 8640
 gaactagtgg atccccgat ccgctgttgt gttttctggg tttctcactt aagcgtctgc 8700
 gttttacttt tgtattgggt ttggcgttta gtagtttgcg gtagcgttct tgttatgtgt 8760
 aattacgctt tttcttctg cttcagcagt ttcggtttaa atataaatcg aatcaagttt 8820
 cactttatca gcgttgtttt aaattttggc attaaattgg tgaaaattgc ttcaattttg 8880
 tatctaaata gaagagacaa catgaaattc gacttttgac ctcaaatctt cgaacattta 8940
 tttcctgatt tcacgatgga tgaggataac gaaagggcgg ttcctatgac cgggaaagtt 9000
 cccgtagaag acaatgagca aagctactga aacgcggaac cgacgtcgca ttggtacgga 9060
 tatgagttaa accgactcaa ttcctttatt aagacataaa ccgattttgg ttaaagtgta 9120
 acagtgagct gatataaaac cgaaacaaac cggatcaagt ttgattgagc aacttgatga 9180
 caaacttcag aattttgggt attgaatgaa aatcatagtc taatcgtaaa aaatgtacag 9240
 aagaaaagct agagcagaac aaagattcta tattctgggt ccaatttatc atcgctttaa 9300
 cgtccctcag atttgatcgg gctgcaggaa ttaaacgccc gggcacgtgg gatcctctag 9360
 cagatctggc cggcccaccg gtgggcccata tgggcccgcg gccgcgaatt cgagctcggg 9420
 acctacctgg cgaaaggggg atgtgctgca aggcgattaa gttgggtaac gccagggttt 9480
 tcccagtcac gacgttgtaa aacgacggcc agtgaattgc ggccgcaatt cccgatctag 9540
 taacatagat gacaccgcgc gcgataatth atcctagttt gcgcgctata tttgttttc 9600
 tatcgcgat taaatgtata attgcgggac tctaataata aaaaccatc tcataaataa 9660
 cgtcatgcat tacatgttaa ttattacatg cttaacgtaa ttcaacagaa attatatgat 9720

ES 2 623 923 T3

aatcatcgca agaccggcaa caggattcaa tcttaagaaa ctttattgcc aaatgtttga 9780
acgatcgggg aaattcgtcg agtcaccctc ggccgggctt tttgacgctt aatcggcggt 9840
caatacacca cgacgcacct ggtcacgttc gatggactcg aacagcgctt tgaagttcca 9900
ctcgccaaac ccatcgtcgc ccttgcgctg gatgaattcg aagaacaccg ggcccatcag 9960
ggtttccgag aagatctgca gcagcaggcg tttgtcgcct tccacggaag atccgtccag 10020
caggataccg cgtgcctgca gttgatccac cggctcgcg tggtcaggca ggcggccttc 10080
gagcatttcg taataagtgt ctggcggcgc ggtcatgaag cgcagccga ttttcttcaa 10140
cgcgtccag gtcttgacca ggtcgtcggg gaggaacgcc acgtgctgga tgccttcgcc 10200
gttgaactgc atcaggaact cttcgatctg ccccgcccc ttggacgact cttcgttcag 10260
cgggatgagg atcatgccgt ccggcgact catggccttg gaagtcaggc cgggtgactc 10320
gcccttgata tcgaagtaac gcgcttcacg gaagttgaac aatttctcgt agaagttggc 10380
ccagtagacc atgcggccgc gatagacgtt gtgggtcagg tggtcagatga ctttgagacc 10440
tgcaccgacc ggattgctc ccacacctc gaggtacacg aagtcgatgt cgtagatcga 10500
gctgccttcg ccgaaacggt cgatcaggta caacggcgcg ccgccgatgc cttgatcgc 10560
cggcaggttc aattccatcg gcccggtgtc aatatggatc ggctggcgc cgagttccag 10620
ggcgcggttg taggcctttt gcgagtcctt cacgcggaac gccatgccgc acaccgacgg 10680
gccgtgttcg gccgcaaagt aggaggcgt gctgttgggc tcgttgttga ggatcagggt 10740
gatctcgccc tggcgggtaca ggtgcacgtt cttggaacgg tgggtcgcga ctttggtgaa 10800
gcccatgatc tcgaagatcg gctccagggt accggcgcgc ggcgacgcga attcgatgaa 10860
ttcaaagccc atcaggccca ttgggttttc gtatagatct gccatgcacc ggatccttc 10920
gccgttgctg acgttgccga ggcttctgga ggagcggcgg gcgacgggga ggctggcgg 10980
ggacttgagc ccctggaacg gagcgacggc ggtggccgac gaggccatca tcacggtggg 11040
cgccatagac agcggcggca ggtacgacag cgtctcgaac ttcttgttgc cgtaggccgg 11100
ccacacctgc atatattgaa ctcttcacc gttgctggga aggggtggaga agtcgtagc 11160
cttcttgggtg gtggggaagg cggcgttga ctttaaggccg gtgaacggag ccacatggt 11220
ggcctgagca gggcgggtcc ggctaaccgt cgcgactgag gaggagatcg aagccatggc 11280
tatcgttcgt aaatggtgaa aattttcaga aaattgctt tgctttaaaa gaaatgattt 11340
aaattgctgc aatagaagta gaatgcttga ttgcttgaga ttcgtttgtt ttgtatatgt 11400
tgtgttgaga attctagagt cgagagaaat tgatgtctgt agaagaaga gaacggttaa 11460
gagtagatth gggtagaaa gatgtgaaat tgtttttata ggcaaagacg gagagtctat 11520
tttttgagca atcagatcgc atattaaatc taacggctga gatatcgatc cgtgtgtaca 11580
ataaaatgat gtataaacg tcgatctggt ttaatcgacg gttcatatta gtgatccgcg 11640

ES 2 623 923 T3

tgatggcagt gatagccact aagaatcgtc ttttgtttta catgtggcgc cacaaattag 11700
 ggtaatgaag cggcaatatt ttggaactcg gaaaataaaa ttgcgccatc acattatttg 11760
 aaaattttca catgctttta ttttaaaaac ccacgaatta caagttacaa ccgaaaaaga 11820
 tttataatat agtgatttat actaattttg tagtagctta atgtatattg atactggaaa 11880
 aacaatgaca atcataatcg atccgtgtgt acaataaaat gatgtataaa ccgtcgatct 11940
 gttttaatcg acggttcata ttagtgatcc gcgtgatggc agtgatagcc actaagaatc 12000
 gtcttttggt tlacatgtgg cgccacaaat tagggtaatg aagcggcaat attttggaa 12060
 tcgaaaaata aaattgcgcc atcacattat ttgaaaattt tcacatgctt ttattttaaa 12120
 aaccacgaa ttacaagtta caaccgaaaa agatttataa tatagtgatt tatactaatt 12180
 ttgtagtagc ttaatgtata ttgatactgg aaaaacaatg acaatcatat gttagtatta 12240
 tcaagttatc gtattgatat tgatattgga acatacaatg ggtattgcct tctttcgacc 12300
 ataaatatca ccaaatttac aaagtttggtg tataccaagt tatcaattgt aaatgggatg 12360
 tcaacatttt aatttcctt tgagaaacta tagaccacaa gaacacactt caatagataa 12420
 agtaactatt tacataagag gttttaaaat cacattaaca aaaataatta ccaaccggca 12480
 ctcaaaata caaacagagc acacgacatg tcaaagccac aagtaaattc gttgagtgg 12540
 ggtttcatta caattgtgct acttgagca caaactatct tgctctggga atcatctcag 12600
 catcaaagat catgctcact tcaggggaac ttagtgatc catgcctcga ctcatatttc 12660
 tcctcgacct gcaggcatgc aagctctaga gcggccgcca ccgcggtgga ggtactcgag 12720
 tcgagcgta cgttcgaaca attggtttta aaagcttgca tgcctgcagg tcgaggagaa 12780
 atatgagtcg aggcattgat acactaagtt cccctgaagt gagcatgatc tttgatgctg 12840
 agatgattcc cagagcaaga tagtttgctg tgcaagtgac acaattgtaa tgaaccacc 12900
 actcaacgaa tttacttggt gctttgacat gtcgtgtgct ctgtttgat tttgagtg 12960
 cggttggtta tttttttgt taatgtgatt ttaaacctc ttatgtaaat agttacttta 13020
 tctattgaag tgtgttcttg tggctatag tttctcaaag ggaaattaaa atgttgacat 13080
 cccatttaca attgataact tggatacac aaactttgta aatttggtga ttttatggt 13140
 cgaaagaagg caataccat tgtatgttcc aatatcaata tcaatacgat aacttgataa 13200
 tactaacata tgattgtcat gttttttcca gtatcaatat acattaagct actacaaaat 13260
 tagtataaat cactatatta taaatctttt tcggttgtaa cttgtaattc gtgggttttt 13320
 aaaataaaag catgtgaaa ttttcaata atgtgatggc gcaattttat tttccgagtt 13380
 ccaaatatt gccgttcat taccctaatt tgtggcgcca catgtaaac aaaagacgat 13440
 tcttagtggc tatcactgcc atcacgcgga tcaactaatat gaaccgtcga ttaaacaga 13500

