

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 712 773**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

C07H 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.11.2010 PCT/US2010/057869**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.05.2011 WO11063411**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.11.2010 E 10832373 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018 EP 2504454**

54 Título: **Evento Élite EE-GM3 y métodos y kits para identificar dicho evento en muestras biológicas**

30 Prioridad:

23.11.2009 EP 09014564

23.11.2009 US 263690 P

23.07.2010 US 367227 P

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

14.05.2019

73 Titular/es:

BASF AGRICULTURAL SOLUTIONS SEED US LLC (50.0%)

100 Park Avenue

Florham Park, NJ 07932, US y

M.S. TECHNOLOGIES LLC (50.0%)

72 Inventor/es:

MASON, JUSTIN, THOMAS;

LETTOW, LESLIE, JAMES;

EBY, MARK, ALAN;

EBY, WILLIAM, H.;

WELZ, GÜNTER;

VERHAEGHE, STEVEN;

DE BEUCKELEER, MARC;

HABEX, VEERLE y

FERULLO, JEAN-MARC

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 712 773 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 Élite EE-GM3 y métodos y kits para identificar dicho evento en muestras biológicas

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica prioridad respecto a la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos con N.º 61/367.227, presentada el 23 de julio de 2010; la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos n.º 61/263.690, presentada el 23 de noviembre de 2009; la Solicitud Europea N.º EP 09014564,0, presentada el 23 de noviembre de 2009.

Campo de la invención

10 Esta invención se refiere a plantas, material vegetal y semillas de soja transgénicas, caracterizadas por albergar un evento de transformación específico, particularmente por la presencia de genes que codifican proteínas que confieren tolerancia a herbicidas, en una ubicación específica en el genoma de la soja. Las plantas de soja de la invención combinan el fenotipo de tolerancia a herbicidas con un rendimiento agronómico, estabilidad genética y funcionalidad en diferentes orígenes genéticos equivalentes a la línea de soja no transformada en ausencia de herbicida(s). Esta invención proporciona además métodos y kits para identificar la presencia de material vegetal que
15 comprende específicamente el evento de transformación EE-GM3 en muestras biológicas.

Antecedentes de la invención

20 La expresión fenotípica de un transgén en una planta está determinada tanto por la estructura del gen o los genes en sí mismos como por su ubicación en el genoma de la planta. Al mismo tiempo, la presencia de los transgenes o "ADN extraño" en diferentes ubicaciones en el genoma influirá en el fenotipo general de la planta de diferentes maneras. La introducción exitosa desde el punto de vista agronómico o industrial de un rasgo comercialmente interesante en una planta mediante manipulación genética puede ser un procedimiento largo que depende de diferentes factores. La transformación y regeneración reales de las plantas transformadas genéticamente son solo las primeras de una serie de etapas de selección, que incluyen una extensa caracterización genética, reproducción y evaluación en ensayos de campo, lo que finalmente lleva a la selección de un evento élite.

25 La identificación inequívoca de un evento élite es cada vez más importante en vista de las discusiones sobre nuevos alimentos/piensos, la segregación de productos OGM y no OGM y la identificación de material patentado. Idealmente, dicho método de identificación es tanto rápido como simple, sin la necesidad de una extensa configuración de laboratorio. Además, el método debe proporcionar resultados que permitan una determinación inequívoca del evento élite sin la interpretación de expertos, pero que se mantengan sometidos al escrutinio de
30 expertos si es necesario. Se describen, en el presente documento, las herramientas específicas para su uso en la identificación del evento élite EE-GM3 en muestras biológicas.

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

Green, J. (2009). Evolution of Glyphosate-Resistant Crop Technology. *Weed Science*, 57(1), 108-117 describe cultivos resistentes al glifosato, junto con montones con otras resistencias a herbicidas, en particular con la resistencia a los inhibidores de HPPD.

40 La publicación de patente internacional WO 98/02562 describe plantas transgénicas resistentes a inhibidores de HPPD y a inhibidores de EPSPS.

