(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 675 311**

(51) Int. Cl.:

A01H 5/00 (2008.01)
C12N 15/82 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.08.2010 PCT/US2010/046759**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **24.03.2011 WO11034704**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.08.2010 E 10817646 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018 EP 2478000**

(54) Título: **Evento transgénico de soja MON 87708 y procedimientos de uso del mismo**

(30) Prioridad:

17.09.2009 US 243227 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.07.2018

(73) Titular/es:

MONSANTO TECHNOLOGY LLC (100.0%)
800 North Lindbergh Boulevard Mail Zone E1NA
St. Louis, MO 63167, US

(72) Inventor/es:

BRINKER, RONALD, J.;
BURNS, WEN, C.;
FENG, PAUL, C.C.;
GUPTA, ANJU;
HOI, SIO-WAI;
MALVEN, MARIANNE y
WU, KUNSHENG

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 675 311 T3

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

DESCRIPCIÓN

Evento transgénico de soja MON 87708 y procedimientos de uso del mismo

Campo de la invención

La invención se refiere al evento transgénico de *Glycine max* MON 87708. El evento exhibe tolerancia al herbicida dicamba. La invención también se refiere a plantas, partes de plantas, semillas de plantas, células de plantas, productos agrícolas y procedimientos relacionados con el evento MON 87708 y proporciona moléculas de nucleótidos que son únicas para el evento y se crearon en conexión con la inserción de ADN transgénico en el genoma de una planta de *Glycine max*.

Antecedentes de la invención

La soja (*Glycine max*) es un cultivo importante en muchas áreas del mundo, y los procedimientos de biotecnología se han aplicado a este cultivo para producir soja con rasgos deseables. Uno de estos rasgos deseables es la tolerancia a los herbicidas. La expresión de un transgén de tolerancia a herbicida en una planta puede conferir el rasgo deseable de tolerancia a herbicida en la planta, pero la expresión del transgén puede estar influenciada por la ubicación cromosómica y el resultado genómico de la inserción transgénica. Por ejemplo, se ha observado en plantas que a menudo hay variación en el nivel y el patrón de expresión transgénica entre eventos individuales que difieren en el sitio de inserción cromosómica del transgén, pero que de otro modo son idénticos. También pueden existir diferencias fenotípicas o agronómicas indeseables y/o deseables entre los eventos. Debido a esto, a menudo es necesario producir y analizar un gran número de eventos de transformación de plantas individuales para seleccionar un evento que tenga tanto el rasgo deseable como las características fenotípicas y agrícolas óptimas necesarias para hacerlo adecuado para fines comerciales. Dicha selección a menudo requiere ensayos de invernadero y de campo con muchos eventos a lo largo de múltiples años, en ubicaciones múltiples y bajo una variedad de condiciones para que se pueda recolectar una cantidad significativa de datos agronómicos, fenotípicos y moleculares. Los datos y observaciones resultantes deben luego ser analizados por equipos de científicos y agrónomos con el objetivo de seleccionar un evento comercialmente adecuado. Tal evento, una vez seleccionado, puede ser utilizado para introgresar el rasgo deseado en otros contextos genéticos usando procedimientos de cultivo de plantas, y así producir una cantidad de diferentes variedades de cultivos que contienen el rasgo deseado y se adaptan adecuadamente a condiciones de crecimiento locales específicas.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona una molécula de ADN recombinante que comprende una molécula de nucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 6.

La presente invención proporciona además una molécula de ADN que comprende una molécula de nucleótidos que tiene una secuencia de nucleótidos de longitud suficiente de la secuencia de nucleótidos contigua de SEQ ID NO: 6, para funcionar como una sonda de ADN que hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con una molécula de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de las SEQ ID NO: 1-4 y 6-8 y no hibrida bajo las condiciones de hibridación rigurosas con una molécula de ADN que no comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de las SEQ ID NO: 1-4 y 6-8.

En una realización relacionada, la presente invención proporciona un par de moléculas de ADN que consisten en una primera molécula de ADN y una segunda molécula de ADN diferente de la primera molécula de ADN, en las que dichas primera y segunda moléculas de ADN comprenden una molécula de nucleótido cada una que tiene un secuencia de nucleótido de longitud suficiente de nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO: 6, para funcionar como cebadores de ADN cuando se usan juntos en una reacción de amplificación con ADN derivado del evento MON 87708 para producir un amplicón diagnóstico de ADN de evento de soja MON 87708 en una muestra.
Las realizaciones alternativas de la invención proporcionan un procedimiento de detección de la presencia de una molécula de ADN derivada del evento de soja MON 87708 en una muestra, comprendiendo dicho procedimiento:

(I)

(a) poner en contacto una muestra con la sonda de ADN como se describió anteriormente;
(b) someter dicha muestra y dicha sonda de ADN a condiciones de hibridación rigurosas; y
(c) detectar la hibridación de dicha sonda de ADN con una molécula de ADN en dicha muestra, en la que la hibridación de dicha sonda de ADN con dicha molécula de ADN indica la presencia de una molécula de ADN derivada del evento de soja MON 87708 en dicha muestra; o

(II)

(a) poner en contacto una muestra con el par de moléculas de ADN como se describió anteriormente;

(b) realizar una reacción de amplificación suficiente para producir un amplicón de ADN que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1-8; y
(c) detectar la presencia de dicho amplicón de ADN en dicha reacción, en el que la presencia de dicho amplicón de ADN en dicha reacción indica la presencia de una molécula de ADN derivada del evento de soja MON 87708 en dicha muestra.

Según un aspecto adicional, la invención también proporciona un kit de detección de ADN que comprende un par de moléculas de ADN como se describió anteriormente y/o una molécula de ADN como se describió anteriormente, para funcionar como cebadores o sondas de ADN específicas para detectar la presencia de ADN derivado del evento de soja MON 87708, en el que la detección de dicho ADN es diagnóstica para la presencia de dicho ADN de evento MON 87708 en una muestra.

En un aspecto particularmente preferente, la invención proporciona una planta, semilla, célula o parte de planta de soja recombinante que comprende una molécula de nucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que comprende la SEQ ID NO: 6, en la que dicha planta, semilla, célula o planta parte de la misma es tolerante al tratamiento con el herbicida dicamba, en el que se ha depositado una muestra representativa de la planta con el número de acceso ATCC PTA-9670.

En un aspecto relacionado, la invención proporciona un procedimiento de control de malas hierbas en un campo que comprende.

(i) sembrar plantas de soja como se describió anteriormente en un campo y aplicar una dosis efectiva de herbicida dicamba para controlar malas hierbas en dicho campo sin dañar a dicha planta de soja que comprende el evento MON 87708; o
(ii) aplicar una dosis efectiva de herbicida dicamba para controlar malas hierbas en un campo y luego plantar plantas de soja como se describe anteriormente en dicho campo

La invención también proporciona un procedimiento de producción de semilla de soja esencialmente libre de semillas de especies de malas hierbas tóxicas, comprendiendo dicho procedimiento:
(a) plantar semillas de plantas de soja como se describió anteriormente en un campo;
(b) aplicar una dosis efectiva de un herbicida dicamba a dicho campo para matar malas hierbas tóxicas en dicho campo sin dañar a dichas plantas de soja que comprenden el evento MON 87708; y
(c) cosechar semilla de soja de dicho campo.

Descripción de las figuras

La Figura 1 ilustra la organización del inserto transgénico en el genoma del evento de soja MON 87708; [A] corresponde a la posición relativa de la SEQ ID NO: 1, que está a sesenta nucleótidos de la unión entre el ADN genómico de la soja y la porción 5’ del ADN del inserto transgénico; [A’] corresponde a la posición relativa de la SEQ ID NO: 7, que está a cien nucleótidos de la unión entre el ADN genómico de la semilla de soja y la porción 5’ del ADN del inserto transgénico; [B] corresponde a la posición relativa de la SEQ ID NO: 2, que está a sesenta nucleótidos de la unión entre el ADN genómico de la semilla de soja y la porción 3’ del ADN del inserto transgénico; [B’] corresponde a la posición relativa de la SEQ ID NO: 8, que está a cien nucleótidos de la unión entre el ADN genómico de la semilla de soja y la porción 3' del ADN del inserto transgénico; [C] corresponde a la posición relativa de la SEQ ID NO: 3, que es la secuencia del genoma de la soja que flanquea el extremo 5’ arbitrariamente asignado /designado del casete de expresión integrado en el genoma en el evento MON 87708; [D] corresponde a la posición relativa de la SEQ ID NO: 4, que es la secuencia del genoma de la soja que flanquea el extremo 3’ arbitrariamente asignado/designado del casete de expresión integrado en el genoma en el evento MON 87708; [E] representa los diversos elementos que comprenden la SEQ ID NO: 5 y es la secuencia del casete de expresión insertado en el genoma del evento MON 87708; y [F] representa la secuencia contigua (proporcionada como SEQ ID NO: 6) que comprende, como se representa en la figura de izquierda a derecha, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 4, en la cual SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8 están incluidos, ya que estas secuencias están presentes en el genoma en el evento MON 87708.

Breve descripción de las secuencias

La SEQ ID NO: 1 es una secuencia de sesenta nucleótidos que representa la unión 5’ entre el ADN genómico de la soja y el casete de expresión transgénica integrado. La SEQ ID NO: 1 se posiciona en SEQ ID NO: 6 en la posición de nucleótido 1097-1156.
La SEQ ID NO: 2 es una secuencia de sesenta nucleótidos que representa la unión 3’ entre el ADN genómico de la soja y el casete de expresión transgénica integrado. La SEQ ID NO: 2 se posiciona en la SEQ ID NO: 6 en la posición de nucleótido 4100-4159.
La SEQ ID NO: 3 es la secuencia 5’ que flanquea el ADN insertado del evento de soja MON 87708 hasta e incluyendo una región de inserción de ADN transgénico.
La SEQ ID NO: 4 es la secuencia 3’ que flanquea el ADN insertado del evento de soja MON 87708 hasta e incluyendo una región de inserción de ADN transgénico.

La SEQ ID NO: 5 es la secuencia del casete de expresión transgénico integrado.
La SEQ ID NO: 6 es la secuencia de nucleótidos que representa el cóntigo de la secuencia 5' que flanquea el ADN insertado del evento de soja MON 87708 (SEQ ID NO: 3), la secuencia del ADN insertado (SEQ ID NO: 5) y el Secuencia 3' que flanquea el ADN insertado del evento de soja MON 87708 (SEQ ID NO: 4) e incluye SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8.
La SEQ ID NO: 7 es una secuencia de cien nucleótidos que representa la unión 5' entre el ADN genómico de la soja y el casete de expresión transgénica integrado.
La SEQ ID NO: 8 es una secuencia de cien nucleótidos que representa la unión 3' entre el ADN genómico de la soja y el casete de expresión transgénica integrado.
La SEQ ID NO: 9 es la secuencia de un cebador al que se hace referencia como Cebador SQ13570 y se usa para identificar el evento de soja MON 87708. Es complementario al casete de expresión insertado en la región próxima al límite de inserción del transgén 3'. Un amplicón de PCR producido a partir de un ensayo TAQMAN® (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) usando la combinación de los cebadores SQ13570 y SQ13571 (SEQ ID NO: 10) es un resultado positivo para la presencia del evento MON 87708.
La SEQ ID NO: 10 es la secuencia de un cebador al que se hace referencia como Cebador SQ13571 y se usa para identificar el evento de soja MON 87708. Es complementario a una región 3' que flanquea el casete de expresión insertado y cerca del límite de inserción del ADN transgénico. Un amplicón de PCR producido a partir de un ensayo TAQMAN® (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) usando la combinación de los cebadores SQ13570 (SEQ ID NO: 9) y SQ13571 es un resultado positivo para la presencia del evento MON 87708.
La SEQ ID NO: 11 es la secuencia de una sonda denominada Sonda PB4655 y se usa para identificar el evento de soja MON 87708. Es complementario a una región que abarca la unión 3' del casete de expresión insertado y el ADN genómico. Esta sonda es un oligonucleótido sintético marcado con 6-FAM™. La liberación de una señal fluorescente en una reacción de amplificación usando los cebadores SQ13570 y SQ13571 (SEQ ID NO: 9-10) en combinación con la sonda marcada con 6-FAM ™ PB4655 es diagnóstica del evento MON 87708 en un ensayo TAQMAN®.
La SEQ ID NO: 12 es la secuencia de un cebador al que se hace referencia como Cebador SQ20632 y se usa para identificar la cigocidad del evento MON 87708.
La SEQ ID NO: 13 es la secuencia de un cebador a la que se hace referencia como Cebador SQ20636 y se usa para identificar el haba salvaje tipo salvaje y la cigosidad del evento MON 87708.
La SEQ ID NO: 14 es la secuencia de un cebador al que se hace referencia como Cebador SQ20637 y se usa para identificar la cigosidad de haba salvaje tipo salvaje.
La SEQ ID NO: 15 es la secuencia de una sonda denominada Sonda PB10130 y se usa para un ensayo de cigosidad de eventos MON 87708.
La SEQ ID NO: 16 es la secuencia de una sonda denominada Sonda PB10131 y se usa para un ensayo de cigosidad de haba salvaje tipo salvaje.

Descripción detallada

Se proporcionan las siguientes definiciones y procedimientos para definir mejor la invención y para guiar a los expertos en la técnica en la práctica de la invención. A menos que se indique lo contrario, los términos deben entenderse según el uso convencional por parte de los expertos en la materia relevante.

La invención proporciona un evento de soja transgénico MON 87708 que exhibe tolerancia comercialmente aceptable a las aplicaciones de herbicida dicamba. El evento comprende una sola inserción de ADN transgénico en el cromosoma/genoma del germoplasma de soja. Un "evento" se produce por: (i) transformación de una célula de planta con un constructo de ácido nucleico que incluye un transgén de interés, (ii) regeneración de una población de plantas resultante de la inserción del transgén en el genoma de la planta, y (iii) la selección de una planta particular caracterizada por la inserción del transgén en una ubicación particular en el genoma de la planta. El término "evento" se refiere al transformante original que incluye el transgén insertado en la ubicación particular en el genoma de la planta. El término "evento" también se refiere a la progenie del transformante que incluye el transgén insertado en la ubicación particular en el genoma de la planta. Dicha progenie puede producirse por un cruzamiento sexual entre el transformante, o su progenie, y otra planta. Dicha otra planta puede ser una planta transgénica que comprende el mismo o diferente transgén y/o una planta no transgénica, tal como una de una variedad diferente.

Incluso después del retrocruzamiento repetido a un progenitor recurrente, el ADN insertado y el ADN flanqueante del progenitor transformado están presentes en la progenie de la cruza en la misma ubicación genómica.

Como se usa en la presente memoria, el término "soja" significa *Glycine max* e incluye todas las variedades de plantas que pueden reproducirse con soja, incluidas especies de soja salvaje, así como aquellas plantas que pertenecen a *Glycine* que permiten la reproducción entre especies.

El término "evento" también se refiere a una molécula de ADN del transformante original que comprende el ADN insertado y el ADN genómico de soja flanqueante inmediatamente adyacente a cada lado del ADN insertado. Esta molécula de ADN se crea mediante el acto de insertar el ADN transgénico en el genoma de la planta de soja, es decir, mediante el acto de transformación.