ES 2 623 923 T3

tcgacggttt atacatcatt ttattgtaca cacggatcga tatctcagcc gttagattta 13560
 atatgcgatc tgattgtca aaaaatagac tctccgtctt tgcctataaa aacaatttca 13620
 catctttctc acccaaatct actcttaacc gttcttcttc ttctacagac atcaatttct 13680
 ctcgactcta gaggatccaa gcttatcgat ttcgaacccc tcaggcgaag aacaggatg 13740
 atttgtttgt aattagatca ggggtttagg tctttccatt actttttaat gttttttctg 13800
 ttactgtctc cgcgatctga ttttacgaca atagagtttc gggttttgtc ccattccagt 13860
 ttgaaaataa aggtccgtct ttttaagttg ctggatcgat aaacctgtga agattgagtc 13920
 tagtcgattt attggatgat ccattcttca tcgttttttt cttgcttcga agttctgtat 13980
 aaccagattt gctgtgtgac gattgtcatt acctagccgt gtatcgagaa ctagggtttt 14040
 cgagtcaatt ttgccccttt tggttatatac tggttcgata acgattcatc tggattaggg 14100
 ttttaagtgg tgacgttttag tattccaatt tcttcaaaat ttagttatgg ataataaaaa 14160
 tcccccaattg actgttcaat ttcttggtta atgctcagat ccccatggct tcgatctcct 14220
 cctcagtcgc gaccgttagc cggaccgcc ctgctcaggc caacatgggtg gctccgttca 14280
 cggcccttaa gtccaacgcc gccttcccca ccaccaagaa ggctaacgac ttctccacc 14340
 ttcccagcaa cggtggaaga gttcaatgta tgcagggtg gccggcctac ggcaacaaga 14400
 agttcagagac gctgtcgtac ctgccgccgc tgtctatggc gccaccgtg atgatggcct 14460
 cgtcggccac cgcgctcgtc ccgttccagg ggctcaagtc caccgccagc ctccccgtcg 14520
 cccgccgctc ctccagaagc ctcggcaacg tcagcaacgg cggaaggatc cgggtcatgg 14580
 cggcgccga ggagatcgtg ctgcagccca tcaaggagat ctccggcacc gtcaagctgc 14640
 cggggtccea gtcgctttcc aaccggatcc tctactcgc cgccctgtcc gaggggacaa 14700
 cagtggttga taacctgctg aacagtgagg atgtccacta catgctcggg gccttgagga 14760
 ctcttggctc ctctgtcgaa gcggacaaag ctgccaaaag agctgtagtt gttggctgtg 14820
 gtggaagtt cccagttgag gatgctaaag aggaagtgca gctcttcttg gggaatgctg 14880
 gaatcgcaat gcggtccttg acagcagctg ttactgctgc tggtggaat gcaacttacg 14940
 tgcttgatgg agtaccaaga atgagggaga gaccattgg cgacttgggt gtcggattga 15000
 agcagcttgg tgcagatggt gattgtttcc ttggcactga ctgccacct gttcgtgtca 15060
 atggaatcgg agggctacct ggtggcaagg tcaagctgtc tggctccatc agcagtcagt 15120
 acttgagtgc cttgctgatg gctgctcctt tggctcttgg ggatgtggag attgaaatca 15180
 ttgataaatt aatctccatt ccgtacgtcg aaatgacatt gagattgatg gagcgttttg 15240
 gtgtgaaagc agagcattct gatagctggg acagattcta cattaaggga ggtcaaaaat 15300
 acaagtcccc taaaaatgcc tatgttgaag gtgatgcctc aagcgcaagc tatttcttgg 15360
 ctggtgctgc aattactgga gggactgtga ctgtggaagg ttgtggcacc accagtttgc 15420

ES 2 623 923 T3

agggatgatgt gaagtttgct gaggtactgg agatgatggg agcgaagggt acatggaccg 15480
 agactagcgt aactgttact ggcccaccgc gggagccatt tgggaggaaa cacctcaagg 15540
 cgattgatgt caacatgaac aagatgcctg atgtcgccat gactcttgct gtggttgccc 15600
 tctttgccga tggcccgaca gccatcagag acgtggcttc ctggagagta aaggagaccg 15660
 agaggatggt tgcgatccgg acggagctaa ccaagctggg agcatctggt gaggaagggc 15720
 cggactactg catcatcacg ccgccggaga agctgaacgt gacggcgatc gacacgtacg 15780
 acgaccacag gatggcgatg gctttctccc ttgccgctg tgccgaggtc cccgtcacca 15840
 tccgggaccc tgggtgcacc cggaagacct tccccgacta cttcgatgtg ctgagcactt 15900
 tcgtcaagaa ttaagctcta gaactagtgg atccccgat ccgctgttgt gttttctggg 15960
 tttctcactt aagcgtctgc gttttacttt tgtattgggt ttggcgttta gtagtttgcg 16020
 gtagcgttct tgttatgtgt aattacgctt tttcttcttg cttcagcagt ttcggttgaa 16080
 atataaatcg aatcaagttt cactttatca gcgttgtttt aaattttggc attaaattgg 16140
 tgaaaattgc ttcaattttg tatctaata gaagagacaa catgaaattc gacttttgac 16200
 ctcaaatctt cgaacattta tttcctgatt tcacgatgga tgaggataac gaaagggcgg 16260
 ttcctatgtc cgggaaagtt cccgtagaag acaatgagca aagctactga aacgcggaca 16320
 cgacgtcgca ttggtacgga tatgagttaa accgactcaa ttcctttatt aagacataaa 16380
 ccgattttgg ttaaagtgtg acagtgagct gatataaaac cgaaacaac cggtaacaagt 16440
 ttgattgagc aacttgatga caaacttcag aattttgggt attgaatgaa aatcatagtc 16500
 taatcgtaaa aaatgtacag aagaaaagct agagcagaac aaagattcta tattctgggt 16560
 ccaatttatc atcgccttaa cgtccctcag atttgatcgg gctgcaggaa ttaatgtggt 16620
 tcatccgtct ttttgtaaat gcggtcatca atacgtgcct caaagattgc caaatagatt 16680
 aatgtggttc atctccctat atgttttgct tgttgattt tgctatcaca tgtttattgc 16740
 tccaaactaa ttataataaa atgactttca aatgattggt gttgacattc ttttcaaatt 16800
 gttcgtgaa gaaaagataa tctcgaggcc ttgatttgtt aatgctttca ttaataaata 16860
 aataaaataa ctctttcaa atttcaattc atgcttttat attgtgtggt tcatcctcat 16920
 cttatgtcac tattatcatt tcatgttga gactttactt ggccatattt gagaagacct 16980
 tcttcattat aggcaatttt atctccacaa taatataaga gaatatcttg aattaataat 17040
 tattgaggat atattatagg gttctatgtg gaactaaaga catggttacc ccattaagag 17100
 agagtataga ggaattactt ttatttgcca cgaggcgacg cgacttgat ttattttgga 17160
 attgtacttt tgcgtgagca gtgtggctct atgttggggc ctccacttgt tgggtttta 17220
 tatatgtgaa agggatgga gggatgatgg tcatctctt gcattatttt tgttattcgc 17280