45 Herouet-Guichenev, C., et al. Safety evaluation of the double mutant 5-enol pyruvylshikimate-3-phosphate synthase (2mEPSPS) from maize that confers tolerance to glyphosate herbicide in transgenic plants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 54.2 (2009): 143-153., describe plantas transgénicas que comprenden el gen de resistencia al glifosato de 2mEPSPS. Las publicaciones de patente FR 2770854 A1 y EP 1186666 describen el uso del gen HPPD-Pf-W336 para la generación de plantas transgénicas resistentes a inhibidores de HPPD.

50 Además, se han divulgado, en la técnica, plantas de soja que comprenden un gen de tolerancia a herbicidas. Sin embargo, ninguna de las divulgaciones de la técnica anterior enseña o sugiere la presente invención.

Se conoce en la técnica que obtener un evento de transformación de élite tolerante a herbicida comercial en plantas de soja con un funcionamiento agronómico aceptable, sin arrastre de rendimiento, y que proporcione suficiente tolerancia a herbicida, ciertamente a 2 clases diferentes de herbicidas, no es en absoluto sencillo.

De hecho, se ha informado de que el primer evento de soja (evento 40-3-2) lanzado en el mercado con tolerancia a herbicidas, tuvo un arrastre significativo en el rendimiento en comparación con las líneas (casi) isogénicas (Elmore et al. (2001) Agron. J. 93: 408-412).

5 Además, las semillas de soja Optimum GAT (TM) se hicieron para combinar la tolerancia al glifosato con la tolerancia a los herbicidas ALS, pero su desarrollador informó que estas semillas de soja no estaban cumpliendo con los estándares de tolerancia al glifosato por sí mismos (sin la combinación de otro tipo de evento de tolerancia al glifosato como el evento 40-3-2 (véase, por ejemplo, www.bloomberg.com/apps/news?pid=newsarchive&sid=ad4L0hH9MKWE)).

Resumen de las realizaciones preferidas de la invención

10 La presente invención se refiere a una planta de soja, o células, partes, semillas o progenie de la misma, comprendiendo, cada una, en su genoma un evento élite, en donde dicho evento élite, tal como se encuentra en la semilla de referencia depositada en el NCIMB bajo el número de depósito NCIMB 41659, es un locus genético que comprende un ADN extraño que comprende un gen que codifica HPPD Pf W336 quimérico y un gen que codifica 2mEPSPS quimérico. La invención también se refiere a una planta de soja tolerante al glifosato y/o herbicidas
15 inhibidores de HPPD, como el isoxaflutol, que se puede obtener introduciendo en el genoma dicho evento élite.

Más específicamente, la presente invención se refiere a una planta de soja transgénica, o semilla, células o tejidos de la misma, que comprenden, integrado de manera estable en su genoma, un casete de expresión que comprende un gen de tolerancia a herbicida que comprende la secuencia codificante del gen *2mEPSPS* y otro gen de tolerancia a herbicida que comprende la secuencia codificante de HPPD-Pf W336 (tanto como se describe en el Ejemplo 1.1
20 del presente documento como se representa en la SEQ ID NO:1), que es tolerante al glifosato y un herbicida inhibidor de HPPD como el isoxaflutol y, en ausencia de herbicida(s), tiene un rendimiento agronómico que es sustancialmente equivalente a la línea isogénica no transgénica. Después de la aplicación de uno o más herbicidas a los que se proporciona tolerancia, la planta tendrá un fenotipo agronómico superior en comparación con una planta no transgénica.

25 Según la presente invención, la planta de soja o semillas, células o tejidos de la misma comprenden el evento élite EE-GM3.

Más específicamente, la presente invención se refiere a una planta de soja transgénica, semilla, células o tejidos de la misma, cuyo ADN genómico se caracteriza por el hecho de que, cuando se analiza en un Protocolo de Identificación por PCR como se describe en el presente documento, usando dos cebadores dirigidos a la región
30 flanqueante 5' o 3' de EE-GM3 y el ADN extraño que comprende genes de tolerancia a herbicidas, respectivamente, produce un fragmento que es específico para EE-GM3. Los cebadores pueden dirigirse contra la región flanqueante 5' dentro de la SEQ ID NO: 2 y el ADN extraño que comprende genes de tolerancia a herbicidas, respectivamente. Los cebadores también pueden dirigirse contra la región flanqueante 3' dentro de la SEQ ID NO: 3 y el ADN extraño que comprende genes de tolerancia a herbicidas, respectivamente, tales como los cebadores que comprenden o
35 consisten (esencialmente) en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5 y la SEQ ID NO: 4 o la SEQ ID NO: 7 respectivamente, y producen un fragmento de ADN de entre 100 y 800 pb, tal como un fragmento de aproximadamente 263 pb o 706 pb.