Por lo tanto, esta molécula de ADN comprende una secuencia de nucleótidos que es específica para el evento y única para el genoma de la planta de soja en la que se ha insertado el ADN transgénico, ya que esta secuencia de nucleótidos contiene la secuencia de una región particular de ADN genómico de soja y del inserto de ADN transgénico. La disposición del ADN insertado en el evento de soja MON 87708 en relación con el ADN del genoma de la planta de soja circundante es específica y única para el evento de soja MON 87708. Esta molécula de ADN también es una parte integral del cromosoma de soja del evento MON 87708 y como tal es estático en la planta y puede transmitirse a la progenie de la planta.

El evento MON 87708 comprende un transgén que confiere tolerancia a aplicaciones de herbicida dicamba a la planta de soja. “Dicamba” se refiere al ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico. Dicamba es un herbicida de auxina sintético útil para controlar malas hierbas de hoja ancha. Las plantas de soja se transformaron con dicamba mono-oxigenasa (DMO), una enzima clonada de *Stenotrophomonas maltophilia* que se encuentra comúnmente en la rizosfera del suelo. Dicamba mono-oxigenasa es una enzima que cataliza la desactivación de dicamba a través de una reacción de O-desmetilación al compuesto no herbicida ácido 3,5-diclorosalicílico. En algunas áreas del mundo, las semillas de especies de malas hierbas tóxicas pueden contaminar las semillas de soja cosechadas que pueden afectar la salud y la nutrición de los animales alimentados con los productos básicos contaminados de soja. Estas plantas pueden eliminarse de un campo de soja mediante tratamiento con un herbicida dicamba. Los miembros de este grupo de malas hierbas tóxicas incluyen *Cardaria spp, Heliotropium spp, Centaurea spp., Senecio spp., Crotalaria spp., Solanum spp., Xanthium spp., Amsinckia spp., Cassia spp., Sesbania spp., Datura spp., Ricinus spp., Argemone spp., Corchorus spp., Impomoea spp. y Echium spp.*

Como se usa en la presente memoria, el término “recombinante” se refiere a una forma de ADN y/o proteína y/o un organismo que normalmente no se encontraría en la naturaleza y, como tal, se creó mediante intervención humana. Tal intervención humana puede producir una molécula de ADN recombinante y/o una planta recombinante. Como se usa en la presente memoria, una “molécula de ADN recombinante” es una molécula de ADN que comprende una combinación de moléculas de ADN que no se producirían juntas y es el resultado de la intervención humana, por ejemplo, una molécula de ADN compuesta de al menos dos ADN moléculas heterólogas entre sí, y/o una molécula de ADN que se sintetiza artificialmente y comprende una secuencia de polinucleótidos que se desvía de la secuencia de polinucleótidos que normalmente existiría en la naturaleza, y/o una molécula de ADN que comprende un transgén incorporado artificialmente en una célula huésped ADN genómico y el ADN flanqueante asociado del genoma de la célula huésped. Un ejemplo de una molécula de ADN recombinante es una molécula de ADN descrita aquí que resulta de la inserción del transgén en el ADN genómico de la soja, que finalmente puede dar como resultado la expresión de una molécula de proteína y/o ARN recombinante en ese organismo. Como se usa en este documento, una “planta recombinante” es una planta que normalmente no existiría en la naturaleza, es el resultado de la intervención humana, y contiene una molécula de ADN transgénica y/o heteróloga incorporada en su genoma. Como resultado de tal alteración genómica, la planta recombinante es claramente diferente de la planta tipo salvaje relacionada. Un ejemplo de una planta recombinante es una planta de soja descrita aquí como Evento MON 87708.
Como se usa en este documento, el término “transgén” se refiere a una molécula de nucleótido incorporada artificialmente en el genoma de una célula huésped. Tal transgén puede ser heterólogo a la célula huésped. El término “planta transgénica” se refiere a una planta que comprende dicho transgén.

Como se usa en este documento, el término “heterólogo” se refiere a una primera molécula que normalmente no se encuentra en combinación con una segunda molécula en la naturaleza. Por ejemplo, una molécula puede derivarse de una primera especie e insertarse en el genoma de una segunda especie. La molécula sería así heteróloga al huésped y se incorporaría artificialmente en el genoma de la célula huésped.

Como se usa en este documento, el término “quimérico” se refiere a una molécula de ADN única producida fusionando una primera molécula de ADN a una segunda molécula de ADN, donde ni la primera ni la segunda molécula de ADN se encontrarían normalmente en esa configuración, es decir, fusionadas una a la otra. La molécula de ADN quimérico es, por lo tanto, una nueva molécula de ADN que normalmente no se encuentra en la naturaleza.
La invención proporciona moléculas de ADN y sus secuencias de nucleótidos correspondientes. Como se usa en este documento, el término “ADN”, “molécula de ADN”, “molécula de nucleótido” se refiere a una molécula de ADN de origen genómico o sintético, es decir, un polímero de bases de desoxirribonucleótidos o una molécula de polinucleótido, leída del 5’ (corriente arriba) termina en el extremo 3’ (corriente abajo). Como se usa en la presente memoria, el término “secuencia de ADN”, “secuencia de nucleótidos” o “secuencia de polinucleótidos” se refiere a la secuencia de nucleótidos de una molécula de ADN. La nomenclatura utilizada en este documento es la exigida por el Título 37 del Código de Reglamentos Federales de los EE.UU. § 1.822 y se establece en los cuadros de la Norma ST.25 (1998), Apéndice 2, Cuadros 1 y 3. Por convención, las secuencias de nucleótidos proporcionadas como SEQ ID NO: 1-8 y sus fragmentos se describen con referencia a solo una cadena de las dos cadenas de secuencia de nucleótidos complementarias. Por convención, las secuencias complementarias (es decir, las secuencias de la cadena complementaria), también se denominan en la técnica como secuencias complementarias inversas.

La secuencia de nucleótidos que corresponde a la secuencia de nucleótidos completa del ADN transgénico insertado y segmentos sustanciales del ADN del genoma de soja que flanquea cualquier extremo del ADN transgénico insertado se proporciona en la presente como SEQ ID NO: 6. Una subsección de este es el inserto ADN

transgénico proporcionado como SEQ ID NO: 5. La secuencia de nucleótidos del ADN del genoma de soja físicamente unida mediante enlace fosfodiéster a, y por lo tanto flanqueando, el extremo 5' del ADN transgénico insertado se expone como se muestra en la SEQ ID NO: 3. La secuencia de nucleótidos del ADN del genoma de soja unido físicamente mediante enlace fosfodiéster con y, por lo tanto, flanqueando el extremo 3' del ADN transgénico insertado se expone como se muestra en la SEQ ID NO: 4.

El evento de soja MON 87708 comprende además dos regiones, una que abarca la ubicación 5' y una que abarca la ubicación 3' donde el ADN transgénico se inserta en el ADN genómico, denominado aquí la unión 5' y 3', respectivamente. Una "secuencia de unión" o "región de unión" se refiere a la secuencia de ADN y/o a la correspondiente molécula de ADN que abarca el ADN transgénico insertado y el ADN genómico flanqueante adyacente. Las secuencias de unión se pueden representar arbitrariamente con las dos secuencias de 60 nucleótidos proporcionadas como SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, representando cada una 30 nucleótidos del ADN genómico flanqueante adyacente y contiguo con 30 nucleótidos del inserto de ADN. Alternativamente, las secuencias de unión se pueden representarse arbitrariamente con las dos secuencias de 100 nucleótidos proporcionadas como SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, representando cada una 50 nucleótidos del ADN genómico flanqueante adyacente y contiguo con 50 nucleótidos del inserto de ADN. Estos nucleótidos están conectados mediante un enlace fosfodiéster y en el caso de la soja MON 87708 están presentes como parte del genoma. En lasoja, la identificación de una o más de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8 en una muestra derivada de una planta, semilla o parte de una planta de soja es determinante de que el ADN se obtuvo del evento de soja MON 87708 y es diagnóstica de la presencia en una muestra de ADN del evento de soja MON 87708. Se describe aquí una molécula de ADN que contiene al menos la secuencia de nucleótidos como se expone en la SEQ ID NO 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7 y/o SEQ ID NO: 8. Se describe cualquier segmento de ADN derivado del evento de soja transgénica MON 87708 que es suficiente para incluir SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7, y/o SEQ ID NO: 8. Además, también se describe cualquier polinucleótido que comprenda una secuencia complementaria a cualquiera de las secuencias descritas en este párrafo. La Figura 1 ilustra la disposición física de SEQ ID NO: 1-5 y 7-8 con respecto a SEQ ID NO: 6 dispuesta desde 5' a 3'.

La invención proporciona moléculas de ADN ilustrativas que pueden usarse como cebadores o sondas para diagnosticar la presencia de ADN derivado del evento de la planta de soja MON 87708 en una muestra. Dichos cebadores o sondas son específicos para una secuencia de ácido nucleico diana y, como tales, son útiles para la identificación de la secuencia de ácido nucleico MON 87708 del evento de soja mediante los procedimientos de la invención descritos en este documento.

Un "cebador" es típicamente un polinucleótido aislado altamente purificado que está diseñado para uso en procedimientos de hibridación o hibridación específicos que implican amplificación térmica. Se puede usar un par de cebadores con ADN molde, como una muestra de ADN genómico de soja, en una amplificación térmica, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para producir un amplicón, donde el amplicón producido a partir de dicha reacción tendría una secuencia de ADN correspondiente a la secuencia del ADN molde situado entre los dos sitios donde los cebadores hibridaron con la molde. Como se usa en este documento, un "amplicón" es una pieza o fragmento de ADN que se ha sintetizado usando técnicas de amplificación. Un amplicón comprende al menos las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7, y/o SEQ ID NO: 8. Un cebador se diseña típicamente para hibridar con una cadena de ADN diana complementaria para formar un híbrido entre el cebador y la cadena de ADN diana, y la presencia del cebador es un punto de reconocimiento por una polimerasa para comenzar la extensión del cebador (es decir, polimerización de nucleótidos adicionales en una molécula de nucleótido de extensión) usando como molde la cadena de ADN diana. Los pares de cebadores, como se usan en la invención, pretenden referirse al uso de dos cebadores que se unen a cadenas opuestas de un segmento de nucleótidos bicatenario con el fin de amplificar linealmente el segmento de polinucleótidos entre las posiciones dirigidas a unirse por los miembros individuales del par de cebadores, típicamente en una reacción de amplificación térmica u otros procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos convencionales. Las moléculas de ADN ejemplares útiles como cebadores se proporcionan como SEQ ID NO: 9-10. El par de cebadores proporcionado como SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 son útiles como una primera molécula de ADN y una segunda molécula de ADN que es diferente de la primera molécula de ADN, y ambas tienen suficiente longitud de nucleótidos contiguos de cualquiera de las SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6 para funcionar como cebadores de ADN que, cuando se usan juntos en una reacción de amplificación térmica con ADN molde derivado del evento de soja MON 87708, producen un amplicón que comprende la SEQ ID NO: 2.

Una "sonda" es un ácido nucleico aislado que es complementario a una cadena de un ácido nucleico diana. Las sondas según la invención incluyen no solo ácidos desoxirribonucleicos o ribonucleicos sino también poliamidas y otros materiales de sonda que se unen específicamente a una secuencia de ADN diana y la detección de tal unión puede ser útil para diagnosticar, discriminar, determinar o confirmar la presencia de esa secuencia de ADN diana en una muestra particular. Se puede unir una sonda a una etiqueta detectable convencional o molécula indicadora, por ejemplo, un isótopo radiactivo, ligando, agente quimioluminiscente o enzima. Se proporciona una molécula de ADN ejemplar útil como sonda como SEQ ID NO: 11.
Las sondas y cebadores según la invención pueden tener una identidad de secuencia completa con la secuencia diana, aunque los cebadores y las sondas que difieren de la secuencia diana que retienen la capacidad de hibridar preferentemente con las secuencias diana se pueden diseñar por procedimientos convencionales. Para que una

molécula de ácido nucleico sirva como cebador o sonda, solo necesita ser suficientemente complementaria en secuencia para poder formar una estructura bicatenaria estable bajo el disolvente particular y las concentraciones de sal empleadas. Se puede utilizar cualquier procedimiento convencional de hibridación o amplificación de ácidos nucleicos para identificar la presencia de ADN transgénico del evento de soja MON 87708 en una muestra. Las sondas y los cebadores son generalmente al menos aproximadamente 11 nucleótidos, al menos aproximadamente 18 nucleótidos, al menos aproximadamente 24 nucleótidos, o al menos aproximadamente 30 nucleótidos o más de longitud. Dichas sondas y cebadores se hibridan específicamente con una secuencia de ADN diana en condiciones de hibridación rigurosas. Las condiciones de rigurosidad convencionales están descritas por Sambrook et al., 1989, y por Haymes et al., En: Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach, IRL Press, Washington, DC (1985). Como se usa en la presente memoria, dos moléculas de ácido nucleico son capaces de hibridarse específicamente entre sí si las dos moléculas son capaces de formar una estructura bicatenaria antiparalela de ácido nucleico. Una molécula de ácido nucleico es el “complemento” de otra molécula de ácido nucleico si exhiben complementariedad completa. Como se usa en este documento, las moléculas exhiben “complementariedad completa” cuando cada nucleótido de una de las moléculas es complementario a un nucleótido de la otra. Dos moléculas son “mínimamente complementarias” si pueden hibridarse entre sí con suficiente estabilidad para permitir que permanezcan apareadas entre sí en al menos condiciones convencionales de “baja rigurosidad”. De manera similar, las moléculas son “complementarias” si pueden hibridarse entre sí con suficiente estabilidad para permitir que se mantengan unidas entre sí en condiciones convencionales de “alta rigurosidad”. Por lo tanto, se permiten las desviaciones de la complementariedad completa, a condición de que tales desviaciones no impidan por completo la capacidad de las moléculas para formar una estructura bicatenaria.

Como se usa en la presente memoria, el término “aislado” se refiere a separar al menos parcialmente una molécula de otras moléculas normalmente asociadas con ella en su estado nativo o natural. En una realización, el término “aislado” se refiere a una molécula de ADN que está al menos parcialmente separada de los ácidos nucleicos que normalmente flanquean la molécula de ADN en su estado nativo o natural. Por lo tanto, las moléculas de ADN fusionadas a secuencias reguladoras o codificantes con las que normalmente no están asociadas, por ejemplo como resultado de técnicas recombinantes, se consideran aisladas en este documento. Dichas moléculas se consideran aisladas incluso cuando se integran en el cromosoma de una célula huésped o están presentes en una solución de ácido nucleico con otras moléculas de ADN.

Se puede usar cualquier número de procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica para aislar y manipular una molécula de ADN, o fragmento de la misma, divulgada en la invención. Por ejemplo, la tecnología de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) puede usarse para amplificar una molécula de ADN de partida particular y/o para producir variantes de la molécula original. Las moléculas de ADN, o fragmentos de las mismas, también se pueden obtener mediante otras técnicas tales como sintetizar directamente el fragmento por medios químicos, como se practica comúnmente usando un sintetizador de oligonucleótidos automatizado.