ES 2 623 923 T3

gcgaatgata tatgccctgt ttttgaagat tgatagggaa gtccatata aggaattgaa 17340
gtgtcaaaag ggtgtgagta tgtgctatga taatcaccca attaatgtac atctggtgtg 17400
gtgtttgaat ttgtaggcca ttaattaata ttcctcttgg tgaagtttgg agttcttttg 17460
caattacaat tctgttttgt aagtgattat gatggacttt tagatgtttc tcaaacagta 17520
ggtgtaaaga aaaatgggcc ctggtatgaa aatttgtttt cactctttct cattcatatc 17580
tttaaaaaa gaatgataat tttgtaataa aaataaaaa atattaaata ttttctcaa 17640
tcaaacaacc tttatttttt atgccaacaa taattttggt aaagatggag atttcaatta 17700
ttatataaga gttcattata gttgaaaatt gaatgaatgt atatgtttac gttttttgtc 17760
tcaagtgaaa ctaagatcaa atattcatat ctattgagct ggtcctt 17806

<210> 21

<211> 23

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> cebador SHA130

<400> 21

ctatattctg gttccaattt atc 23

10 <210> 22

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> cebador SMP178

<400> 22

tgaggcacgt attgatgacc 20

REIVINDICACIONES

1. Una planta de soja, o células, partes, semilla o progenie de la misma, comprendiendo cada una el evento de élite EE-GM3 y el evento de élite EE-GM2 en su genoma, en la que el evento de élite EE-GM3, como se muestra en la semilla de referencia depositada en el NCIMB con el número de depósito NCIMB 41659, es un locus genético que comprende un ADN extraño que comprende un gen quimérico que codifica 2mEPSPS y un gen quimérico que codifica HPPD PF W336, y en la que el evento de élite EE-GM2, como se muestra en la semilla de referencia depositada en el NCIMB con el número de depósito NCIMB 41660, es un locus genético que comprende un ADN extraño que comprende un gen quimérico que codifica fosfinotricina acetiltransferasa.
2. Un producto de soja producido a partir de la semilla que comprende EE-GM3 y EE-GM2 de la reivindicación 1, en el que dicho producto de soja es o comprende harina de soja, semillas molidas, harina, o copos, y comprende ácidos nucleicos específicos para los eventos de élite EE-GM2 y EE-GM3, como se puede detectar usando el método de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 o 14.
3. Un método para producir un producto de soja, que comprende obtener semilla de soja que comprende el evento EE-GM3 y el evento EE-GM2 de la reivindicación 1, y producir tal producto de soja a partir de ella.
4. Un método para tratar plantas de soja para controlar malezas en un campo de plantas de soja, que comprende tratar la planta de soja que comprende los eventos EE-GM3 y EE-GM2 de la reivindicación 1 con una cantidad eficaz de un herbicida a base de isoxaflutol y/o a base de glifosato y/o a base de glufosinato, en el que tales plantas son tolerantes a tal herbicida o herbicidas.
5. Un procedimiento para tratar semillas que contienen eventos EE-GM3 y EE-GM2 de la reivindicación 1 cuando se siembran en un campo con un herbicida inhibidor de HPPD, tal como isoxaflutol, seguido opcionalmente de la aplicación de glifosato y/o glufosinato o una mezcla de un inhibidor de HPPD con glifosato y/o glufosinato como herbicida post-emergente por encima de las plantas, en el que se controlan las malezas.
6. Un procedimiento para el control de malezas, que comprende tratar plantas de soja que contienen los eventos EE-GM3 y EE-GM2 de la reivindicación 1 con un herbicida inhibidor de HPPD, tal como isoxaflutol, por encima de las plantas, aplicado junto con, seguido por o precedido por un tratamiento con glifosato y/o glufosinato como herbicida post-emergente por encima de las plantas.
7. Un método para identificar la presencia simultánea de eventos de élite EE-GM3 y EE-GM2 en muestras biológicas, método el cual comprende la detección de una región específica de EE-GM3 con un primer par de cebadores específico o sonda que reconoce específicamente la región de flanco 5' o 3' y el ADN extraño contiguo con ella en EE-GM3, reconociendo uno de los cebadores del primer par de cebadores la región de flanco 5' o 3' del ADN extraño que comprende genes de tolerancia a herbicida en EE-GM3, comprendiendo dicha región de flanco 5' la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 desde el nucleótido 1 al nucleótido 1451, y comprendiendo dicha región de flanco 3' la secuencia nucleotídica de la complementaria de SEC ID NO: 3 desde el nucleótido 241 al nucleótido 1408, reconociendo el otro cebador del primer par de cebadores una secuencia en el ADN extraño de EE-GM3 que comprende la secuencia nucleotídica de la complementaria de SEC ID NO: 2 desde el nucleótido 1452 al nucleótido 1843, o la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 desde el nucleótido 1 al nucleótido 240, o reconociendo el otro cebador del primer par de cebadores una secuencia dentro del ADN extraño de EE-GM3 que comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 1 desde el nucleótido 188 al nucleótido 7252 o su complementaria, o que comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 20 desde la posición nucleotídica 1452 a la posición nucleotídica 16638 o su complementaria, y en el que dicha primera sonda comprende una secuencia nucleotídica que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con una secuencia que comprende parte de la secuencia de flanco 5' o la secuencia de flanco 3' del ADN extraño que comprende genes de tolerancia a herbicida en EE-GM3 y la secuencia del ADN extraño contiguo con ella, o la complementaria de la misma, tal como en el que dicha primera sonda comprende una secuencia nucleotídica que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEC ID NO: 2 desde el nucleótido 1441 a 1462 o con SEC ID NO: 3 desde el nucleótido 230 a 251, o la complementaria de dichas secuencias, y la detección de una región específica de EE-GM2 con un segundo par de cebadores o sonda específica que reconoce específicamente la región de flanco 5' o 3' y el ADN extraño contiguo con ella en EE-GM2, reconociendo uno de los cebadores de dicho segundo par de cebadores la región de flanco 5' o 3' del ADN extraño que comprende genes de tolerancia a herbicida en EE-GM2, comprendiendo dicha región de flanco 5' la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 14 desde el nucleótido 1 al nucleótido 311, y comprendiendo dicha región de flanco 3' la secuencia nucleotídica de la complementaria de SEC ID NO: 15 desde el nucleótido 508 al nucleótido 1880, reconociendo el otro cebador de dicho segundo par de cebadores una secuencia en el ADN extraño de EE-GM2 que comprende la secuencia nucleotídica de la complementaria de SEC ID NO: 14 desde el nucleótido 312 al nucleótido 810 o la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 15 desde el nucleótido 1 al nucleótido 507, o reconociendo el otro cebador del segundo par de cebadores una secuencia en el ADN extraño de EE-GM2 que comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 11 o su complementaria, y en el que dicha segunda sonda específica comprende una secuencia nucleotídica que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con una secuencia que comprende parte de la secuencia de flanco 5' o la secuencia de flanco 3' del ADN extraño que comprende genes de tolerancia a herbicida en EE-GM2 y la secuencia del ADN extraño contiguo con ella, o la complementaria de la misma, tal como en el que dicha segunda sonda comprende una secuencia nucleotídica que

tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEC ID NO: 14 desde el nucleótido 301 al 322 o con SEC ID NO: 15 desde el nucleótido 497 al 518, o la complementaria de dichas secuencias, en el que dichos eventos EE-GM3 y EE-GM2 son como se definen en la reivindicación 1.