La semilla de referencia que comprende el evento élite de la invención se ha depositado en el NCIMB con el número de acceso NCIMB 41659. Una realización de la invención es la semilla que comprende el evento élite EE-GM3
40 depositada como número de acceso NCIMB 41659, que crecerá en una planta de soja tolerante a herbicidas, particularmente tolerante al glifosato y/o inhibidores de HPPD, como el isoxaflutol. La semilla de número de depósito de NCIMB, NCIMB 41659, es un lote de semillas que consta de al menos aproximadamente un 95% de semillas transgénicas homocigóticas para el ADN transferido, que comprende el evento élite de la invención, que crecerá en plantas tolerantes a herbicidas, por lo que las plantas son tolerantes al glifosato y/o isoxaflutol. La semilla o la semilla
45 de la progenie que se puede obtener o se obtiene de la semilla depositada (p. Ej., después del cruce con otras plantas de soja con un origen genético diferente) puede sembrarse y las plantas en crecimiento pueden tratarse con glifosato o isoxaflutol como se describe en el presente documento para obtener un 100% de plantas tolerantes a glifosato o a isoxaflutol, que comprenden el evento élite de la invención. La invención se refiere adicionalmente a células, tejidos, progenie, y descendientes de una planta que comprende el evento élite de la invención crecidos de la semilla depositada en el NCIMB que tiene el número de acceso NCIMB 41659. La invención se refiere además a plantas que se pueden obtener (como la propagación de y/o la reproducción con) de una planta de soja que comprende el evento élite de la invención (como una planta que crece de la semilla depositada en el NCIMB que tiene el número de acceso NCIMB 41659). La invención también se refiere a plantas de soja que comprenden el evento élite EE-GM3.

55 La especificación describe además un método para identificar una planta transgénica, o células o tejidos de la misma, que comprende el evento élite EE-GM3, cuyo método se basa en la identificación de la presencia de

secuencias de ADN o aminoácidos característicos codificados por dichas secuencias de ADN en plantas, células o tejidos transgénicos. De acuerdo con una realización preferida de la invención, tales secuencias de ADN de caracterización son secuencias de 15 pb o al menos 15 pb, preferentemente 20 pb o al menos 20 pb, lo más preferentemente 30 pb o más que comprenden el sitio de inserción del evento, es decir, tanto una parte del ADN extraño insertado que comprende genes de tolerancia a herbicidas como una parte del genoma de la soja (ya sea la región flanqueante 5' o 3') contigua con el mismo, permitiendo la identificación específica del evento élite. La invención también se refiere a plantas que comprenden el evento EE-GM3 tal como se identifica en el presente documento.

La presente invención se refiere además a métodos para identificar el evento élite EE-GM3 en muestras biológicas, como se divulga en una cualquiera de las reivindicaciones 17-19, 23 y 26, cuyos métodos se basan en cebadores o sondas que reconocen específicamente la secuencia flanqueante 5' y/o 3' del ADN extraño que comprende los genes de tolerancia a herbicidas en EE-GM3.

La presente invención también se refiere a un método para detectar la presencia del evento élite EE-GM3 en muestras biológicas como se divulga en la reivindicación 27.