Las moléculas de ADN y las secuencias de nucleótidos correspondientes proporcionadas en la presente son útiles, entre otras cosas, para identificar el evento de soja MON 87708, seleccionando variedades de plantas o híbridos que comprenden el evento de soja MON 87708, detectando la presencia de ADN derivado del evento de soja transgénica MON 87708 en una muestra, y el control de muestras para la presencia y/o ausencia del evento de soja MON 87708 o partes de plantas derivadas del evento de soja MON 87708.

La invención proporciona plantas de soja, progenie, semillas, células de plantas, partes de plantas (tales como polen, óvulo, vaina, tejido de flores, tejido de raíz, tejido de tallo y tejido de hojas). También se describen aquí productos básicos. Estas plantas, progenie, semillas, células de planta, partes de plantas y productos básicos contienen una cantidad detectable de un polinucleótido descrito en la presente memoria, es decir, tal como un polinucleótido que tiene al menos una de las secuencias proporcionadas como SEQ ID NO: 1-8. Las plantas, la progenie, las semillas, las células de plantas y las partes de plantas de la invención también pueden contener uno o más transgenes adicionales. Dicho transgén puede ser cualquier secuencia de nucleótidos que codifica una proteína o molécula de ARN que confiere un rasgo deseable que incluye, pero no se limita a una mayor resistencia a los insectos, mayor eficacia de uso de agua, mayor rendimiento, mayor resistencia a la sequía, calidad de semilla mejorada, calidad nutricional mejorada y/o aumento de la tolerancia al herbicida, en el que se mide el rasgo deseable con respecto a una planta de soja que carece de dicho transgén adicional.

La invención proporciona plantas de soja, progenie, semillas, células de planta y partes de plantas tales como polen, óvulo, vaina, flor, tejido de raíz o tallo, y hojas derivadas de un evento de planta de soja transgénica MON 87708. Una muestra representativa de la semilla del evento de soja MON 87708 se ha depositado de acuerdo con el Tratado de Budapest con el fin de permitir la invención. El repositorio seleccionado para recibir el depósito es American Type Culture Collection (ATCC) que tiene una dirección en 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia, EE. UU., Código postal 20110. El repositorio de ATCC ha asignado el número de acceso PTA-9670 a la semilla del evento MON 87708.
Se puede producir un microorganismo que comprende una molécula de ADN que tiene las SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 presentes en su genoma. Un ejemplo de dicho microorganismo es una célula de planta transgénica. Los microorganismos, tales como una célula de planta de la invención, son útiles en muchas aplicaciones industriales, que incluyen pero no se limitan a: (i) usar como herramienta de investigación para investigación científica o

investigación industrial; (ii) uso en cultivo para producir carbohidratos endógenos o recombinantes, lípidos, ácidos nucleicos o productos proteínicos o moléculas pequeñas que pueden usarse para investigaciones científicas posteriores o como productos industriales; y (iii) utilizar con técnicas modernas de cultivo de tejidos de plantas para producir plantas transgénicas o cultivos de tejidos de plantas que luego puedan usarse para investigación o producción agrícola. La producción y el uso de microorganismos tales como células de plantas transgénicas utiliza técnicas microbiológicas modernas e intervención humana para producir un microorganismo único creado por el hombre. En este procedimiento, el ADN recombinante se inserta en el genoma de una célula de planta para crear una célula de planta transgénica que es separada y única de las células de planta naturales. Esta célula de planta transgénica puede cultivarse luego de forma similar a las células de bacterias y levaduras usando técnicas de microbiología moderna y puede existir en un estado unicelular no diferenciado. La composición genética y el fenotipo de la nueva célula de la planta es un efecto técnico creado por la integración del ADN heterólogo en el genoma de la célula.

Los procedimientos para usar microorganismos, tales como células de planta transgénicas, incluyen (i) procedimientos de producción de células transgénicas integrando ADN recombinante en el genoma de la célula y luego usando esta célula para derivar células adicionales que poseen el mismo ADN heterólogo; (ii) procedimientos de cultivo de células que contienen ADN recombinante usando técnicas modernas de microbiología; (iii) procedimientos de producción y purificación de productos de carbohidratos endógenos o recombinantes, lípidos, ácidos nucleicos o proteína de células cultivadas; y (iv) procedimientos para usar técnicas modernas de cultivo de tejidos de plantas con células de plantas transgénicas para producir plantas transgénicas o cultivos de tejidos vegetales transgénicos.

Las plantas de la invención pueden transmitir ADN del evento, incluyendo el transgén, a la progenie. Como se usa en la presente memoria, “progenie” incluye cualquier planta, semilla, célula de planta y/o parte de planta regenerable que comprende el ADN del evento derivado de una planta antecesora y/o un polinucleótido que tiene al menos una de las secuencias proporcionadas como SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2. Las plantas, la progenie y las semillas pueden ser homocigóticas o heterocigóticas para el transgén. La progenie puede cultivarse a partir de semillas producidas por una planta de evento de soja MON 87708 y/o a partir de semillas producidas por una planta fertilizada con polen de una planta de evento de soja MON 87708.

Las plantas de progenie pueden autopolinizarse (también conocidas como “autofecundación”) para generar una línea de plantas genéticamente pura, es decir, plantas homocigóticas para el transgén. La autofecundación de la progenie apropiada puede producir plantas que son homocigóticas para ambos genes exógenos añadidos.

Alternativamente, las plantas de la progenie pueden cruzarse externamente, por ejemplo, cruzarse con otra planta no relacionada, para producir una semilla o planta varietal o híbrida. La otra planta no relacionada puede ser transgénica o no transgénica. Por lo tanto, una semilla o planta varietal o híbrida puede derivarse cruzando un primer progenitor que carece del ADN específico y único del evento de soja MON 87708 con un segundo progenitor que comprende el evento de soja MON 87708, dando como resultado un híbrido que comprende el ADN específico y único del evento de soja MON 87708. Cada progenitor puede ser un híbrido o línea endogámica/varietal, siempre que la cruza o reproducción como resultado una planta o semilla de la invención, es decir, una semilla que tenga al menos un alelo que contenga el ADN específico y único del evento de soja MON 87708 y/o SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2. De este modo, dos plantas transgénicas diferentes se pueden aparear para producir una descendencia híbrida que contiene dos genes exógenos añadidos, que se segregan en forma independiente. Por ejemplo, lasoja tolerante a dicamba MON 87708 se puede cruzar con otra planta de soja transgénica para producir una planta que tenga las características de ambos progenitores transgénicos. Un ejemplo de esto sería una cruza de soja tolerante a dicamba MON 87708 con una planta que tiene uno o más rasgos adicionales tales como tolerancia a herbicida (por ejemplo, evento de soja 40-3-2 o evento de soja MON89788 (Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. Núm. 20060282915)), control de insectos (p. ej., el evento de soja MON87701 (Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. Núm. 20090130071)), y/u otros rasgos deseables (por ejemplo, composición de aceite mejorada tal como el evento de soja MON87769 (Publicación de Patente PCT WO2009102873)), dando como resultado una planta de progenie o semilla que es tolerante a dicamba y tiene uno o más rasgos adicionales. Los herbicidas para los que se ha demostrado tolerancia a plantas transgénicas y el procedimiento de la invención se pueden aplicar incluyen, pero no se limitan a: herbicidas de glifosato, glufosinato, sulfonilureas, imidazolinonas, bromoxinilo, delapon, ciclohexanodiona, inhibidores de protoporfirinógeno oxidasa y isoxasflutol. Las moléculas de nucleótidos que codifican proteínas implicadas en la tolerancia a herbicidas son conocidas en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, una molécula de nucleótido que codifica: 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa tolerante al glifosato (EPSPS) (véase, por ejemplo, patentes de EE.UU. 5,627,061; 5,633,435; 6,040,497; 5.094.945; 5,804,425; 6.248.876; 7,183,110; RE39,247); glifosato oxidorreductasa (GOX) (ver, por ejemplo, patentes de EE.UU. Núm. 5.776.760); glifosato-n-acetiltransferasa (GAT); una acetolactato sintasa tolerante a herbicidas (ALS, también conocida como acetohidroxiácido sintasa (AHAS)) para tolerancia a sulfonilureas, imidazolinonas, triazolopirimidinas, pirimidinil oxibenzoatos, sulfonilamino carbonil triazolinonas, y/o heteroaril éteres; una acetil coenzima A carboxilasa tolerante a herbicidas (ACCase) o R-2,4-diclorofenoxipropionato dioxigenasa (rdpA) para tolerancia a un ariloxifenoxipropionato (AOPP) (como haloxifop, quizalofop, diclorofop y diclofop); una proteína de desintoxicación tal como una 2,4-D dioxigenasa (tfdA), R-2,4-diclorofenoxipropionato dioxigenasa (rdpA), AriloxiAlcanoato Dioxigenasa (AAD) y/o S-2,4-diclorprop dioxigenasa (sdpA) para la tolerancia a herbicidas de auxina sintéticos; una bromoxinil

nitrilasa (Bxn) para la tolerancia a Bromoxinilo (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. Núm. 4.810.648); una fitoeno desaturasa (crtI) para la tolerancia a norflurazon; la resistencia a bialafos (bar) o la proteína de fosfinotricina acetiltransferasa (PAT) (véase, por ejemplo, patentes de EE.UU. Núm. 5,646,024 y 5,276,268) para tolerancia a glufosinato y bialafos; y una proteína para tolerancia a herbicidas tricetona (mezotriona, tembotriona, topromezona, isoxazol) como 4-Hidroxifenilpyruvato Dioxigenasa tolerante (HPPD), un desintoxicante de citocromo P450, o un bypass de la vía HPPD como HPP oxidasa (HPPO) de *Artbrobacter globiformis* y 4-HPA 1-hidroxilasa (HPAH) y NADH oxidorreductasa (HPAC) de *Pseudomonas acidovorans*.

También se contemplan el retrocruzamiento a una planta progenitora y el cruzamiento externo con una planta no transgénica, como es la propagación vegetativa. Las descripciones de otros procedimientos de reproducción que se usan comúnmente para diferentes características y cultivos se pueden encontrar en una de varias referencias, por ejemplo, Fehr, en los procedimientos de reproducción para el desarrollo de cultivares, Wilcox J. ed., Sociedad Americana de Agronomía, Madison WI (1987).

La invención proporciona una parte de planta que se deriva del evento de soja MON 87708. Como se usa en la presente memoria, una “parte de planta” se refiere a cualquier parte de una planta que está compuesta de material derivado de una planta de evento de soja MON 87708. Las partes de la planta incluyen, pero no se limitan a, polen, óvulo, vaina, flor, tejido de raíz o tallo, fibras y hojas. Las partes de la planta pueden ser viables, no viables, regenerables y/o no regenerables. También se describe aquí un producto básico que se deriva del evento de soja MON 87708. Como se usa en la presente memoria, un “producto básico” se refiere a cualquier composición o producto que se compone de material derivado de un cultivo, semilla, célula de planta, o parte de la planta de soja MON 87708. Los productos básicos pueden venderse a los consumidores y pueden ser viables o inviables. Los productos básicos no viables incluyen, pero no se limitan a semillas y granos no viables; semillas procesadas, partes de semillas y partes de plantas; tejido vegetal deshidratado, tejido vegetal congelado y tejido vegetal procesado; semillas y partes de plantas procesadas para la alimentación animal para el consumo de animales terrestres y/o acuáticos, aceite, harina, harina, copos, salvado, fibra, leche, queso, papel, crema, vino y cualquier otro alimento para consumo humano; y biomasas y productos de combustible. Los productos básicos viables incluyen, entre otros, semillas y células de planta. El evento de soja MON 87708 puede por lo tanto usarse para fabricar cualquier producto básico típicamente adquirido de soja. Cualquiera de tales productos básicos que se deriva del evento de soja MON 87708 puede contener al menos una cantidad detectable del ADN específico y único correspondiente al evento de soja MON 87708, y específicamente puede contener una cantidad detectable de un polinucleótido que contiene al menos 15 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. Se puede usar cualquier procedimiento estándar de detección para moléculas de nucleótidos, que incluye procedimientos de detección descritos en esta memoria. Un producto básico está dentro del alcance del descrito aquí si hay alguna cantidad detectable de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 en el producto básico.
Las plantas, la progenie, las semillas, las células de planta, las partes de plantas (tales como polen, óvulo, vaina, flor, tejido de raíz o tallo y hojas) y productos básicos son por lo tanto útiles para, entre otras cosas, cultivar plantas para el propósito de producir semillas y/o partes de plantas del evento de soja MON 87708 para fines agrícolas, produciendo la progenie del evento de soja MON 87708 para fines de cultivo e investigación de plantas, uso con técnicas microbiológicas para aplicaciones industriales y de investigación, y venta a

La invención proporciona procedimientos de control de malas hierbas y procedimientos de producción de plantas usando el herbicida dicamba y el evento de soja MON 87708. Se proporciona un procedimiento de control de malas hierbas en un campo y consiste en plantar plantas varietales o híbridas de soja MON 87708 en un campo y aplicar una dosis herbicidamente efectiva de dicamba al campo con el propósito de controlar malas hierbas en el campo sin dañar las plantas MON 87708. Dicha aplicación de herbicida dicamba puede ser anterior a la emeregencia, es decir, en cualquier momento después de plantar la semilla de MON 87708 y antes de que emerjan las plantas MON 87708, o postemergencia, es decir, en cualquier momento después de que emerjan las plantas MON 87708. También se proporciona otro procedimiento de control de malas hierbas en un campo y consiste en aplicar una dosis efectiva de herbicida dicamba para controlar malas hierbas en un campo y luego sembrar el evento de soja MON 87708 en el campo. Dicha aplicación de herbicida dicamba sería de presiembra, es decir, antes de plantar la semilla de MON 87708, y podría hacerse en cualquier momento antes de plantar, que incluye, pero no se limita a, aproximadamente 14 días antes de la siembra hasta aproximadamente 1 día antes de la siembra. La invención también proporciona un procedimiento de producción de semilla de soja esencialmente libre de semillas de especies de malas hierbas tóxicas plantando semillas de una variedad de soja tolerante a dicamba MON 87708 en un campo, aplicando una dosis efectiva posterior al brote de herbicida dicamba suficiente para matar la especie de mala hierba tóxica al campo, y cosechando la semilla del campo. Una dosis herbicidamente efectiva de dicamba para uso en el campo debe consistir en un intervalo de aproximadamente 0,0056 kg/ha a aproximadamente 8,96 kg por hectárea durante una temporada de crecimiento. Se pueden usar múltiples aplicaciones de dicamba durante una temporada de crecimiento, por ejemplo, dos aplicaciones (como una aplicación de pre-siembra y una aplicación de pos-emergencia o una aplicación de pre-emergencia y pos-emergencia) o tres aplicaciones (como una aplicación pre-siembra, aplicación de pre-emergencia y aplicación pos-emergencia).
Se proporcionan procedimientos de producción de una planta de soja tolerante a herbicidas que comprende las secuencias de ADN específicas y únicas del evento transgénico MON 87708 de la invención. Las plantas transgénicas utilizadas en estos procedimientos pueden ser homocigotas o heterocigotas para el transgén. Las plantas de progenie producidas por estos procedimientos pueden ser plantas varietales o híbridas; pueden cultivarse

a partir de semillas producidas por una planta de evento de soja MON 87708 y/o a partir de semillas producidas por una planta fertilizada con polen de una planta de evento de soja MON 87708; y pueden ser homocigotas o heterocigotas para el transgén. Las plantas de la progenie posteriormente pueden ser auto-polinizadas para generar una verdadera línea de reproducción de las plantas, es decir, plantas homocigotas para el transgén, o alternativamente puede cruzarse externamente, por ejemplo, reproducido con otra planta relacionada, para producir un varietal o una semilla híbrida o planta.