5 8. El método de la reivindicación 7, comprendiendo dicho método amplificar dos fragmentos de ADN de entre 50 y 1000 pb a partir de un ácido nucleico presente en dichas muestras biológicas usando una primera reacción en cadena de la polimerasa con dicho primer par de cebadores, y usando una segunda reacción en cadena de la polimerasa con dicho segundo par de cebadores, con lo que dicha reacción de la polimerasa primera y segunda puede ser secuencial o simultánea.

10 9. El método de la reivindicación 7, en el que dicho cebador que reconoce la región de flanqueo 5' de EE-GM3 comprende en su extremo 3' terminal una secuencia nucleotídica de al menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionada de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 desde el nucleótido 1 al nucleótido 1451, o dicho cebador que reconoce la región de flanqueo 3' de EE-GM3 comprende en su extremo 3' terminal una secuencia nucleotídica de al menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia nucleotídica de la complementaria de SEC ID NO: 3 desde el nucleótido 241 al nucleótido 1408, y dicho cebador que reconoce una
15 secuencia en el ADN extraño de EE-GM3 comprende en su extremo 3' al menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia nucleotídica de la complementaria de SEC ID NO: 2 desde el nucleótido 1452 al nucleótido 1843 o la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 desde el nucleótido 1 al nucleótido 240 o la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 1 desde el nucleótido 188 al nucleótido 7252 o su complementaria, y en el que dicho cebador que reconoce la región de flanqueo 5' de EE-GM2 comprende en su extremo 3' terminal una secuencia
20 nucleotídica de al menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionada de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 14 desde el nucleótido 1 al nucleótido 311, o dicho cebador que reconoce la región de flanqueo 3' de EE-GM2 comprende en su extremo 3' terminal una secuencia nucleotídica de al menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionada de la secuencia nucleotídica de la complementaria de SEC ID NO: 15 desde el nucleótido 508 al nucleótido 1880, y dicho cebador que reconoce una secuencia en el ADN extraño de EE-GM2 comprende en su
25 extremo 3' al menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia nucleotídica de la complementaria de SEC ID NO: 14 desde el nucleótido 312 al nucleótido 810, o la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 15 desde el nucleótido 1 al nucleótido 507 o la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 11 o su complementaria, tal como en el que dichos cebadores específicos de EE-GM3 comprenden la secuencia de SEC ID NO: 5 y SEC ID NO: 4, respectivamente, o la secuencia de SEC ID NO: 7 y SEC ID NO: 5 respectivamente, y dichos cebadores específicos
30 de EE-GM2 comprenden la secuencia de SEC ID NO: 18 y SEC ID NO: 19 respectivamente.

10. Un kit para identificar la presencia simultánea del evento de élite EE-GM3 y del evento de élite EE-GM2 en muestras biológicas, comprendiendo dicho kit un primer cebador que reconoce la región de flanqueo 5' o 3' del ADN extraño que comprende genes de tolerancia a herbicida en EE-GM3, comprendiendo dicha región de flanqueo 5' la
35 secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 desde el nucleótido 1 al nucleótido 1451, y comprendiendo dicha región de flanqueo 3' la secuencia nucleotídica de la complementaria de SEC ID NO: 3 desde el nucleótido 241 al nucleótido 1408, y reconociendo un segundo cebador una secuencia en el ADN extraño que comprende genes de tolerancia a herbicida en EE-GM3, comprendiendo dicho ADN extraño la secuencia nucleotídica de la complementaria de SEC ID NO: 2 desde el nucleótido 1452 al nucleótido 1843 o la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 desde el nucleótido 1 al nucleótido 240 o la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 1 desde el nucleótido 188 al nucleótido
40 7252 o su complementaria, o la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 20 desde la posición nucleotídica 1452 a la posición nucleotídica 16638 o su complementaria, y en el que dicho kit comprende además un tercer cebador que reconoce la región de flanqueo 5' o 3' del ADN extraño que comprende genes de tolerancia a herbicida en EE-GM2, comprendiendo dicha región de flanqueo 5' la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 14 desde el nucleótido 1 al nucleótido 311, y comprendiendo dicha región de flanqueo 3' la secuencia nucleotídica de la complementaria de
45 SEC ID NO: 15 desde el nucleótido 508 al nucleótido 1880, y un cuarto cebador que reconoce una secuencia en el ADN extraño que comprende genes de tolerancia a herbicida en EE-GM2, comprendiendo dicho ADN extraño la secuencia nucleotídica de la complementaria de SEC ID NO: 14 desde el nucleótido 312 al nucleótido 810 o la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 15 desde el nucleótido 1 al nucleótido 507 o la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 11 o su complementaria.

50 11. Dos pares de cebadores adecuados para uso en una detección específica de EE-GM3 y EE-GM2, en el que dicho primer par comprende un primer cebador que comprende una secuencia que reconoce una secuencia en la región de flanqueo 5' o 3' del ADN extraño que comprende genes de tolerancia a herbicida en EE-GM3, comprendiendo dicha región de flanqueo 5' la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 desde el nucleótido 1 al nucleótido 1451, y comprendiendo dicha región de flanqueo 3' la secuencia nucleotídica de la complementaria de
55 SEC ID NO: 3 desde el nucleótido 241 al nucleótido 1408, y un segundo cebador que comprende una secuencia que reconoce una secuencia en las secuencias del ADN extraño contigua con dicha región de flanqueo 5' o 3' en EE-GM3, comprendiendo dicho ADN extraño contiguo con dicha región de flanqueo 5' la secuencia nucleotídica de la complementaria de SEC ID NO: 2 desde el nucleótido 1452 al nucleótido 1843, y comprendiendo dicho ADN extraño contiguo con dicha región de flanqueo 3' la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 desde el nucleótido 1 al nucleótido 240; y un segundo par de cebadores comprende un tercer cebador que comprende una secuencia que
60 reconoce una secuencia en la región de flanqueo 5' o 3' del ADN extraño que comprende genes de tolerancia a herbicida en EE-GM2, comprendiendo dicha región de flanqueo 5' la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 14 desde el nucleótido 1 al nucleótido 311, y comprendiendo dicha región de flanqueo 3' la secuencia nucleotídica de la