Más específicamente, la invención se refiere a un método que comprende amplificar una secuencia de un ácido nucleico presente en muestras biológicas, utilizando una reacción en cadena de la polimerasa con al menos dos cebadores, uno de los cuales reconoce la región flanqueante 5' o 3' del ADN extraño que comprende los genes de tolerancia a herbicidas en EE-GM3, el otro que reconoce una secuencia dentro del ADN extraño que comprende los genes de tolerancia a herbicidas, preferentemente para obtener un fragmento de ADN de entre 100 y 800 pb. Los cebadores pueden reconocer una secuencia dentro de la región flanqueante 5' de EE-GM3 (SEQ ID NO: 2, desde la posición 1 a la posición 1451) o dentro de la región flanqueante 3' de EE-GM3 (complemento de la SEQ ID NO: 3 desde la posición 241 a la posición 1408) y una secuencia dentro del ADN extraño que comprende genes de tolerancia a herbicidas (complemento de la SEQ ID NO: 2 desde la posición 1452 a 1843 o la SEQ ID NO: 3 desde la posición 1 a la posición 240), respectivamente. El cebador que reconoce la región flanqueante 3' puede comprender la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5 y el cebador que reconoce una secuencia dentro del ADN extraño que comprende genes de tolerancia a herbicidas puede comprender la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 4 o la SEQ ID NO: 7 descritas en el presente documento. Esta invención también se refiere a los cebadores específicos, como se describe en el presente documento.

La presente invención se refiere más específicamente a un método para identificar el evento élite EE-GM3 en muestras biológicas, método que comprende amplificar una secuencia de un ácido nucleico presente en una muestra biológica, utilizando una reacción en cadena de la polimerasa con dos cebadores que comprenden o consisten (esencialmente) en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 4 y la SEQ ID NO: 5 respectivamente, para obtener un fragmento de ADN de aproximadamente 263 pb o con dos cebadores que comprenden o consisten (esencialmente) en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5 y la SEQ ID NO: 7 respectivamente, para obtener un fragmento de ADN de aproximadamente 706 pb. También se incluyen en esta invención las plantas que comprenden el evento élite EE-GM3 identificado de este modo.

También se describen en el presente documento las secuencias flanqueantes específicas de EE-GM3 descritas en el presente documento, que pueden usarse para desarrollar métodos de identificación específicos para EE-GM3 en muestras biológicas. Dichas secuencias flanqueantes específicas también pueden usarse como material de control de referencia en ensayos de identificación. Más particularmente, la presente memoria descriptiva describe las regiones flanqueantes 5' y/o 3' de EE-GM3 que pueden usarse para el desarrollo de cebadores y sondas específicos como se describe adicionalmente en el presente documento. También son adecuadas como material de referencia las moléculas de ácido nucleico, preferentemente de aproximadamente 150-850 pb, que comprenden la secuencia que puede amplificarse mediante cebadores que comprenden o consisten (esencialmente) en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7 y la SEQ ID NO: 5 o la de SEQ ID NO: 4 y la SEQ ID NO: 5.

La invención se refiere además a métodos de identificación para la presencia de EE-GM3 en muestras biológicas basadas en el uso de dichos cebadores o sondas específicos. Los cebadores pueden comprender, consistir o consistir esencialmente en una secuencia de nucleótidos de 17 a aproximadamente 200 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:2 del nucleótido 1 al nucleótido 1451 o el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 241 hasta nucleótido 1408, combinado con cebadores que comprenden, consisten, o consisten esencialmente en una secuencia de nucleótidos de 17 a aproximadamente 200 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2, tal como una secuencia de nucleótidos de 17 a aproximadamente 200 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1452 al nucleótido 1843 o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 1 al nucleótido 240. Los cebadores también pueden comprender estas secuencias de nucleótidos ubicadas en su extremo 3', y además comprenden secuencias no relacionadas o secuencias derivadas de las secuencias de nucleótidos mencionadas, pero que comprenden desapareamientos.

La invención se refiere además a kits para identificar el evento élite EE-GM3 en muestras biológicas, como se divulga en la reivindicación 25, comprendiendo, dichos kits, al menos un cebador o sonda que reconoce específicamente la región flanqueante 5' o 3' del ADN extraño que comprende los genes de tolerancia a herbicidas en EE-GM3.

5 El kit de la invención puede comprender, además de un cebador que reconoce específicamente la región flanqueante 5' o 3' de EE-GM3, un segundo cebador que reconoce específicamente una secuencia dentro del ADN extraño que comprende genes de tolerancia a herbicidas de EE-GM3, para su uso en un protocolo de identificación por PCR. Los kits de la invención pueden comprender al menos dos cebadores específicos, uno de los cuales reconoce una secuencia dentro de la región flanqueante 5' de EE-GM3, y el otro reconoce una secuencia dentro del
10 ADN extraño que comprende genes de tolerancia a herbicidas. El cebador que reconoce la región flanqueante 3' puede comprender la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5 y el cebador que reconoce los transgenes o ADN extraño que comprende genes de tolerancia a herbicidas puede comprender la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO: 4 o 7, o cualquier otro cebador o combinación de cebadores como se describe en el presente documento.