Una planta de soja que tolera la aplicación de herbicida dicamba puede ser producida por cruzamiento sexual de una planta del evento MON 87708 que comprende una molécula de nucleótidos que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 con otra planta de soja y producir de este modo las semillas, que luego se cultivan en plantas de progenie. Estas plantas de progenie se pueden tratar luego con herbicida dicamba para seleccionar plantas de progenie que sean tolerantes al herbicida dicamba. Alternativamente, estas plantas de progenie se pueden analizar usando procedimientos de diagnóstico para seleccionar plantas de progenie que contengan el ADN de evento MON 87708. La otra planta utilizada en el cruzamiento puede o no ser tolerante al herbicida dicamba y puede o no ser transgénica. La progenie de la planta y/o semilla producida puede ser semilla varietal o híbrida. Al poner en práctica este procedimiento, la etapa de cruzar sexualmente una planta con otra planta, es decir, polinizar en forma cruzada, puede lograrse o facilitarse mediante la intervención del hombre, por ejemplo: recolectando por la mano del hombre el polen de una planta y poniendo en contacto este polen con el estilo o estigma de una segunda planta; eliminando, destruyendo o cubriendo por la mano o acción del hombre el estambre o las anteras de una planta (por ejemplo, despanojado o mediante la aplicación de un gametocida químico) de modo de evitar la autopolinización natural y que pueda producirse la polinización cruzada para que ocurra la fertilización; mediante la colocación por acción del hombre de insectos polinizadores en una posición para “polinización dirigida” (por ejemplo, colocando colmenas en huertos o campos o enjaulando plantas con insectos polinizadores); mediante la apertura o eliminación de partes de la flor por acción del hombre para permitir la colocación o el contacto del polen extraño con el estilo o el estigma (p. ej., en la soya, que naturalmente tiene flores que dificultan o impiden la polinización cruzada, lo que las convierte en autopolinizadores naturales sin intervención del hombre); mediante la colocación selectiva de plantas (por ejemplo, plantando plantas intencionalmente en proximidad de polinización); y/o mediante la aplicación de productos químicos para precipitar la floración o para fomentar la receptividad (del estigma para el polen).
Una planta de soja que tolera la aplicación de herbicida dicamba se puede producir autopolinizando una planta de evento MON 87708 que comprende una molécula de nucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 y produce semilla, que luego se cultiva en plantas de progenie. Estas plantas de progenie se pueden tratar luego con herbicida dicamba para seleccionar plantas de progenie que sean tolerantes al herbicida dicamba. Alternativamente, estas plantas de progenie se pueden analizar usando procedimientos de diagnóstico para seleccionar plantas de progenie que contengan el ADN de evento MON 87708. Al poner en práctica este procedimiento, la etapa de cruzar sexualmente una planta consigo misma, es decir, por autopolinización o autofecundación, puede lograrse o facilitarse mediante intervención del hombre, por ejemplo: recogiendo mediante la mano del hombre el polen de la planta y poniendo este polen en contacto con la planta. estilo o estigma de la misma planta y luego, opcionalmente, previniendo una mayor fertilización de la planta; eliminando, destruyendo o cubriendo por la mano o acción del hombre el estambre o anteras de otras plantas cercanas (p. ej., despanojado o mediante la aplicación de un gametocida químico) de modo de evitar la autopolinización natural y que pueda producirse la polinización cruzada para que ocurra la fertilización; mediante la colocación humana de insectos polinizadores en una posición para “polinización dirigida” (por ejemplo, enjaulando una planta sola con insectos polinizadores); por manipulación humana de la flor o sus partes para permitir la autopolinización; mediante la colocación selectiva de plantas (por ejemplo, plantando plantas intencionadamente más allá de la proximidad de la polinización); y/o mediante la aplicación de productos químicos para precipitar la floración o para fomentar la receptividad (del estigma para el polen).

Las plantas y semillas de soja de la progenie abarcadas por estos procedimientos y producidas mediante el uso de estos procedimientos serán distintas de otras plantas de soja, por ejemplo porque las plantas y semillas de soja de la progenie son recombinantes y, como tales, creadas por intervención humana; son tolerantes a los herbicidas dicamba; contienen al menos un alelo que consiste en el ADN transgénico descrito en esta memoria; y/o contienen una cantidad detectable de una secuencia de polinucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2. Una semilla puede seleccionarse de una planta de progenie individual, y siempre que la semilla comprenda SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, estará dentro del alcance de lo descrito aquí. Al poner en práctica la invención, se pueden cruzar dos plantas transgénicas diferentes para producir descendientes híbridos que contienen dos genes heterólogos que se segregan de forma independiente. La autofecundación de la progenie apropiada puede producir plantas que son homocigotas para ambos genes. También se contemplan el retrocruzamiento a una planta parental y el cruzamiento externo con una planta no transgénica, al igual que la propagación vegetativa. Las descripciones de otros procedimientos que se usan comúnmente para diferentes rasgos y cultivos se pueden encontrar en una de varias referencias, por ejemplo, Fehr, en Breeding Methods for Cultivar Development, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison WI (1987).
Las plantas y semillas usadas en los procedimientos descritos en la presente también pueden contener uno o más transgenes adicionales. Dicho transgén puede ser cualquier secuencia de nucleótidos que codifica una proteína o molécula de ARN que confiere un rasgo deseable que incluye, pero no se limita a una mayor resistencia a los insectos, mayor eficacia de uso de agua, mayor rendimiento, mayor resistencia a la sequía, calidad de semilla

mejorada, calidad nutricional mejorada y/o aumento de la tolerancia al herbicida, en el que se mide el rasgo deseable con respecto a una planta de soja que carece de dicho transgén adicional.

Los procedimientos de la invención son por lo tanto útiles para, entre otras cosas, controlar malas hierbas en un campo mientras se cultivan plantas con el fin de producir semillas y/o partes de plantas del evento de soja MON 87708 para fines agrícolas o de investigación, seleccionando para progenie del evento de soja MON 87708 para el cultivo de plantas o fines de investigación, y la producción de plantas de progenie y semillas del evento de soja MON 87708.

Las plantas, progenie, semillas, células de planta, partes de plantas (tales como polen, óvulo, vaina, flor, tejido de raíz o tallo y hojas) y productos básicos de la invención se pueden evaluar para determinar la composición del ADN, la expresión génica y/o expresión de proteína. Dicha evaluación se puede realizar usando cualquier procedimiento estándar tal como PCR, transferencia Northern, análisis Southern, transferencia Western, inmunoprecipitación y ELISA o usando los procedimientos de detección y/o los kits de detección proporcionados en esta memoria.

Se proporcionan procedimientos de detección de la presencia de ADN derivado de una célula, tejido, semilla o planta de soja, del evento de soja MON 87708 en una muestra. Un procedimiento consiste en (i) extraer una muestra de ADN de al menos una célula, tejido, semilla o planta de soja, (ii) poner en contacto la muestra de ADN con un par de cebadores capaz de producir un amplicón a partir del ADN del evento MON 87708 bajo condiciones adecuadas para la amplificación de ADN, (iii) realizar una reacción de amplificación de ADN, y luego (iv) detectar la molécula de amplicón y/o confirmar que la secuencia de nucleótidos del amplicón comprende una secuencia de nucleótidos específica para el evento MON 87708, tal como una seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1-8. El amplicón debería ser uno que sea específico para el evento MON 87708, tal como un amplicón que comprenda SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. La detección de una secuencia de nucleótidos específica para el evento MON 87708 en el amplicón es determinante y/o diagnóstico de la presencia del ADN específico del evento de soja MON 87708 en la muestra. Un ejemplo de un par de cebadores que es capaz de producir un amplicón a partir del ADN del evento MON 87708 en condiciones apropiadas para la amplificación del ADN se proporciona como SEQ ID NO: 10-11. Otros pares de cebadores pueden ser fácilmente diseñados por un experto en la técnica y comprenderían al menos un fragmento de la SEQ ID NO: 6. Otro procedimiento de detección de la presencia de ADN derivado de una célula, tejido, semilla o planta de soja del evento de soja MON 87708 en una muestra consiste en (i) extraer una muestra de ADN de al menos una célula, tejido, semilla o planta de soja, (ii) poner en contacto la muestra de ADN con una sonda de ADN específica para el ADN del evento MON 87708 (iii) permitir que la sonda y la muestra de ADN se hibriden en condiciones de hibridación rigurosas, y luego (iv) detectar la hibridación entre la sonda y la muestra de ADN diana. Un ejemplo de la secuencia de una sonda de ADN que es específica para el ADN del evento MON 87708 se proporciona como SEQ ID NO: 11. El experto en la técnica puede diseñar fácilmente otras sondas que pueden comprender al menos un fragmento de la SEQ ID NO: 6. La detección de la hibridación de la sonda a la muestra de ADN es diagnóstica de la presencia de ADN específico del evento de soja MON 87708 en la muestra. La ausencia de hibridación es alternativamente diagnóstica de la ausencia de ADN específico del evento de soja MON 87708 en la muestra.

Se proporcionan kits de detección de ADN que son útiles para la identificación del ADN del evento de soja MON 87708 en una muestra y también se pueden aplicar a procedimientos para el cultivo de plantas de soja que contienen el ADN del evento apropiado. Dichos kits contienen cebadores y/o sondas de ADN que comprenden fragmentos de SEQ ID NO: 1-8. Un ejemplo de tal kit comprende al menos una molécula de ADN de longitud suficiente de nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO: 6 para funcionar como una sonda de ADN útil para detectar la presencia y/o ausencia de ADN derivado del evento de soja transgénica MON 87708 en una muestra. El ADN derivado del evento de soja transgénica MON 87708 comprendería SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7 y/o SEQ ID NO: 8. Se proporciona una molécula de ADN suficiente para usar como sonda de ADN que es útil para determinar, detectar o diagnosticar la presencia y/o ausencia de ADN de evento de soja, el ADN de MON 87708 se proporciona como SEQ ID NO: 11. Un experto en la técnica puede diseñar fácilmente otras sondas y deben comprender al menos 15 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO: 6 y ser suficientemente únicos para el ADN de evento de soja MON 87708 con el fin de identificar el ADN derivado del evento. Otro tipo de kit comprende un par de cebadores útil para producir un amplicón útil para detectar la presencia y/o ausencia de ADN derivado del evento de soja transgénica MON 87708 en una muestra. Tal kit emplearía un procedimiento que comprende poner en contacto una muestra de ADN diana con un par de cebadores como se describe aquí, luego realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico suficiente para producir un amplicón que comprende la SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO: 7, y/o SEQ ID NO: 8, y luego detectar la presencia y/o ausencia del amplicón. Tal procedimiento también puede incluir secuenciar el amplicón o un fragmento del mismo, lo que sería determinante, es decir, diagnóstico para la presencia del ADN específico del evento de soja MON 87708 en la muestra de ADN diana. Los expertos en la técnica pueden diseñar fácilmente otros pares de cebadores y deben comprender al menos 15 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 6 y ser suficientemente únicos para el ADN de MON 87708 del evento de soja con el fin de identificar el ADN derivado del evento.
La amplificación de ácidos nucleicos puede realizarse mediante cualquiera de los diversos procedimientos de amplificación de ácido nucleico conocidos en la técnica, que incluyen procedimientos de amplificación térmica. Se conocen muchas técnicas en la práctica de detectar, cuantificar y/o secuenciar el amplicón producido por estos

procedimientos. Una técnica ejemplar útil en la práctica de esta invención es TAQMAN® (PE Applied Biosystems, Foster City, CA).

Los kits y procedimientos de detección de la invención son útiles para, entre otras cosas, identificar el evento de soja MON 87708, seleccionar variedades vegetales o híbridos que comprenden el evento de soja MON 87708, detectar la presencia de ADN derivado del evento de soja transgénico MON 87708 en una muestra, y muestras de control para la presencia y/o ausencia del evento de soja MON 87708 o partes de plantas derivadas del evento de soja MON 87708.

La secuencia del inserto de ADN heterólogo, secuencias de unión o secuencias flanqueantes del evento de soja MON 87708 (con muestras de semilla representativas depositadas como ATCC PTA-9670) puede verificarse (y corregirse si es necesario) amplificando tales secuencias del evento utilizando cebadores derivados de las secuencias proporcionadas en esta memoria seguido de secuenciación de ADN estándar del amplicón o del ADN clonado.

Ejemplos

Ejemplo 1: Transformación de selección de eventos de soja A3525 y MON 87708

La planta de soja MON 87708 se produjo por transformación de soja mediada por Agrobacterium. Las células de soja se transformaron y se regeneraron en plantas de soja intactas y las plantas individuales se seleccionaron de la población de plantas que mostraron integridad del casete de expresión de la planta y resistencia a dicamba. De esta población, se seleccionó y caracterizó el evento de la planta de soja MON 87708.

La planta transgénica MON 87708 de soja tolerante a dicamba se desarrolló mediante transformación mediada por *Agrobacterium* de tejido de meristema de soja utilizando el vector de transformación PV-GMHT4355. El procedimiento se describió en la patente de EE.UU. Núm. 6.384.301, que permite la generación de plantas transformadas sin utilización de callo. Brevemente, se extirparon tejidos de meristema de los embriones de semillas de soja A3525 germinadas (Asgrow, St Louis, MO). Después del cocultivo con *Agrobacterium* portador del vector, los meristemos se colocaron en medio de selección que contenía glifosato (Monsanto, St Louis, MO), sal disódica de carbenicilina, sal sódica de cefotaxima y mezcla de sal disódica de ticarcilina/clavulanato de potasio para inhibir el crecimiento de las células de planta no transformadas y exceso de *Agrobacterium*. Los meristemos se colocaron luego en medios propicios para el desarrollo de brotes y raíces. Las plantas enraizadas con características fenotípicas normales se seleccionaron y se transfirieron al suelo para su crecimiento y posterior evaluación.

Las plantas R0 generadas a través de la transformación anterior se transfirieron a la tierra para el crecimiento y luego se autofecundaron para producir la semilla R1. Durante la autofecundación posterior de las plantas R0 para producir la generación R1, se separaron las inserciones no unidas de T-ADN I (casete de expresión *dmo*) y T-ADN II (casete de expresión *cp4 epsps*). Se aplicó una dosis no letal de glifosato a las plantas R1. Las plantas con lesiones menores se seleccionaron para análisis adicionales, mientras que las plantas que no mostraban lesión, es decir, que contenían T-ADN II (casete de expresión *cp4 epsps*) se eliminaron del desarrollo posterior. Posteriormente, se identificaron las plantas R0 que contienen solo un único inserto de T-ADN I (es decir, casete del gen *dmo*).