- 5 complementaria de SEC ID NO: 15 desde el nucleótido 508 al nucleótido 1880, y un cuarto cebador que comprende una secuencia que reconoce una secuencia en las secuencias del ADN extraño contigua con dicha región de flanco 5' o 3' de EE-GM2, comprendiendo dicho ADN extraño contiguo con dicha región de flanco 5' la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 14 desde el nucleótido 312 al nucleótido 810, y comprendiendo dicho ADN contiguo con dicha región de flanco 3' la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 15 desde el nucleótido 1 al nucleótido 507.
- 10 12. El par de cebadores de la reivindicación 11, en el que dicho primer cebador comprende en su extremo 3' terminal una secuencia nucleotídica de al menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionada de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 desde el nucleótido 1 al nucleótido 1451, o una secuencia nucleotídica de al menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionada de la secuencia nucleotídica de la complementaria de SEC ID NO: 3 desde el nucleótido 241 al nucleótido 1408, en el que dicho segundo cebador comprende en su extremo 3' terminal una secuencia nucleotídica de al menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionada de la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 desde el nucleótido 1452 al nucleótido 1843, o una secuencia nucleotídica de al menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionada de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 desde el nucleótido 1 al nucleótido 240, en el que dicho tercer cebador comprende en su extremo 3' terminal una secuencia nucleotídica de al menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionada de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 14 desde el nucleótido 1 al nucleótido 311, o una secuencia nucleotídica de al menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionada de la secuencia nucleotídica de la complementaria de SEC ID NO: 15 desde el nucleótido 508 al nucleótido 1880, y en el que dicho cuarto cebador en su extremo 3' terminal comprende una secuencia nucleotídica de al menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionada de la secuencia nucleotídica de la complementaria de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 14 desde el nucleótido 312 al nucleótido 810 o la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 15 desde el nucleótido 1 al nucleótido 507.
- 15 13. Un conjunto que comprende cuatro cebadores,
- 20 un primer cebador que comprende en su extremo 3' terminal la secuencia de SEC ID NO: 5;
- un segundo cebador que comprende en su extremo 3' terminal la secuencia de SEC ID NO: 4;
- un tercer cebador que comprende en su extremo 3' terminal la secuencia de SEC ID NO: 18; y
- un cuarto cebador que comprende en su extremo 3' terminal la secuencia de SEC ID NO: 19.
- 30 14. El método de la reivindicación 7, método el cual comprende hibridar un ácido nucleico de muestras biológicas con una primera sonda específica para EE-GM3 y con una segunda sonda específica para EE-GM2, en el que la secuencia de dicha primera sonda específica tiene al menos 80% de identidad de secuencia con una secuencia que comprende parte de la secuencia de flanco 5' o la secuencia de flanco 3' de EE-GM3 y la secuencia del ADN extraño contiguo con ella, y en el que la secuencia de dicha segunda sonda específica tiene al menos 80% de identidad de secuencia con una secuencia que comprende parte de la secuencia de flanco 5' o la secuencia de flanco 3' de EE-GM2 y la secuencia del ADN extraño contiguo con ella, tal como en el que la secuencia de dicha primera sonda específica comprende una secuencia nucleotídica que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEC ID NO: 2 desde el nucleótido 1431 a 1472 o con SEC ID NO: 3 desde el nucleótido 220 a 261, o la complementaria de dichas secuencias, y en el que la secuencia de dicha segunda sonda específica comprende una secuencia nucleotídica que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEC ID NO: 14 desde el nucleótido 301 a 322 o con SEC ID NO: 15 desde el nucleótido 497 a 518, o la complementaria de dichas secuencias.
- 35 15. Un kit para identificar la presencia simultánea del evento de élite EE-GM3 y el evento de élite EE-GM2 en muestras biológicas, comprendiendo dicho kit una primera sonda específica, capaz de hibridarse específicamente a una región específica de EE-GM3, y una segunda sonda específica capaz de hibridarse específicamente a una región específica de EE-GM2, en el que la secuencia de dicha primera sonda específica tiene al menos 80% de identidad de secuencia con una secuencia que comprende parte de la secuencia de flanco 5' o la secuencia de flanco 3' del ADN extraño que comprende genes de tolerancia a herbicida en EE-GM3 y la secuencia del ADN extraño contiguo con ella, y en el que la secuencia de dicha segunda sonda específica tiene al menos 80% de identidad de secuencia con una secuencia que comprende parte de la secuencia de flanco 5' o la secuencia de flanco 3' del ADN extraño que comprende genes de tolerancia a herbicida en EE-GM2 y la secuencia del ADN extraño contiguo con ella, tal como en el que la secuencia de dicha primera sonda específica comprende una secuencia nucleotídica que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEC ID NO: 2 desde el nucleótido 1441 a 1462 o con SEC ID NO: 3 desde el nucleótido 230 a 251, o la complementaria de dichas secuencias, y en el que la secuencia de dicha segunda sonda específica comprende una secuencia nucleotídica que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEC ID NO: 14 desde el nucleótido 301 a 322 o con SEC ID NO: 15 desde el nucleótido 497 a 518, o la complementaria de dichas secuencias.
- 40 16. Un par de sondas específicas para la identificación de la presencia simultánea del evento de élite EE-GM3 y el evento de élite EE-GM2 en muestras biológicas, en el que dichos eventos EE-GM3 y EE-GM2 son como se definen en la reivindicación 1, y en el que dicho par de sondas específicas comprende una primera sonda que comprende una secuencia nucleotídica que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con una secuencia que comprende
- 45
- 50
- 55

parte de la secuencia de flaqueo 5' o la secuencia de flaqueo 3' del ADN extraño que comprende genes de tolerancia a herbicida en EE-GM3 y la secuencia del ADN extraño contiguo con ella, o la complementaria de la misma, y una segunda sonda que comprende una secuencia nucleotídica que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con una secuencia que comprende parte de la secuencia de flaqueo 5' o la secuencia de flaqueo 3' del ADN extraño que comprende genes de tolerancia a herbicida en EE-GM2 y la secuencia del ADN extraño contiguo con ella, o la complementaria de la misma, tal como en el que dicha primera sonda comprende una secuencia nucleotídica que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEC ID NO: 2 desde el nucleótido 1441 a 1462 o con SEC ID NO: 3 desde el nucleótido 230 a 251, o la complementaria de dichas secuencias, y en el dicha segunda sonda comprende una secuencia nucleotídica que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEC ID NO: 14 desde el nucleótido 301 a 322 o con SEC ID NO: 15 desde el nucleótido 497 a 518, o la complementaria de dichas secuencias.

17. Un método para confirmar la pureza de las semillas, o para identificar semillas para la presencia de eventos de élite EE-GM3 y EE-GM2, método el cual comprende la detección de una región específica de EE-GM3 con un primer par de cebadores específico o sonda que reconoce específicamente la región de flaqueo 5' o 3' y el ADN extraño contiguo con ella en EE-GM3, reconociendo uno de los cebadores del primer par la región de flaqueo 5' o 3' del ADN extraño que comprende genes de tolerancia a herbicida en EE-GM3, comprendiendo dicha región de flaqueo 5' la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 desde el nucleótido 1 al nucleótido 1451, y comprendiendo dicha región de flaqueo 3' la secuencia nucleotídica de la complementaria de SEC ID NO: 3 desde el nucleótido 241 al nucleótido 1408, reconociendo el otro cebador del primer par de cebadores una secuencia en el ADN extraño de EE-GM3 que comprende la secuencia nucleotídica de la complementaria de SEC ID NO: 2 desde el nucleótido 1452 al nucleótido 1843 o la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 desde el nucleótido 1 al nucleótido 240, o reconociendo el otro cebador del primer par de cebadores una secuencia en del ADN extraño de EE-GM3 que comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 1 desde el nucleótido 188 al nucleótido 7252 o su complementaria, o que comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 20 desde la posición nucleotídica 1452 a la posición nucleotídica 16638 o su complementaria, y en el que dicha primera sonda comprende una secuencia nucleotídica que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con una secuencia que comprende parte de la secuencia de flaqueo 5' o la secuencia de flaqueo 3' del ADN extraño que comprende genes de tolerancia a herbicida en EE-GM3 y la secuencia del ADN extraño contiguo con ella, o la complementaria de la misma, tal como en el que dicha primera sonda comprende una secuencia nucleotídica que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEC ID NO: 2 desde el nucleótido 1441 a 1462 o con SEC ID NO: 3 desde el nucleótido 230 a 251, o la complementaria de dichas secuencias, y la detección de una región específica de EE-GM2 con un segundo par de cebadores o sonda específica que reconoce específicamente la región de flaqueo 5' o 3' y el ADN extraño contiguo con ella en EE-GM2, reconociendo uno de los cebadores de dicho segundo par de cebadores la región de flaqueo 5' o 3' del ADN extraño que comprende genes de tolerancia a herbicida en EE-GM2, comprendiendo dicha región de flaqueo 5' la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 14 desde el nucleótido 1 al nucleótido 311, y comprendiendo dicha región de flaqueo 3' la secuencia nucleotídica de la complementaria de SEC ID NO: 15 desde el nucleótido 508 al nucleótido 1880, reconociendo el otro cebador de dicho segundo par de cebadores una secuencia en el ADN extraño de EE-GM2 que comprende la secuencia nucleotídica de la complementaria de SEC ID NO: 14 desde el nucleótido 312 al nucleótido 810 o la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 15 desde el nucleótido 1 al nucleótido 507, o reconociendo el otro cebador del segundo par de cebadores una secuencia en el ADN extraño de EE-GM2 que comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 11 o su complementaria, y en el que dicha segunda sonda específica comprende una secuencia nucleotídica que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con una secuencia que comprende parte de la secuencia de flaqueo 5' o la secuencia de flaqueo 3' del ADN extraño que comprende genes de tolerancia a herbicida en EE-GM2 y la secuencia del ADN extraño contiguo con ella, o la complementaria de la misma, tal como en el que dicha segunda sonda comprende una secuencia nucleotídica que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEC ID NO: 14 desde el nucleótido 301 al 322 o con SEC ID NO: 15 desde el nucleótido 497 al 518, o la complementaria de dichas secuencias, en muestras de semillas, en el que dichos eventos EE-GM3 y EE-GM2 son como se definen en la reivindicación 1.