15 La invención se refiere además a un kit para identificar el evento élite EE-GM3 en muestras biológicas, comprendiendo dicho kit los cebadores de PCR que comprenden o consisten (esencialmente) en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5 y la SEQ ID NO: 4 para su uso en el Protocolo de Identificación por PCR de EE-GM3 descrito en el presente documento.

20 La invención se refiere además a un kit para identificar el evento élite EE-GM3 en muestras biológicas, cuyo kit comprende una sonda específica como se divulga en la reivindicación 24. Lo más preferentemente, la sonda específica comprende o consiste (esencialmente) en (o es complementaria a) una secuencia que tiene entre el 80% y el 100% de identidad de secuencia con la secuencia entre el nucleótido 1431 a 1472 de la SEQ ID NO: 2 o una secuencia que tiene entre el 80% y el 100% de identidad de secuencia a la secuencia entre el nucleótido 220 al 260 de la SEQ ID NO: 3.

25 De acuerdo con otro aspecto de la memoria descriptiva, se divulgan secuencias de ADN que comprenden el sitio de inserción del evento y la longitud suficiente de los polinucleótidos tanto del ADN genómico de la soja como del ADN extraño que comprende genes de tolerancia a los herbicidas (transgén), para que sean útiles como cebador o sonda para la detección de EE-GM3 y para caracterizar las plantas que comprenden el evento EE-GM3. Dichas secuencias pueden comprender al menos 9 nucleótidos del ADN genómico de la soja y un número similar de nucleótidos del
30 ADN extraño que comprende los genes de tolerancia a los herbicidas de EE-GM3, a cada lado del sitio de unión, respectivamente. De la forma más preferente, tales secuencias de ADN comprenden al menos 9 nucleótidos del ADN genómico de soja y un número similar de nucleótidos del ADN extraño que comprenden genes de tolerancia a herbicidas contiguos con el sitio de inserción en la SEQID NO: 2 o la SEQID NO: 3. En un aspecto, se proporcionan plantas de soja que comprenden tales secuencias de ADN específicas.

35 La invención se refiere además a una molécula de ácido nucleico como se divulga en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6.

La invención se refiere además a una molécula de ADN como se divulga en la reivindicación 7, y a una planta de soja que comprende dicha molécula de ADN, como se divulga en la reivindicación 9.

40 La invención se refiere además a una molécula de ADN como se divulga en la reivindicación 8, y a una planta, tejido celular o semilla de soja, comprendiendo cada uno dicha molécula de ADN, como se divulga en la reivindicación 10.

Los métodos y kits abarcados por la presente invención se pueden usar para diferentes fines, tales como, pero sin limitación, los siguientes: para identificar la presencia o determinar el umbral (inferior) de EE-GM3 en plantas, material vegetal o en productos tales como, pero sin limitación, productos alimenticios o piensos (frescos o procesados) que comprenden o se derivan de material vegetal; adicionalmente o como alternativa, los métodos y kits
45 de la presente invención se pueden usar para identificar material vegetal transgénico para fines de segregación entre materiales transgénicos y no transgénicos; adicionalmente o como alternativa, los métodos y kits de la presente invención se pueden usar para determinar la calidad (es decir, el porcentaje de material puro) del material vegetal que comprende EE-GM3.

50 La memoria descriptiva describe además las regiones flanqueantes 5' y/o 3' de EE-GM3 y la invención se refiere a los cebadores y sondas específicos desarrollados a partir de las secuencias flanqueantes 5' y/o 3' de EE-GM3, como se divulga en cualquiera de las reivindicaciones 20-22 y 24.

En el presente documento también se describe el ADN genómico obtenido de plantas que comprenden el evento élite EE-GM3. Dicho ADN genómico se puede usar como material de control de referencia en los ensayos de identificación descritos en el presente documento.