El casete de expresión de T-ADN I comprendía el promotor del virus de la estría clorótica crónica del maní (PC1SV) con una región potenciadora duplicada (P-PC1SV.FLt-enh); operativamente unido a un líder de ADN derivado del transcrito de ARN del virus del grabado del tabaco (L-TEV); operativamente unido a una molécula de ADN que codifica un péptido de tránsito de cloroplastos N-terminal a partir de la subunidad pequeña de ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa (SSU) de *Pisum sativum* (TS-RbcS-3C); operativamente unido a parte de la proteína madura de la subunidad pequeña de ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa (SSU) de *Pisum sativum* (CR-RbcS-3C); operativamente ligado a una molécula de ADN que codifica una dicamba monooxigenasa (DMO) de *Stenotrophomonas maltophilia* (*Pseudomonas maltophilia* fue el nombre original de la fuente del gen DMO. Este organismo fuente se reclasificó posteriormente primero como *Xanthomonas maltophilia* y luego como *Stenotrophomonas maltophilia*); operativamente unido a una molécula de ADN 3' UTR derivada del gen de la subunidad pequeña de la ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa de *Pisum sativum* (TPs RbcS2-E9). Las plantas se seleccionaron mediante una combinación de técnicas analíticas, que incluyen TaqMan, análisis por PCR y pulverización con herbicida. El evento MON 87708 se seleccionó entre aproximadamente 2.400 eventos transgénicos individuales basados en sus características fenotípicas superiores, un análisis de perfil molecular completo y su asociación de haplotipos deseable. El evento MON 87708 se cruzó luego con el evento MON 89788 (tolerante al glifosato). La progenie de este cruza se trató con dicamba (Clarity®, BASF, Research Triangle Park, NC), glifosato (Roundup WeatherMAX®, Monsanto Co., St Louis, MO), o una combinación de dicamba y glifosato. Los tratamientos se realizaron antes de la planta, después de la planta en la etapa de crecimiento vegetativo 3 (V3), y después de la planta en la etapa de reproducción 1 (R1). Las plantas tratadas se puntuaron para el porcentaje de inhibición del crecimiento a los 14 días después del tratamiento (DAT) para el tratamiento con herbicida previo a la planta, 3 DAT para el tratamiento post-emergencia en la etapa VE y 3 DAT post-emergencia en la etapa R1. El (los) herbicida (s) se aplicaron a diversas velocidades por acre, como se muestra en la Tabla 1. Las mediciones de inhibición porcentual representan un promedio de las repeticiones.

Tabla 1: Prueba de tolerancia de Dicamba y/o Roundup WeatherMAX® con MON89788 x MON 87708

Herbicida (a.e. Tasa gm/ha (lb/a))	% de inhibición a 14 DAT PRE	% de inhibición a 3 DAT POST (V3)	% de inhibición a 3 DAT POST (R1)
Sin tratamiento/Sin herbicida	0,0	0,0	0,0
Roundup WeatherMAX® (3364 (3.0))	0,0	0,0	0,0
Clarity® (2244 (2.0))	0,0	10,0	20,0
Clarity®561 (0.5) y Roundup WeatherMAX® (841 (0.75))	0,0	5,0	10,0
Clarity® (1120 (1.0)) y Roundup WeatherMAX® (1682 (1.5))	0,0	7,5	12,5
Clarity® (2244 (2.0)) y Roundup WeatherMAX® (3364 (3.0))	0,0	22,5	25,0

El transgén de tolerancia a dicamba se mapeó en el evento de soja MON 87708 al grupo de unión 9 aproximadamente en la posición 143.5 del mapa. La ventana de haplotipos asociada 19743 y 19767 no tiene ningún efecto sobre el rendimiento, la madurez, la altura o el volcado. La información de asociación de haplotipos se proporciona en la Tabla 2, donde GM_A92205 indica el evento MON 87708.

Tabla 2: Asociación de haplotipos LG9, Pos 143.5

Evento	Ventana de haplotipo	ID de haplotipo	Rendimiento	Maduración	Altura	Volcado	Secuencia del haplotipo	Grupo de vinculación
GM_ A92205	19743	1573355	0,00	-0,03	0,06	0,04	CGCTG	
GM_ A92205	19743	1573357	0,00	0,07	-0,03	-0,04	CGCTA	9
GM_ A92205	19743	1573371	0,00	-0,09	-0,41	-0,09	CCCTG	9
GM_ A92205	19743	1573373	0,00	-0,20	-0,01	-0,03	TG*GG	9
GM_ A92205	19743	1573374	0,00	-0,08	-0,07	0,05	TG*GA	9
GM_ A92205	19743	1573375	0,00	-0,15	0,05	0,04	CCCTA	9
GM_ A92205	19743	1573376	0,00	-0,45	-0,14	0,00	TC*GG	9
GM_ A92205	19743	1573486	0,00	0,00	-0,03	0,00	TACGGTC	9
GM_ A92205	19743	1573493	0,00	0,00	0,22	0,00	AACAATT	9
GM_ A92205	19767	1573494	0,00	0,00	0,03	0,00	TACAATC	9
GM_ A92205	19767	1573495	0,00	0,00	0,07	0,00	TGAAACC	9
GM_ A92205	19767	1573497	0,00	0,00	0,41	0,00	TACGGTT	9
GM_ A92205	19767	1573499	0,00	0,00	-0,01	0,00	TGAAACT	9
GM_ A92205	19767	1573500	0,00	0,00	0,06	0,00	TGAGACC	9

GM_ A92205	19767	1573502	0,00	0,00	-0,07	0,00	AACAATC	9
GM_ A92205	19767	1573503	0,00	0,00	0,08	0,00	AACGATC	9
GM_ A92205	19767	1573504	0,00	0,00	0,07	0,00	TACAGTC	9
GM_ A92205	19767	1573506	0,00	0,00	-0,03	0,00	AACGATT	9
GM_ A92205	19767	1573507	0,00	0,00	0,20	0,00	TGAAATT	9

Ejemplo 2: Caracterización de las secuencias de ADN de MON 87708

El ADN insertado en el genoma de la planta de soja MON 87708 y la secuencia flanqueante se caracterizaron por análisis moleculares detallados. Estos análisis incluyeron: la secuencia insertada, el número de inserción (número de sitios de integración dentro del genoma de la soja), el número de copias (número de copias del ADN transgénico dentro de un locus), la integridad del casete del gen insertado, las secuencias flanqueantes y la asociación de la inserción con las regiones de haplotipos del genoma de la soja.

Se usaron sondas de ADN molecular que incluían la región de codificación intacta y sus respectivos elementos reguladores, los promotores, intrones y secuencias de poliadenilación de los casetes de expresión de plantas. El análisis mostró que MON 87708 contiene una inserción de ADN transgén único con una copia del casete de expresión. Se realizaron análisis de secuencia de ADN y PCR inversa para determinar las uniones del genoma inserto a planta 5' y 3', confirmar la organización de los elementos dentro del inserto (Figura 1) y determinar la secuencia de ADN completa del inserto en la planta de soja MON 87708 (proporcionado aquí como SEQ ID NO: 5). Una planta de soja que comprende en su genoma los elementos genéticos transgénicos unidos mostrados en la Figura 1 y es resistente a dicamba es un aspecto de la invención.

Las secuencias que flanquean la inserción de ADN transgénico en MON 87708 se determinaron usando PCR inversa como se describe en Ochman et al., 1990 (PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc.) y/o técnicas de caminado del genoma. El ADN genómico de la planta se aisló tanto de A3525 como de líneas de soja transgénica a partir de tejido cultivado en condiciones de invernadero estándares. Aproximadamente 1 gramo de tejido foliar joven se combinó con nitrógeno líquido y se molió hasta obtener un polvo fino usando un mortero y un pilón. El ADN se extrajo utilizando un kit de extracción de ADN genómico Nucleon™ PhytoPure™ (RPN8511, Amersham, Piscataway, NJ) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Después de la etapa de precipitación final, el ADN se resuspendió en 0,5 ml de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM). Este procedimiento puede ser modificado por un experto en la técnica para extraer ADN de cualquier tejido de semilla de soja, que incluye, pero no se limita a semillas. Se digirió una alícuota de ADN con endonucleasas de restricción seleccionadas basándose en el análisis de restricción del ADN transgénico. Después del autoligamiento de los fragmentos de restricción, la PCR se realizó usando cebadores diseñados a partir de la secuencia de ADN del transgén que amplificarían las secuencias que se extendían desde los extremos 5' y 3' del ADN transgénico. Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se purificaron usando un kit de purificación de gel QIAGEN (Qiagen, Valencia, CA).

Los productos de ADN posteriores se secuenciaron directamente usando protocolos de secuenciación de ADN estándar. La secuencia flanqueante 5' que se extiende dentro de la secuencia del límite derecho del ADN del transgén del casete de expresión se presenta como la SEQ ID NO: 3 ([C], véase la Figura 1). La secuencia flanqueante 3' que se extiende hasta la secuencia del borde izquierdo del ADN transgénico del casete de expresión se presenta como SEQ ID NO: 4 ([D], véase la Figura 1). La porción del ADN del casete de expresión que estaba completamente integrada en el ADN genómico de A3525 se presenta como la SEQ ID NO: 5 ([E], véase la Figura 1). Se compararon secuencias de moléculas de ADN aisladas con la secuencia de ADN transgénica para identificar la secuencia flanqueante y el fragmento de ADN transgénico co-aislado. La confirmación de la presencia del casete de expresión se logró mediante PCR con cebadores diseñados basándose en los datos de la secuencia flanqueante deducida y la secuencia de ADN transgénica conocida. La secuencia de tipo salvaje correspondiente a la misma región en la que se integró el ADN transgénico en la línea transformada se aisló usando cebadores diseñados a partir de las secuencias flanqueantes en MON 87708. Las reacciones de PCR se realizaron usando el sistema de amplificación Elongase® (Invitrogen, Carlsbad, CA) Las secuencias de ADN flanqueantes en MON 87708 y la secuencia de tipo salvaje A3525 se analizaron contra múltiples bases de datos de nucleótidos y proteínas. Esta información se utilizó para examinar la relación del transgén con el genoma de la planta y buscar la integridad del sitio de inserción. La secuencia flanqueante y las secuencias de tipo salvaje se usaron para diseñar cebadores para los ensayos de punto final TAQMAN® usados para identificar los eventos. Los ensayos de cigosidad se desarrollaron usando esta información.

Ejemplo 3: Ensayos TAQMAN® de punto final específicos de evento**.**

Este ejemplo describe un procedimiento de amplificación térmica TAQMAN® de punto final específico del evento desarrollado para identificar el evento MON 87708 en una muestra. Ejemplos de condiciones útiles con el evento MON 87708 El procedimiento específico de punto final TAQMAN® es el siguiente: Etapa 1: agua de 18 megaohmios ajustada a un volumen final de 10 µl Etapa 2: 5,0 µl de 2X Universal Master Mix (dNTPs, enzima, tampón) a 1X concentración final. Etapa 3: 0,5 µl del Cebador-1 del Evento de (SQ13570) y mezcla de Cebador-2 del Evento (SQ13571) (resuspendido en agua de 18 megaohmios a una concentración de 20 µM para cada cebador) a una concentración final de 1,0 µM (por ejemplo, en un tubo de microcentrífuga, se debe añadir lo siguiente para alcanzar 500 µl en una concentración final de 20 uM: 100 µl de Cebador SQ13570 (SEQ ID NO: 9) a una concentración de 100 µM; 100 µl de Cebador SQ13571 (SEQ ID NO: 10) a una concentración de 100 µM; 300 µl de agua de 18 megaohmios). Etapa 4: Se añadieron 0,2 µl de sonda PB4655 del Evento 6-FAM™ MGB (resuspendida en agua a 18 megohmios a una concentración de 10 µM (SEQ ID NO: 11) a una concentración final de 0,2 µM Etapa 5: 0,5 µl de mezcla de Control interno de Cebador-1 y Control interno de Cebador-2 (resuspendida en agua de 18 megaohmios a una concentración de 20 µM para cada cebador) a una concentración final de 1,0 µM Etapa 6: 0,2 µl de Control Interno de Sonda VIC™ a una concentración final de 0,2 µM (resuspendida en agua de 18 megaohmios a concentración de 10 µM) Etapa 7: 3,0 µl de ADN extraído (molde) para cada muestra con una de cada una de las siguientes, que comprende 1. Muestras de hojas para analizar, 2. Control negativo (ADN no transgénico), 3. Control negativo del agua (sin molde) 4. Control positivo de ADN de MON 87708. Etapa 8: Condiciones de termociclador de la siguiente manera: un ciclo a 50°C durante 2 minutos; Un ciclo a 95°C durante 10 minutos; Diez ciclos de 95°C durante 15 segundos, luego 64°C durante 1 minuto con -1°C/ciclo; Treinta ciclos de 95°C durante 15 segundos y luego 54°C 1 minuto; ciclo final de 10 °C.

Los cebadores de ADN utilizados en el ensayo del punto final son los cebadores SQ13570 (SEQ ID NO: 9), SQ13571 (SEQ ID NO: 10) y la sonda marcada con 6-FAM ™ PB4655 (SEQ ID NO: 11). 6-FAM ™ es un producto de colorante fluorescente de Applied Biosystems (Foster City, CA) unido a la sonda de ADN. Para las sondas TAQMAN® MGB™, la actividad 5'exonucleasa de la Taq ADN polimerasa escinde la sonda desde el extremo 5', entre el fluoróforo y el inactivador. Cuando se hibrida con la cadena de ADN diana, el inactivador y el fluoróforo se separan lo suficiente como para producir una señal fluorescente, liberando así la fluorescencia. SQ13570 (SEQ ID NO: 9) y SQ13571 (SEQ ID NO: 10) cuando se usan con estos procedimientos de reacción con PB4655 (SEQ ID NO: 11) producen un amplicón de ADN que es diagnóstico para el ADN del evento MON 87708. Los controles para este análisis deben incluir un control positivo de soja que contiene el ADN del evento MON 87708, un control negativo de la soja no transgénica y un control negativo que no contiene molde de ADN. Además, un control para la reacción de PCR incluye cebadores de control interno y una sonda de control interno, específica para un gen de copia única en el genoma de la glicina. Un experto en la materia sabrá cómo diseñar cebadores específicos para un gen de copia única en el genoma de glicina. Estos ensayos están optimizados para su uso ya sea con un sistema de PCR Applied Biosystems GeneAmp® 9700 (funcionando a velocidad máxima) o con un termociclador MTC Research DNA Engine PTC-225. Otros procedimientos y aparatos conocidos por los expertos en la materia que producen amplicones que identifican el evento ADN de MON 87708 están dentro de la experiencia en la técnica.
Se permitió que las plantas R0 que demostraban la presencia del casete de expresión se desarrollaran en plantas completamente maduras. Las sondas diseñadas basadas en las secuencias del casete transgénico de tolerancia a dicamba se usaron para sondear transferencias Southern para determinar el ligamiento. Las plantas R0 también se evaluaron para el número de copias del casete de expresión usando una combinación de análisis Southern y TAQMAN® de punto final.