18. Un método para detectar la presencia de eventos de élite EE-GM3 y EE-GM2 en muestras biológicas a través de la hibridación con una sonda de ácido nucleico marcada sustancialmente complementaria, en el que la relación de sonda:ácido nucleico diana se amplifica a través del reciclaje de la secuencia del ácido nucleico diana, comprendiendo dicho método:

a) hibridar dicha secuencia de ácido nucleico diana a un primer oligonucleótido de ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 desde el nucleótido 1452 al nucleótido 1469 o su complementaria, o dicho primer oligonucleótido de ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 desde el nucleótido 223 al nucleótido 240 o su complementaria;

b) hibridar dicha secuencia de ácido nucleico diana a un segundo oligonucleótido de ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 2 desde el nucleótido 1434 al nucleótido 1451 o su complementaria, o dicho segundo oligonucleótido de ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 3 desde el nucleótido 241 al nucleótido 258 o su complementaria, en el que dicho oligonucleótido primero y segundo se solapan en al menos un nucleótido, y en el que ya sea dicho primer o dicho segundo oligonucleótido está marcado para que sea dicha sonda de ácido nucleico marcada;

- c) escindir solamente la sonda marcada en el dúplex de sonda:secuencia de ácido nucleico diana, con una enzima que causa la escisión selectiva de la sonda que da como resultado la disociación del dúplex, dejando intacta la secuencia diana;
- d) reciclar la secuencia de ácido nucleico diana al repetir las etapas (a) a (c); y
- 5 e) detectar la sonda marcada escindida, determinando de ese modo la presencia de dicha secuencia de ácido nucleico diana, y
- f) hibridar dicha secuencia de ácido nucleico diana a un tercer oligonucleótido de ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 14 desde el nucleótido 312 al nucleótido 329 o su complementaria, o dicho tercer oligonucleótido de ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 15 desde el nucleótido 490 al nucleótido 507 o su complementaria;
- 10 g) hibridar dicha secuencia de ácido nucleico diana a un cuarto oligonucleótido de ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 14 desde el nucleótido 294 al nucleótido 311 o su complementaria, o dicho cuarto oligonucleótido de ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 15 desde el nucleótido 508 al nucleótido 525 o su complementaria, en el que dicho oligonucleótido tercero y cuarto solapan en al menos un nucleótido, y en el que ya sea dicho tercer o dicho cuarto oligonucleótido se marca para que sea dicha sonda de ácido nucleico marcada;
- 15 h) escindir solamente la sonda marcada en el dúplex de sonda:secuencia de ácido nucleico diana, con una enzima que causa la escisión selectiva de la sonda que da como resultado la disociación del dúplex, dejando intacta la secuencia diana;
- 20 i) reciclar la secuencia de ácido nucleico diana al repetir las etapas (f) a (h); y
- j) detectar la sonda marcada escindida, determinando de ese modo la presencia de dicha secuencia de ácido nucleico diana.