ES 2 712 773 T3

También se proporciona en el presente documento una planta de soja transgénica tolerante a herbicida, o células, partes, semillas o progenie de la misma, que comprende cada una al menos un evento élite, dicho evento élite comprende un ADN extraño que comprende:

- 5 i) un primer gen quimérico que comprende un gen epsps modificado de *Zea mays* que codifica una enzima EPSPS tolerante al glifosato bajo el control de un promotor expresable en plantas, y
- ii) un segundo gen quimérico que comprende un gen hppd modificado de *Pseudomonas fluorescens* que codifica una enzima tolerante a herbicida inhibidor de HPPD bajo el control de un promotor expresable en plantas.

10 En una realización, dicho evento élite comprende los nucleótidos 1 a 1451 de la SEQ ID NO: 2 inmediatamente cadena arriba y contiguos con dicho ADN extraño y los nucleótidos 241 a 1408 de la SEQ ID NO: 3 inmediatamente cadena abajo y contiguos con dicho ADN extraño.

En una realización adicional, dicho evento élite puede obtenerse mediante la reproducción con una planta de soja cultivada a partir de semilla de referencia que comprende dicho evento que se ha depositado en el NCIMB con el número de depósito NCIMB 41659.

15 En otra realización, el ADN genómico de dicha planta de soja, o células, partes, semillas o progenie de la misma cuando se analiza utilizando el protocolo de identificación de eventos élite para dicho evento élite con dos cebadores que comprenden la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 4 y la SEQ ID NO: 5 respectivamente, produce un Fragmento de ADN de (aproximadamente) 263 pb.

20 En el presente documento, también se proporciona un método para identificar una planta transgénica de soja, o células, partes, semillas o progenie de las mismas tolerantes al glifosato y/o a un herbicida inhibidor de HPPD, como el isoxaflutol, en muestras biológicas, comprendiendo dicho método amplificar un fragmento de ADN de entre 100 y 500 pb de un ácido nucleico presente en muestras biológicas utilizando una reacción en cadena de la polimerasa con al menos dos cebadores, uno de dichos cebadores reconoce la región flanqueante 5' del evento élite especificado anteriormente, comprendiendo dicha región flanqueante 5' la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1 al nucleótido 1451, o la región flanqueante 3' de dicho evento élite, comprendiendo dicha región flanqueante 3' o la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 241 al nucleótido 1408, el otro cebador de dichos cebadores que reconoce una secuencia dentro del ADN extraño que comprende la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO:2 del nucleótido 1452 al nucleótido 1843 o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 1 al nucleótido 240.

30 En el presente documento, también se proporciona un kit para identificar una planta transgénica de soja, o células, partes, semillas o progenie de las mismas tolerantes al glifosato y/o a un herbicida inhibidor de HPPD, como el isoxaflutol, en muestras biológicas, comprendiendo dicho kit un cebador que reconoce la región flanqueante 5' del evento élite especificado anteriormente, comprendiendo dicha región flanqueante 5' la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1 al nucleótido 1451, o un cebador que reconoce la región flanqueante 3' de dicho evento élite, comprendiendo dicha región flanqueante 3' la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 241 al nucleótido 1408, y un cebador que reconoce una secuencia dentro del ADN extraño, comprendiendo dicho ADN extraño que comprende la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO:2 del nucleótido 1452 al nucleótido 1843 o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 1 al nucleótido 240.

40 En una realización de la invención, el ADN extraño del evento élite EE-GM3, como se usa en el presente documento, comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 11 desde la posición del nucleótido 1452 hasta la posición del nucleótido 16638 o su complemento. En el presente documento también se divulga un ADN extraño de élite EE-GM3 que comprende una secuencia con al menos el 95, 98, 99 o 99,5% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 11 desde la posición del nucleótido 1452 hasta la posición del nucleótido 16638 o su complemento.

50 En el presente documento, también se describe una planta, célula vegetal, tejido o semilla de soja, que comprende en su genoma una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos el 97, 98 o al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 11 desde la posición del nucleótido 1452 hasta la posición del nucleótido 16638 o el complemento de la misma, o una secuencia de nucleótidos con al menos el 97, 98, o al menos el 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 11 o el complemento de la misma.