Un ensayo de zigosidad es útil para determinar si una planta que comprende un evento es homocigótico para el ADN del evento; que comprende el ADN exógeno en la misma ubicación en cada cromosoma de un par cromosómico; o heterocigótico para un ADN de evento, que comprende el ADN exógeno en solo un cromosoma de un par cromosómico; o es nulo para el evento ADN, que es de tipo salvaje. El procedimiento de amplificación térmica TAQMAN® de punto final también se usó para desarrollar ensayos de zigosidad para el evento MON 87708. Este ejemplo describe un procedimiento de amplificación térmica TAQMAN® de punto final específico del evento desarrollado para determinar la cigosidad del evento MON 87708 en una muestra. Para este ensayo, se empleó un ensayo de tres cebadores en el que el cebador SQ20632 (SEQ ID NO: 12) hibrida y se extiende específicamente desde la unión 3' del ADN exógeno y ADN genómico insertado, el cebador SQ20636 (SEQ ID NO: 13) se hibrida y se extiende específicamente del ADN que flanquea el lado 3' del ADN exógeno insertado, y el cebador SQ20637 (SEQ ID NO: 14) se hibrida y se extiende específicamente desde el ADN genómico al que se integró el ADN exógeno insertado. Los tres iniciadores son diagnósticos para el evento. En este ejemplo, el cebador SQ20636 (SEQ ID NO: 13) y el cebador SQ20632 (SEQ ID NO: 12) y la sonda de oligonucleótido marcada con 6-FAM™ PB10130 (SEQ ID NO: 15) son diagnósticos cuando hay una copia del inserto de ADN exógeno. En este ejemplo, SQ20636 (SEQ ID NO: 13) y el cebador SQ20637 (SEQ ID NO: 14) y la sonda de oligonucleótido marcada con VIC™ PB10131 (SEQ ID NO: 16) son diagnósticos cuando no hay copia del ADN exógeno insertado presente en el ADN genómico, es decir, de tipo salvaje. Cuando los tres cebadores y las dos sondas se mezclan juntos en una reacción de PCR con ADN extraído de una planta homocigótica para el evento MON 87708, hay una señal fluorescente solo de la sonda de oligonucleótido marcada con 6-FAM™ PB10130 (SEQ ID NO: 15) que es indicativo de y diagnostica una planta homocigótica para el evento MON 87708. Cuando los tres cebadores y las dos sondas se mezclan en una reacción de PCR con ADN extraído de una planta heterocigótica para el evento MON 87708, hay una señal

fluorescente tanto de la sonda de oligonucleótido marcada con 6-FAM™ PB10130 (SEQ ID NO: 15) como de la sonda de oligonucleótido marcada con VIC™ PB10131 (SEQ ID NO: 16) que es indicativa de una planta heterocigota y diagnóstica para el evento MON 87708. Cuando los tres cebadores y dos las sondas se mezclan juntas en una reacción de PCR con ADN extraído de una planta que es nulo para el evento MON 87708 (es decir, de tipo silvestre), hay una señal fluorescente de solo la sonda de oligonucleótido marcada con VIC™ PB10131 (SEQ ID NO: 16) que es indicativa y diagnóstica de una planta nula para el evento MON 87708, es decir, de tipo salvaje. Ejemplos de condiciones útiles con este procedimiento son los siguientes. Etapa 1: agua de 18 megaohmios ajustada a un volumen final de 10 µl. Etapa 2: 5,0 µl de 2X Universal Master Mix (Applied Biosystems cat # 4304437; dNTPs, enzima, buffer) hasta una concentración final 1X. Etapa 3: 0,5 µl de Cebadores de cigosidad SQ20632, SQ20636, SQ20637 (resuspendidos en agua de 18 megaohmios a una concentración de 20 µM para cada cebador) hasta una concentración final de 1,0 µM. Etapa 4: 0,2 µl de sonda 6-FAM™ PB10130 (SEQ ID NO: 15) (resuspendida en agua de 18 megaohmios a una concentración de 10 µM) a una concentración final de 0,2 µM. Etapa 5: 0,2 µl de sonda VIC™ PB10131 (SEQ ID NO: 16) (resuspendida en agua de 18 megaohmios a una concentración de 10 µM) a una concentración final de 0,2 µM. Etapa 6: 3,0 µl de ADN extraído (molde) para cada muestra con uno de cada uno de los siguientes que comprenden 1. Muestras de hojas a analizar (4-80 ng de ADN genómico diluido en agua); 2. Control negativo (ADN de soja no transgénico, 4 ng diluido en agua); 3. Control negativo del agua (sin molde, solución en la que se resuspendió el ADN); 4. ADN genómico de control positivo MON 87708 a partir de un evento heterocigótico conocido (4 ng diluido en agua); 5. 4. ADN genómico de control positivo MON 87708 a partir de un evento homocigótico conocido (4 ng diluido en agua). Etapa 7: mezclar suavemente. Etapa 8: La condiciones de termociclador cuando se utiliza Applied Biosystems GeneAmp® PCR System 9700 (funcionamiento a velocidad máxima) o el termociclador MTC Research DNA Engine PTC-225 son las siguientes: un ciclo a 50 °C durante 2 minutos; un ciclo a 95 °C durante 10 minutos; diez ciclos de (95 °C durante 15 segundos y luego 64 °C durante 1 minuto (-1°C/ciclo); treinta ciclos de (95 °C durante 15 segundos y luego 54 °C durante 1 minuto); opcional adicional de 10 a 20 ciclos (95°C durante 15 segundos y luego 64 °C durante 1 minuto (-1°C/ciclo) pueden proporcionar una separación de población más distintiva durante el análisis con TaqMan® de punto final; un ciclo de mantenimiento a 10°C.

Ejemplo 4: Identificación de evento MON 87708 en cualquier actividad de reproducción de MON 87708

El siguiente ejemplo describe cómo se puede identificar el evento MON 87708 dentro de la progenie de cualquier actividad de reproducción usando el evento de soja MON 87708.

Se usan pares de cebadores de eventos de ADN para producir un amplicón diagnóstico para el evento de soja MON 87708. Un amplicón diagnóstico para MON 87708 comprende al menos una secuencia de unión, proporcionada como SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8. Los pares de cebadores de eventos que producirán un amplicón de diagnóstico para MON 87708 incluyen pares de cebadores basados en las secuencias flanqueantes y el casete de expresión insertado. Para adquirir un amplicón de diagnóstico en el que se encuentra la SEQ ID NO: 1, se diseñaría una molécula de cebador directo basada en SEQ ID NO: 3 de las bases 1 a 1126 y una molécula de cebador inversa basada en la secuencia de ADN de casete de expresión insertada (SEQ ID NO: 5 de las posiciones 1 a 3003) en el que las moléculas de cebador tienen una longitud suficiente de nucleótidos contiguos para hibridar específicamente con SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 5. Adquirir un amplicón de diagnóstico en el que SEQ ID NO: 2 es encontrado, se diseñaría una molécula de cebador directo basada en la secuencia de ADN del casete de expresión insertado (SEQ ID NO: 5 de las posiciones 1 a 3003) y una molécula cebador inversa basada en la secuencia flanqueante 3' (SEQ ID NO: 4 de bases 131 a 1947), en la que las moléculas cebadores tienen suficiente longitud de nucleótidos contiguos para hibridar específicamente a SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5. A efectos prácticos, se deben diseñar cebadores que produzcan amplicones de un intervalo de tamaño limitado, por ejemplo, entre 100 y 1000 bases. Los amplicones de tamaño más pequeño (longitud de polinucleótido más corta) en general se producen de manera más fiable en reacciones de PCR, permiten tiempos de ciclo más cortos y pueden separarse fácilmente y visualizarse en geles de agarosa o adaptarse para su uso en ensayos de TAQMAN® de punto final . Los amplicones más pequeños se pueden producir y detectar mediante procedimientos conocidos en la técnica de detección de amplicones de ADN. Además, los amplicones producidos usando los pares de cebadores se pueden clonar en vectores, propagar, aislar y secuenciar o se pueden secuenciar directamente con procedimientos bien establecidos en la técnica. Cualquier par de cebadores derivado de la combinación de SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 5 o la combinación de SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 que son útiles en un procedimiento de amplificación de ADN para producir un amplicón diagnóstico para MON 87708 o su progenie es un aspecto de la invención. Cualquier molécula única de cebador de polinucleótido de ADN aislada que comprenda al menos 11 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 3, o su complemento que sea útil en un procedimiento de amplificación de ADN para producir un amplicón diagnóstico de MON 87708 o su progenie, es un aspecto de la invención. Cualquier molécula de cebador de polinucleótido de ADN aislado que comprenda al menos 11 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 4, o su complemento que sea útil en un procedimiento de amplificación de ADN para producir un amplicón diagnóstico de MON 87708 o su progenie es un aspecto de la invención. Cualquier molécula de cebador de polinucleótido de ADN aislado que comprenda al menos 11 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 5, o su complemento que sea útil en un procedimiento de amplificación de ADN para producir un amplicón diagnóstico de MON 87708 o su progenie es un aspecto de la invención.

Un ejemplo de las condiciones de amplificación para este análisis se ilustra en el Ejemplo 3. Sin embargo, cualquier modificación de estos procedimientos o el uso de cebadores de ADN homólogos o complementarios a SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 o secuencias de ADN de los elementos genéticos contenidos en la inserción de transgén (SEQ ID NO: 5) de MON 87708 que producen un amplicón diagnóstico para MON 87708 están dentro de la técnica. Un amplicón de diagnóstico comprende una molécula de ADN homóloga o complementaria a al menos un ADN transgénico/de unión genómica (SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8), o una parte sustancial de la misma.

Un análisis para la muestra de tejido de planta de evento MON 87708 debe incluir un control de tejido positivo del evento MON 87708, un control negativo de una planta de soja que no es el evento MON 87708 (por ejemplo, pero no limitado a A3525) y un control negativo que no contiene ADN genómico de soja. Un par de cebadores que amplificará una molécula de ADN de soja endógena servirá como un control interno para las condiciones de amplificación del ADN. Secuencias de cebador adicionales se pueden seleccionar de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5 por los expertos en la técnica de los procedimientos de amplificación de ADN, y las condiciones seleccionadas para la producción de un amplicón por los procedimientos mostrados en el ejemplo 3 puede diferir, pero dar como resultado un amplicón diagnóstico para el ADN del evento MON 87708. El uso de estas secuencias de cebador de ADN con modificaciones a los procedimientos del Ejemplo 3 está dentro del alcance de la invención. El amplicón producido por al menos una secuencia de cebador de ADN derivada de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, o SEQ ID NO: 5 que es diagnóstico para MON 87708 es un aspecto de la invención.
Los kits de detección de ADN contienen al menos un cebador de ADN de suficiente longitud de nucleótidos contiguos derivados de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, o SEQ ID NO: 5, que cuando se usa en un procedimiento de amplificación de ADN produce un amplicón diagnóstico para MON 87708 o su progenie es un aspecto de la invención. Una planta de soja MON 87708, parte de planta, célula de planta, semilla o producto básico que producirá un amplicón diagnóstico para MON 87708 cuando se ensaya en un procedimiento de amplificación de ADN es un aspecto de la invención. El ensayo para el amplicón MON 87708 puede realizarse usando un sistema Applied Biosystems GeneAmp® PCR System 9700 (funcionamiento a velocidad máxima) o el termociclador MJ Research DNA Engine PTC-225 o cualquier otro sistema de amplificación que pueda usarse para producir un amplicón diagnóstico de MON 87708 como se muestra en el Ejemplo 3.
Un depósito de una muestra representativa de la semilla de evento de soja MON 87708 descrita anteriormente y descrita en las reivindicaciones se ha realizado según el Tratado de Budapest con la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA. 20110. El número de acceso de ATCC para este depósito es PTA-9670. El depósito se mantendrá en el depósito durante un período de 30 años, o 5 años después de la última solicitud, o durante la vigencia de la patente, el que sea mayor, y se reemplazará según sea necesario durante ese período.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Monsanto Technology LLC
Brinker, Ronald J
Burns, Wen C.
Feng, Paul C.C.
Gupta, Anju
Hoi, Soi-Wai
Malven, Marianne
Wu, Kunsheng

<120> Evento transgénico de soja MON 87708 y procedimientos de uso del mismo

<130> 38-21(55544)0000

<140> US ##/###, ###
<141> 2010-##-##

<150> 61/243,227
<151> 2009-09-17

<160> 16

<170> Versión de patentado 3.5

<210> 1
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Molécula de ADN quimérico de ADN genómico de soja y ADN transgénico

<400> 1
ttgatctcca tgagccattt agtctcacct tcaaacactg atagtttaaa ctgaaggcgg 60

<210> 2
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Molécula de ADN quimérico de ADN genómico de soja y ADN transgénico

<400> 2
tcattgctga tccatgtaga tttcccggac tttagctcaa aatgcatgta tttattagcg 60

<210> 3
<211> 1300
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Molécula de ADN quimérico de ADN genómico de soja y ADN transgénico

<400> 3

gtacaaataa aactttatct gtacatttcg ttagttaaat tatattttgt ccatcaaatt 60

gttcctttaa attaaaatct aaaaactaac tttaccgtaa agaaatatgc attcatgtat 120

accaaataaa attttgacaa gagtttaagt tttatattat gattcttaag gaaatcatta 180

tcattataat ttataaaaat aaataaattg ataattatat gctatatcaa tttatgattt 240

gatgagtatg tatgttttaa atgcgagatt ctgccgccgt tcgatatagt tagcagtaga 300

gccctgttct caccctcaca cctgctcagt gtgaacttta aaagggactt tgttgacaaa 360

tgttaggatc gtcgtcttct tttgcaataa aaaattttca tctgtttaaa acgtttttat 420

agtaaaatta taaatagaaa atttagttgt aaaatttgaa atataaattt aattagaatg 480

cattcacatt gtaattcttt tacattatta tttattacct aattataaat tatcaacaat 540

aaaatctgac atagtatatg tttagattaa aatttgtaaa tgtaagtttg aattaaaaaa 600

gtatattata aacttgagtt tggtataata ttttttatca tcagactttg gtataatatg 660

agttgatcta aaagtaagtt gaaggatacc aaagggtaat ctaaacatgc atgagaaatg 720

ttggggaata tctttagtgt aaacaaaaag ccttataaat tatcatgtca tactatatat 780

gacaaatgtt ggtttttgta ataatcattt taaatatgaa caacaggatt ttctttttac 840

cgtcaaaata tgaataaaag ttaaactctt aaattattga tcataggttt gcaatttttt 900

tttatagaga ggtttgcaat ttctgagttc tcaataactg atgattaaat gcgcatcgtt 960

tgcatgcatg aaaataaatt taagaggtaa catttgaagt ctcaccttca tgtccggggc 1020

tgccaggaaa gcttagatct ccatgagcat ccacgagctt atccacgagc atccacgagc 1080

ttatccgatt tgagcattga tctccatgag ccatttagtc tcaccttcaa acactgatag 1140

tttaaactga aggcgggaaa cgacaatctg atccccatca agctagcttc tgcaggtcct 1200

gctcgagcgg ccgcagatct tgagccaatc aaagaggagt gatgtagacc taaagcaata 1260

atggagccat gacgtaaggg cttacgccca tacgaaataa 1300

<210> 4
<211> 1947
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Molécula de ADN quimérico de ADN genómico de soja y ADN transgénico