EE-GM3

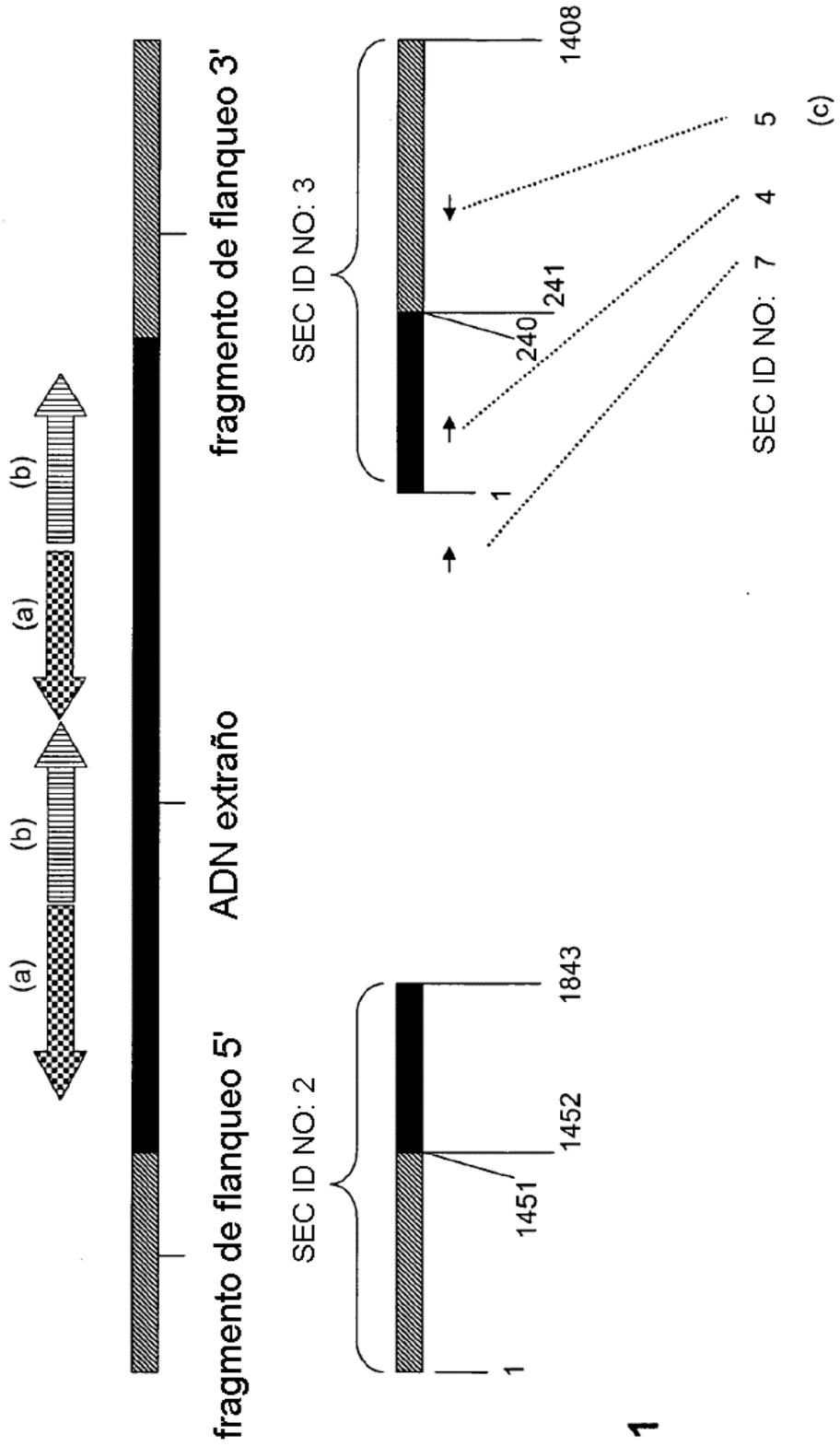


Fig. 1



Fig. 2

EE-GM1

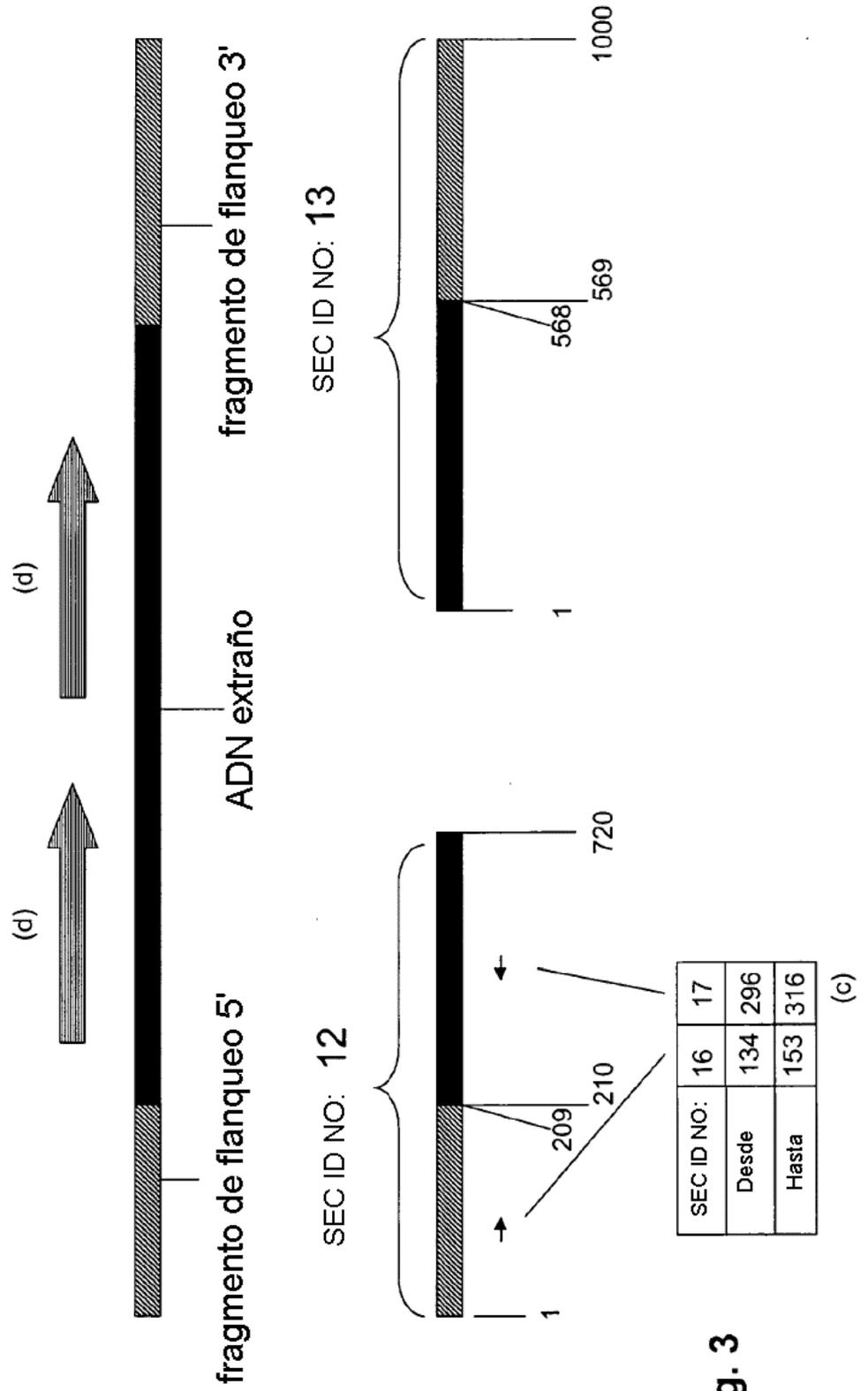


Fig. 3

EE-GM2