<400> 4

atgtactttc attttataat aacgctgcgg acatctacat ttttgaattg aaaaaaaatt 60

ggtaattact ctttcttttt ctccatattg accatcatac tcattgctga tccatgtaga 120

tttcccggac tttagctcaa aatgcatgta tttattagcg ttctgtcttt tcgttaattt 180

gttctcatca taatattgtg acaaaaatat agctaggaaa gctttccatg catattttgt 240

aagcaatgaa gtatatagtg gatgcaatgt ctctatatat tcactagtcg agaaaattgc 300

ggacagttct gagattgatt ggcttcatgg ccctacggtg catctattac cattgtcttt 360

gcatttgtca tacaaaaagg tggaccatat tcatgttatg taaaaacaaa caaaatcacg 420

cagtgcacat cttctgcaga atgtgtaggt taaccttatt acacttgatt aagttaagtg 480

tcatgccatt agtttgagat tgaacttaaa atctttaatc aagatcttag atatggaaaa 540

aattgtaatt ccattaaaga taataagatt tttggataga aattaattat caattttaca 600

ttaataacat aataatttga agaaaaaaag taagggtcat aatcatacta accagagtaa 660

tttgacacgt gaaggggaca ctatgaaagc aaattacttt tggttcctaa aggttaggca 720

agggaaagaa agaatttgca cttaattagc actattttca aaattattat gtttcttttc 780

cttatcttgc ttaaaatttg cttattgtgt tattattatt attattgtta tgcatgatca 840

attattcatc aaagatcgat ctccaacctg ccaggaaatc cgctgatttg tttgcttcca 900

atgtgagaga tccaagatca gaattctgga aggtagtgct gactaccaag gtagcaaaat 960

aatgatattg gggaaggtga aaaatatgta gtactagtac ttctactaca aaatttcaaa 1020

aagggttttg tgatttgtgc ataagaatct ttttgcattt gtctgtaagc ttgaaaatta 1080

cacgtggcac aagtcacttg cagccaaaga acctttctgt gaccaattat gttccctgag 1140

ctgaatagtg gttcttattc taatctcatc aatatctaat tacctagtga atatactact 1200

agactattgc agtgttatta atatcttaat gatagactat tgcagcagac agaaattaca 1260

ggtattatta tatactaata tacaattctg cattttccac acttttcccc tgcccatgct 1320

tccatgccac tgaagtctga aaccacattg gcagattttg ctatctagaa attaaataac 1380

aatataagtt tgtatattta tatttcatat ttttttagta catttttatt ttgcacactc 1440

tataattcca tgattccttg attatcggag aatgatgtga tatgcaaacc acgagttaga 1500

accatcaaat caagcaaaga tatggatgga atgcctttaa tggaaagatt aattcaaagg 1560

ggcagaaact ggtaattttt tcttcaactg aatgctatgc agtatgcagc agatctttca 1620

tttacagaat atctgcaaaa ccttgtgttg gagatcttac ctattgaata atgatatagg 1680

taaaataaag tatttaattt caccataact tttaagatga tgttaaaatg atctatgcaa 1740

ttcatgttgg atcgaatatt aaagatgtca catctaatga tactatgata aaaataaagt 1800

ataatttctg atcttataag tcaaaataaa tcatgtaaat ataaattaat tctcttctta 1860

taaattaatt ttatataatt aagatagatc caatgtgaac tctaagacca tgcatatata 1920

aaaatcatta tcaagtgaat atgcaac 1947

<210> 5
<211> 3003
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Inserto transgénico

<400> 5

```
tcaaacactg atagtttaaa ctgaaggcgg gaaacgacaa tctgatcccc atcaagctag      60
cttctgcagg tcctgctcga gcggccgcag atcttgagcc aatcaaagag gagtgatgta     120
gacctaaagc aataatggag ccatgacgta agggcttacg cccatacgaa ataattaaag     180
gctgatgtga cctgtcggtc tctcagaacc tttacttttt atgtttggcg tgtattttta     240
```

aatttccacg gcaatgacga tgtgacccaa cgagatcttg agccaatcaa agaggagtga 300

tgtagaccta aagcaataat ggagccatga cgtaagggct tacgcccata cgaaataatt 360

aaaggctgat gtgacctgtc ggtctctcag aacctttact ttttatattt ggcgtgtatt 420

tttaaatttc cacggcaatg acgatgtgac ctgtgcatcc gctttgccta taaataagtt 480

ttagtttgta ttgatcgaca cggtcgagaa gacacggcca taagcttgga tcctcgagaa 540

ttctcaacac aacatataca aaacaaacga atctcaagca atcaagcatt ctacttctat 600

tgcagcaatt taaatcattt cttttaaagc aaaagcaatt ttctgaaaat tttcaccatt 660

tacgaacgat agccatggct tctatgatat cctcttccgc tgtgacaaca gtcagccgtg 720

cctctagggg gcaatccgcc gcaatggctc cattcggcgg cctcaaatcc atgactggat 780

tcccagtgag gaaggtcaac actgacatta cttccattac aagcaatggt ggaagagtaa 840

agtgcatgca ggtgtggcct ccaattggaa agaagaagtt tgagactctt tcctatttgc 900

caccattgac gagagattcc cgggccatgg ccaccttcgt ccgcaatgcc tggtatgtgg 960

cggcgctgcc cgaggaactg tccgaaaagc cgctcggccg gacgattctc gacacaccgc 1020

tcgcgctcta ccgccagccc gacggtgtgg tcgcggcgct gctcgacatc tgtccgcacc 1080

gcttcgcgcc gctgagcgac ggcatcctcg tcaacggcca tctccaatgc ccctatcacg 1140

ggctggaatt cgatggcggc gggcagtgcg tccataaccc gcacggcaat ggcgcccgcc 1200

cggcttcgct caacgtccgc tccttcccgg tggtggagcg cgacgcgctg atctggatct 1260

gtcccggcga tccggcgctg gccgatcctg gggcgatccc cgacttcggc tgccgcgtcg 1320

atcccgccta tcggaccgtc ggcggctatg ggcatgtcga ctgcaactac aagctgctgg 1380

tcgacaacct gatggacctc ggccacgccc aatatgtcca tcgcgccaac gcccagaccg 1440

acgccttcga ccggctggag cgcgaggtga tcgtcggcga cggtgagata caggcgctga 1500

tgaagattcc cggcggcacg ccgagcgtgc tgatggccaa gttcctgcgc ggcgccaata 1560

cccccgtcga cgcttggaac gacatccgct ggaacaaggt gagcgcgatg ctcaacttca 1620

tcgcggtggc gccggaaggc accccgaagg agcagagcat ccactcgcgc ggtacccata 1680

tcctgacccc cgagacggag gcgagctgcc attatttctt cggctcctcg cgcaatttcg 1740

gcatcgacga tccggagatg gacggcgtgc tgcgcagctg gcaggctcag gcgctggtca 1800

aggaggacaa ggtcgtcgtc gaggcgatcg agcgccgccg cgcctatgtc gaggcgaatg 1860

gcatccgccc ggcgatgctg tcgtgcgacg aagccgcagt ccgtgtcagc cgcgagatcg 1920

agaagcttga gcagctcgaa gccgcctgaa ccggcttatg ctgcacgggc ggggcggggc 1980

ggtttcgatc ggctcgcctg tcccggcgat attctagagc tttcgttcgt atcatcggtt 2040

tcgacaacgt tcgtcaagtt caatgcatca gtttcattgc gcacacacca gaatcctact 2100

gagtttgagt attatggcat tgggaaaact gtttttcttg taccatttgt tgtgcttgta 2160

atttactgtg tttttattc ggttttcgct atcgaactgt gaaatggaaa tggatggaga 2220

agagttaatg aatgatatgg tccttttgtt cattctcaaa ttaatattat ttgtttttc 2280

tcttatttgt tgtgtgttga atttgaaatt ataagagata tgcaaacatt ttgttttgag 2340

taaaaatgtg tcaaatcgtg gcctctaatg accgaagtta atatgaggag taaaacactt 2400

gtagttgtac cattatgctt attcactagg caacaaatat attttcagac ctagaaaagc 2460

tgcaaatgtt actgaataca agtatgtcct cttgtgtttt agacatttat gaactttcct 2520

ttatgtaatt ttccagaatc cttgtcagat tctaatcatt gctttataat tatagttata 2580

ctcatggatt tgtagttgag tatgaaaata ttttttaatg cattttatga cttgccaatt 2640

gattgacaac atgcatcaat cgcggccgct ctagaactag tggatccccc cctttaaggg 2700

ggctgcagga attcgatatc aagctttggc gcgccaaatc gtgaagtttc tcatctaagc 2760

ccccatttgg acgtgaatgt agacacgtcg aaataaagat ttccgaatta gaataatttg 2820

tttattgctt tcgcctataa atacgacgga tcgtaatttg tcgttttatc aaaatgtact 2880

ttcattttat aataacgctg cggacatcta catttttgaa ttgaaaaaaa attggtaatt 2940

actctttctt tttctccata ttgaccatca tactcattgc tgatccatgt agatttcccg 3000

gac 3003

<210> 6
<211> 5946
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Molécula de ADN quimérico de ADN genómico de soja y ADN transgénico