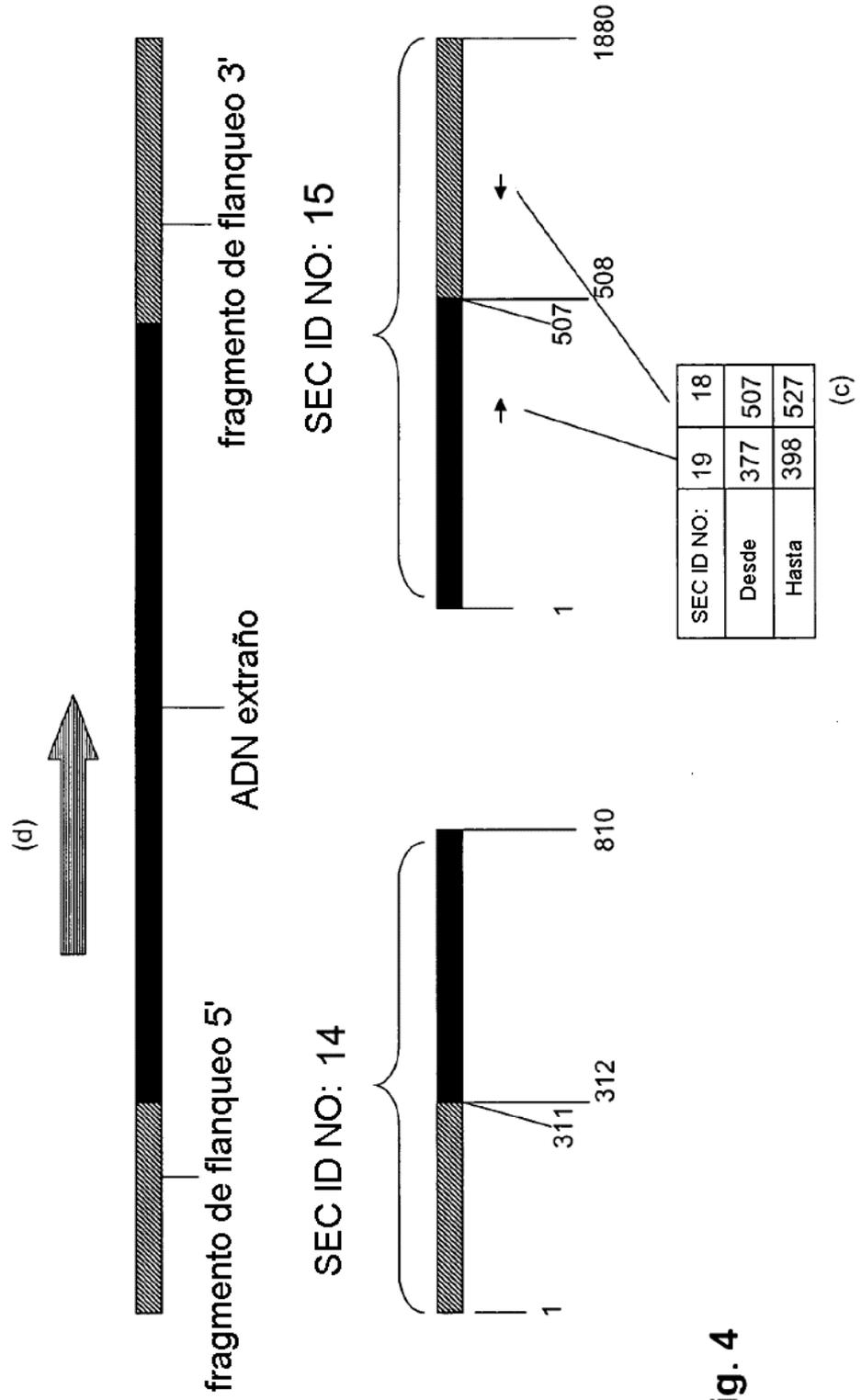


Fig. 4

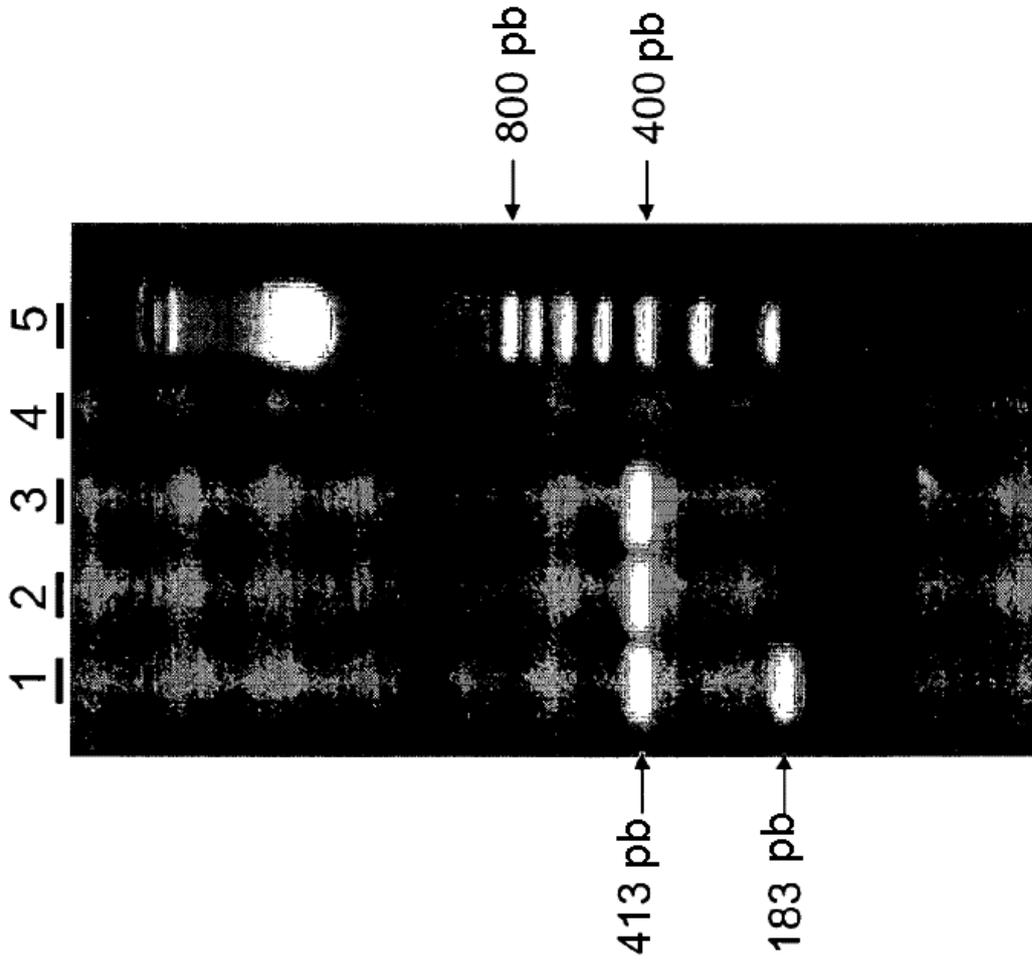


Fig. 5

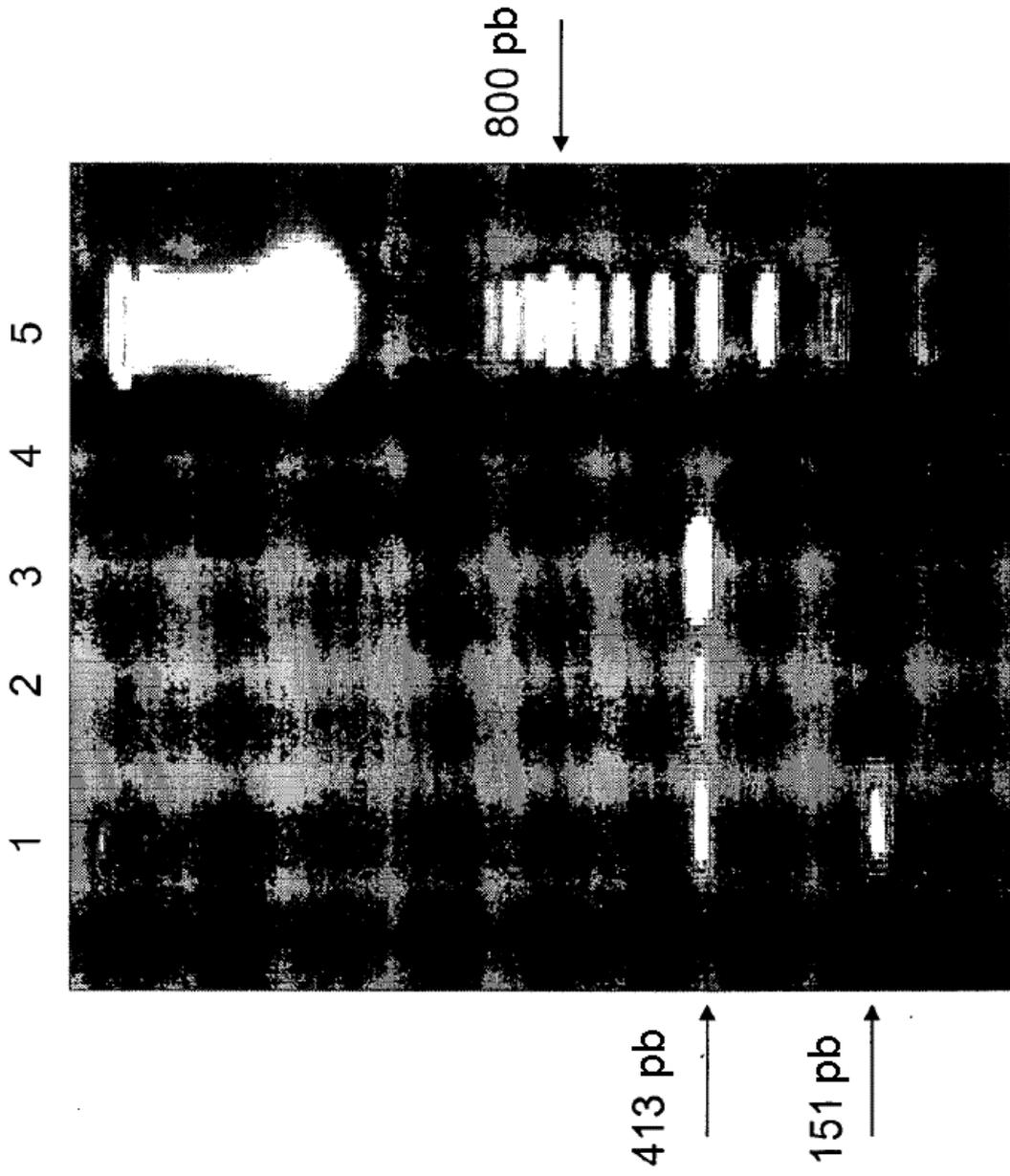


Fig. 6