<400> 6

gtacaaataa aactttatct gtacatttcg ttagttaaat tatattttgt ccatcaaatt 60

gttcctttaa attaaaatct aaaaactaac tttaccgtaa agaaatatgc attcatgtat 120

accaaataaa attttgacaa gagtttaagt tttatattat gattcttaag gaaatcatta 180

tcattataat ttataaaaat aaataaattg ataattatat gctatatcaa tttatgattt 240

gatgagtatg tatgttttaa atgcgagatt ctgccgccgt tcgatatagt tagcagtaga 300

gccctgttct caccctcaca cctgctcagt gtgaacttta aaagggactt tgttgacaaa 360

tgttaggatc gtcgtcttct tttgcaataa aaaattttca tctgtttaaa acgtttttat 420

agtaaaatta taaatagaaa atttagttgt aaaatttgaa atataaattt aattagaatg 480

cattcacatt gtaattcttt tacattatta tttattacct aattataaat tatcaacaat 540

aaaatctgac atagtatatg tttagattaa aatttgtaaa tgtaagtttg aattaaaaaa 600

gtatattata aacttgagtt tggtataata ttttttatca tcagactttg gtataatatg 660

agttgatcta aaagtaagtt gaaggatacc aaagggtaat ctaaacatgc atgagaaatg 720

ttggggaata tctttagtgt aaacaaaaag ccttataaat tatcatgtca tactatatat 780

gacaaatgtt ggtttttgta ataatcattt taaatatgaa caacaggatt ttctttttac 840

cgtcaaaata tgaataaaag ttaaactctt aaattattga tcataggttt gcaatttttt 900

tttatagaga ggtttgcaat ttctgagttc tcaataactg atgattaaat gcgcatcgtt 960

tgcatgcatg aaaataaatt taagaggtaa catttgaagt ctcaccttca tgtccggggc 1020

tgccaggaaa gcttagatct ccatgagcat ccacgagctt atccacgagc atccacgagc 1080

ttatccgatt tgagcattga tctccatgag ccatttagtc tcaccttcaa acactgatag 1140

tttaaactga aggcgggaaa cgacaatctg atccccatca agctagcttc tgcaggtcct 1200

gctcgagcgg ccgcagatct tgagccaatc aaagaggagt gatgtagacc taaagcaata 1260

atggagccat gacgtaaggg cttacgccca tacgaaataa ttaaaggctg atgtgacctg 1320

tcggtctctc agaaccttta ctttttatgt ttggcgtgta tttttaaatt tccacggcaa 1380

tgacgatgtg acccaacgag atcttgagcc aatcaaagag gagtgatgta gacctaaagc 1440

aataatggag ccatgacgta agggcttacg cccatacgaa ataattaaag gctgatgtga 1500

cctgtcggtc tctcagaacc tttacttttt atatttggcg tgtattttta aatttccacg 1560

gcaatgacga tgtgacctgt gcatccgctt tgcctataaa taagttttag tttgtattga 1620

tcgacacggt cgagaagaca cggccataag cttggatcct cgagaattct caacacaaca 1680

tatacaaaac aaacgaatct caagcaatca agcattctac ttctattgca gcaatttaaa 1740

tcatttcttt taaagcaaaa gcaattttct gaaaattttc accatttacg aacgatagcc 1800

atggcttcta tgatatcctc ttccgctgtg acaacagtca gccgtgcctc taggggggcaa 1860

tccgccgcaa tggctccatt cggcggcctc aaatccatga ctggattccc agtgaggaag 1920

gtcaacactg acattacttc cattacaagc aatggtggaa gagtaaagtg catgcaggtg 1980

tggcctccaa ttggaaagaa gaagtttgag actctttcct atttgccacc attgacgaga 2040

gattcccggg ccatggccac cttcgtccgc aatgcctggt atgtggcggc gctgcccgag 2100

gaactgtccg aaaagccgct cggccggacg attctcgaca caccgctcgc gctctaccgc 2160

cagcccgacg gtgtggtcgc ggcgctgctc gacatctgtc cgcaccgctt cgcgccgctg 2220

agcgacggca tcctcgtcaa cggccatctc caatgcccct atcacgggct ggaattcgat 2280

ggcggcgggc agtgcgtcca taacccgcac ggcaatggcg cccgcccggc ttcgctcaac 2340

gtccgctcct tcccggtggt ggagcgcgac gcgctgatct ggatctgtcc cggcgatccg 2400

gcgctggccg atcctggggc gatccccgac ttcggctgcc gcgtcgatcc cgcctatcgg 2460

accgtcggcg gctatgggca tgtcgactgc aactacaagc tgctggtcga caacctgatg 2520

gacctcggcc acgcccaata tgtccatcgc gccaacgccc agaccgacgc cttcgaccgg 2580

ctggagcgcg aggtgatcgt cggcgacggt gagatacagg cgctgatgaa gattcccggc 2640

ggcacgccga gcgtgctgat ggccaagttc ctgcgcggcg ccaatacccc cgtcgacgct 2700

tggaacgaca tccgctggaa caaggtgagc gcgatgctca acttcatcgc ggtggcgccg 2760

gaaggcaccc cgaaggagca gagcatccac tcgcgcggta cccatatcct gacccccgag 2820

acggaggcga gctgccatta tttcttcggc tcctcgcgca atttcggcat cgacgatccg 2880

gagatggacg gcgtgctgcg cagctggcag gctcaggcgc tggtcaagga ggacaaggtc 2940

gtcgtcgagg cgatcgagcg ccgccgcgcc tatgtcgagg cgaatggcat ccgcccggcg 3000

atgctgtcgt gcgacgaagc cgcagtccgt gtcagccgcg agatcgagaa gcttgagcag 3060

ctcgaagccg cctgaaccgg cttatgctgc acgggcgggg cggggcggtt tcgatcggct 3120

cgcctgtccc ggcgatattc tagagctttc gttcgtatca tcggtttcga caacgttcgt 3180

caagttcaat gcatcagttt cattgcgcac acaccagaat cctactgagt ttgagtatta 3240

tggcattggg aaaactgttt ttcttgtacc atttgttgtg cttgtaattt actgtgtttt 3300

ttattcggtt ttcgctatcg aactgtgaaa tggaaatgga tggagaagag ttaatgaatg 3360

atatggtcct tttgttcatt ctcaaattaa tattatttgt tttttctctt atttgttgtg 3420

tgttgaattt gaaattataa gagatatgca aacattttgt tttgagtaaa aatgtgtcaa 3480

atcgtggcct ctaatgaccg aagttaatat gaggagtaaa acacttgtag ttgtaccatt 3540

atgcttattc actaggcaac aaatatattt tcagacctag aaaagctgca aatgttactg 3600

aatacaagta tgtcctcttg tgttttagac atttatgaac tttcctttat gtaattttcc 3660

agaatccttg tcagattcta atcattgctt tataattata gttatactca tggatttgta 3720

gttgagtatg aaaatatttt ttaatgcatt ttatgacttg ccaattgatt gacaacatgc 3780

atcaatcgcg gccgctctag aactagtgga tcccccccctt taagggggct gcaggaattc 3840

gatatcaagc tttggcgcgc caaatcgtga agtttctcat ctaagccccc atttggacgt 3900

gaatgtagac acgtcgaaat aaagatttcc gaattagaat aatttgttta ttgctttcgc 3960

ctataaatac gacggatcgt aatttgtcgt tttatcaaaa tgtactttca ttttataata 4020

acgctgcgga catctacatt tttgaattga aaaaaaattg gtaattactc tttctttttc 4080

tccatattga ccatcatact cattgctgat ccatgtagat ttcccggact ttagctcaaa 4140

atgcatgtat ttattagcgt tctgtctttt cgttaatttg ttctcatcat aatattgtga 4200

caaaaatata gctaggaaag ctttccatgc atattttgta agcaatgaag tatatagtgg 4260

atgcaatgtc tctatatatt cactagtcga gaaaattgcg gacagttctg agattgattg 4320

gcttcatggc cctacggtgc atctattacc attgtctttg catttgtcat acaaaaaggt 4380

ggaccatatt catgttatgt aaaaacaaac aaaatcacgc agtgcacatc ttctgcagaa 4440

tgtgtaggtt aaccttatta cacttgatta agttaagtgt catgccatta gtttgagatt 4500

gaacttaaaa tctttaatca agatcttaga tatggaaaaa attgtaattc cattaaagat 4560

aataagattt ttggatagaa attaattatc aattttacat taataacata ataatttgaa 4620

gaaaaaaagt aagggtcata atcatactaa ccagagtaat ttgacacgtg aaggggacac 4680

tatgaaagca aattactttt ggttcctaaa ggttaggcaa gggaaagaaa gaatttgcac 4740

ttaattagca ctattttcaa aattattatg tttcttttcc ttatcttgct taaaatttgc 4800

ttattgtgtt attattatta ttattgttat gcatgatcaa ttattcatca aagatcgatc 4860

tccaacctgc caggaaatcc gctgatttgt ttgcttccaa tgtgagagat ccaagatcag 4920

aattctggaa ggtagtgctg actaccaagg tagcaaaata atgatattgg ggaaggtgaa 4980

aaatatgtag tactagtact tctactacaa aatttcaaaa agggttttgt gatttgtgca 5040

taagaatctt tttgcatttg tctgtaagct tgaaaattac acgtggcaca agtcacttgc 5100

agccaaagaa cctttctgtg accaattatg ttccctgagc tgaatagtgg ttcttattct 5160

aatctcatca atatctaatt acctagtgaa tatactacta gactattgca gtgttattaa 5220

tatcttaatg atagactatt gcagcagaca gaaattacag gtattattat atactaatat 5280

acaattctgc attttccaca cttttcccct gcccatgctt ccatgccact gaagtctgaa 5340

accacattgg cagattttgc tatctagaaa ttaaataaca atataagttt gtatatttat 5400

atttcatatt tttttagtac atttttattt tgcacactct ataattccat gattccttga 5460

ttatcggaga atgatgtgat atgcaaacca cgagttagaa ccatcaaatc aagcaaagat 5520

atggatggaa tgcctttaat ggaaagatta attcaaaggg gcagaaactg gtaatttttt 5580

cttcaactga atgctatgca gtatgcagca gatctttcat ttacagaata tctgcaaaac 5640

cttgtgttgg agatcttacc tattgaataa tgatataggt aaaataaagt atttaatttc 5700

accataactt ttaagatgat gttaaaatga tctatgcaat tcatgttgga tcgaatatta 5760

aagatgtcac atctaatgat actatgataa aaataaagta taatttctga tcttataagt 5820

caaaataaat catgtaaata taaattaatt ctcttcttat aaattaattt tatataatta 5880

agatagatcc aatgtgaact ctaagaccat gcatatataa aaatcattat caagtgaata 5940

tgcaac 5946

<210> 7
<211> 100
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Molécula de ADN quimérico de ADN genómico de soja y ADN transgénico

<400> 7

gagcttatcc gatttgagca ttgatctcca tgagccattt agtctcacct tcaaacactg 60

atagtttaaa ctgaaggcgg gaaacgacaa tctgatcccc 100

<210> 8

<211> 100

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Molécula de ADN quimérico de ADN genómico de soja y ADN transgénico

<400> 8

ctccatattg accatcatac tcattgctga tccatgtaga tttcccggac tttagctcaa 60

aatgcatgta tttattagcg ttctgtcttt tcgttaattt 100

<210> 9
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador para PCR de oligonucleótidos sintetizado químicamente

<400> 9
ttttctccat attgaccatc atactca 27

<210> 10
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador para PCR de oligonucleótidos sintetizado químicamente

<400> 10
agacagaacg ctaataaata catgcatt 28

<210> 11
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador para PCR de oligonucleótidos sintetizado químicamente

<400> 11
ttcccggact ttagctca 18

<210> 12
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador para PCR de oligonucleótidos sintetizado químicamente

<400> 12
gatttcccgg actttagctc aa 22

<210> 13
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador para PCR de oligonucleótidos sintetizado químicamente

<400> 13
tcacaatatt atgatgagaa caaattaacg 30

<210> 14
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador para PCR de oligonucleótidos sintetizado químicamente

<400> 14
gcccctaatg gatttttaac ttttc 25

<210> 15
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador para PCR de oligonucleótidos sintetizado químicamente

<400> 15
atgcatgtat ttattagcgt tc 22

<210> 16
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador para PCR de oligonucleótidos sintetizado químicamente

<400> 16
acatgtgtga ctacttct 18

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ADN recombinante que comprende una molécula de nucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 6.

2. Una molécula de ADN que comprende una molécula de nucleótidos que tiene una secuencia de nucleótidos de longitud suficiente de la secuencia de nucleótidos contigua de SEQ ID NO: 6, para funcionar como una sonda de ADN que hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con una molécula de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de las SEQ ID NO: 1-4 y 6-8 y no se hibrida bajo las condiciones de hibridación rigurosas con una molécula de ADN que no comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de las SEQ ID NO: 1-4 y 6-8.

3. Un par de moléculas de ADN que consisten en una primera molécula de ADN y una segunda molécula de ADN diferente de la primera molécula de ADN, en el que dichas primera y segunda moléculas de ADN comprenden una molécula de nucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos de suficiente longitud de nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 6, para que funcionen como cebadores de ADN cuando se usan juntos en una reacción de amplificación con ADN derivado del evento MON 87708 para producir un amplicón diagnóstico para el ADN del evento MON 87708 de soja en una muestra.

4. Un procedimiento de detección de la presencia de una molécula de ADN derivada del evento de soja MON 87708 en una muestra, comprendiendo dicho procedimiento:

(I)

(a) poner en contacto una muestra con la sonda de ADN de la reivindicación 2;
(b) someter dicha muestra y dicha sonda de ADN a condiciones de hibridación rigurosas; y
(c) detectar la hibridación de dicha sonda de ADN a una molécula de ADN en dicha muestra, en el que la hibridación de dicha sonda de ADN con dicha molécula de ADN indica la presencia de una molécula de ADN derivada del evento de soja MON 87708 en dicha muestra; o

(II)

(a) poner en contacto una muestra con el par de moléculas de ADN de la reivindicación 3;
(b) realizar una reacción de amplificación suficiente para producir un amplicón de ADN que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-8; y
(c) detectar la presencia de dicho amplicón de ADN en dicha reacción, en el que la presencia de dicho amplicón de ADN en dicha reacción indica la presencia de una molécula de ADN derivada del evento de soja MON 87708 en dicha muestra.

5. Un equipo de detección de ADN que comprende un par de moléculas de ADN de la reivindicación 3 y/o una molécula de ADN de la reivindicación 2, para funcionar como cebadores o sonda de ADN específicos para detectar la presencia de ADN derivado del evento de soja MON 87708, en el que la detección de dicho ADN es diagnóstico de la presencia de dicho evento ADN de MON 87708 en una muestra.

6. Una planta, semilla, célula o parte de planta de soja recombinante que comprende una molécula de nucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que comprende la SEQ ID NO: 6, en la que dicha planta, semilla, célula o parte de la planta de la misma es tolerante al tratamiento con herbicida dicamba, en la que una muestra representativa de la planta ha sido depositada bajo el número de acceso ATCC PTA-9670.

7. La planta o semilla de soja de la reivindicación 6, en la que dicha planta o semilla de soja es un híbrido que tiene al menos un progenitor que comprende el evento de soja MON 87708.

8. Un procedimiento de control de malas hierbas en un campo que comprende

(i) plantar plantas de soja según la reivindicación 6 o 7 en un campo y aplicar una dosis efectiva de herbicida dicamba para controlar malas hierbas en dicho campo sin dañar a dicha planta de soja que comprende el evento MON 87708; o
(ii) aplicar una dosis efectiva de herbicida dicamba para controlar malas hierbas en un campo y luego plantar plantas de soja según la reivindicación 6 o 7 en dicho campo.

9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que

(i) dicha dosis efectiva de herbicida dicamba es de aproximadamente 0,0056 kg a aproximadamente 8,96 kg por hectárea; o

(ii) dicha dosis efectiva de herbicida dicamba es de aproximadamente 0,0056 kg a aproximadamente 8,96 kg por hectárea y dicha siembra de plantas de soja que comprende el evento MON 87708 está dentro de los 14 días de dicha aplicación de una dosis efectiva del herbicida dicamba.

10. Un procedimiento de producción de semilla de soja esencialmente libre de semillas de especies de malas hierbas tóxicas, comprendiendo dicho procedimiento:

(a) plantar semillas de plantas de soja según la reivindicación 6 o 7 en un campo;
(b) aplicar una dosis efectiva de un herbicida dicamba a dicho campo para matar malas hierbas tóxicas en dicho campo sin dañar a dichas plantas de soja que comprenden el evento MON 87708; y
(c) cosechar semilla de soja de dicho campo.

11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que dichas semillas de especies de malas hierbas tóxicas se seleccionan de *Cardaria spp., Heliotropium spp., Centaurea spp., Senecio spp., Crotalaria spp., Solanum spp., Xanthium spp., Amsinckia spp., Cassia spp., Sesbania spp., Datura spp., Ricinus spp., Argemone spp., Corchorus spp., Impomoea spp.* y *Echium spp.*

12. Una planta de soja que tolera la aplicación de herbicida dicamba según la reivindicación 6 o 7, en la que la planta se puede obtener mediante un procedimiento que comprende:

(a) plantas de soja transgénicas de cruzamiento sexual que comprenden el evento MON 87708 que comprende una molécula de nucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada de las SEQ ID NO: 1-4 y 6-8, en la que se ha depositado una muestra representativa de la planta bajo el número de acceso ATCC PTA -9670, con una segunda planta de soja;
(b) recoger la semilla producida a partir de dicho cruzamiento;
(c) cultivar dicha semilla para producir una pluralidad de plantas de progenie;
(d) tratar dicha pluralidad de plantas de progenie con dicamba; y
(e) seleccionar una planta de progenie que sea tolerante a dicamba

13. Una planta de soja que tolera la aplicación de herbicida dicamba de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en la que dicha planta se puede obtener mediante un procedimiento que comprende:
(a) autofecundación de una planta del evento MON 87708 de soja transgénica que comprende una molécula de nucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada de las SEQ ID NO: 1-4 y 6-8, en la que se ha depositado una muestra representativa de la planta bajo el número de acceso ATCC PTA- 9670;
(b) recoger la semilla producida a partir de dicha autofecundación;
(c) cultivar dicha semilla para producir una pluralidad de plantas de progenie;
(d) tratar dicha pluralidad de plantas de progenie con dicamba; y
(e) seleccionar una planta de progenie tolerante a dicamba

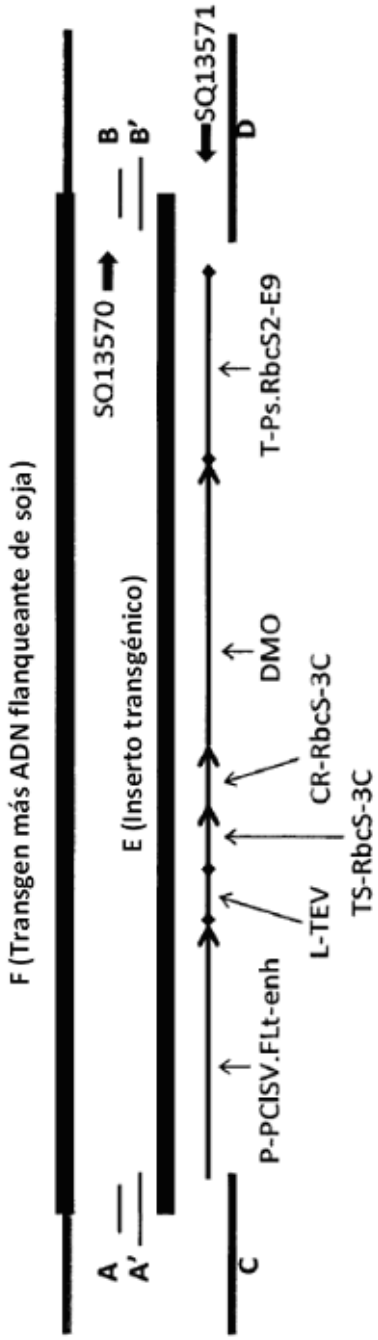
F (Transgen más ADN flanqueante de soja)
A
A'
C
E (Inserto transgénico)
P-PClSV.FLt-enh
L-TEV
TS-RbcS-3C
CR-RbcS-3C
DMO
SQ13570
B
B'
T-Ps.RbcS2-E9
SQ13571
D

Figura 1