55 En el presente documento, también se describe una planta, célula vegetal, tejido o semilla de soja, que comprende en su genoma una molécula de ácido nucleico que hibrida con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 o el complemento de la misma, o que hibrida con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 11 desde la posición del nucleótido 1452 hasta la posición del nucleótido 16638 o el complemento de la misma, o hibrida a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 11 o al complemento de la misma.

En el presente documento, también se describe una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 11 desde la posición del nucleótido 1452 hasta la posición del nucleótido 16638 o el complemento de la misma, o una secuencia de nucleótidos con al menos el 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 11 o el complemento de la misma, o una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que hibrida con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 11 desde la posición del nucleótido 1452 hasta la posición del nucleótido 16638 o el complemento de la misma, o hibrida a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 11 o al complemento de la misma.

La invención también se refiere a un método para producir un producto de soja como se divulga en la reivindicación 11.

La invención se refiere además a un proceso para cultivar plantas de soja que contienen el evento élite EE-GM3, como se divulga en una cualquiera de las reivindicaciones 12-15.

Breve descripción de los dibujos

Los siguientes ejemplos, que no pretenden limitar la invención a las realizaciones específicas descritas, pueden entenderse junto con las Figuras adjuntas, en las cuales:

Figura 1: Representación esquemática de la relación entre las secuencias de nucleótidos citadas y los cebadores. barra negra: ADN extraño; barra sombreada: ADN de origen vegetal; flecha a cuadros (a): gen quimérico que codifica HPPD Pf W366 (véase la Tabla 1 para conocer la composición del gen quimérico); flecha sombreada (b): gen quimérico que codifica 2mEPSPS (véase la Tabla 1 para conocer la composición del gen quimérico); flechas negras: cebadores de oligonucleótidos, las figuras debajo de las barras representan posiciones de nucleótidos; (c) se refiere al complemento de la secuencia de nucleótidos indicada; Nota: el esquema no está dibujado a escala.

Figura 2: Resultados obtenidos por el Protocolo de Identificación por PCR desarrollado para EE-GM3. Secuencia de carga del gel: Carril I: Marcador de peso molecular (escalera de 100 pb); Carriles 2 y 3: Muestras de ADN de plantas de soja que comprenden el evento transgénico EE-GM3; carriles 4-7: Muestras de ADN de plantas de soja transgénicas que no comprenden el evento élite EE-GM3, pero que comprenden los mismos genes de tolerancia a herbicidas (otros eventos de transformación); carril 8: Muestra de ADN de soja de tipo silvestre; carril 9: ADN control no plantilla; carril 10: marcador de peso molecular.

Figura 3: Resultados obtenidos por el protocolo de PCR de puntuación de cigosidad desarrollado para EE-GM3. Secuencia de carga del gel: Carril I: Marcador de peso molecular (escalera de 100 pb); Carriles 2 y 5: Muestras de ADN de plantas de soja que comprenden el evento transgénico EE-GM3 en forma homocigótica; carriles 3, 8 y 9: Muestras de ADN de plantas de soja que comprenden el evento transgénico EE-GM3 en forma heterocigótica; carriles 4, 6 y 7: Muestra de ADN control de planta de soja acigótica; carril 10: ADN control no plantilla; carril 11: marcador de peso molecular.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención

La incorporación de una molécula de ADN recombinante en el genoma de la planta generalmente da como resultado la transformación de una célula o tejido. El sitio determinado de incorporación se debe generalmente a la integración aleatoria.

El ADN introducido en el genoma de la planta como resultado de la transformación de una célula o tejido vegetal con un ADN recombinante o "ADN transformante", y que se origina a partir de dicho ADN transformante, se denomina en lo sucesivo en el presente documento "ADN extraño" que comprende uno o más "transgenes". Los transgenes de EE-GM3 son los genes de tolerancia a glifosato y a herbicidas inhibidores de HPPD. "ADN de la planta" en el contexto de la presente invención se referirá al ADN que se origina a partir de la planta que se transforma. El ADN de la planta generalmente se encontrará en el mismo locus genético en la planta de tipo silvestre correspondiente. El ADN extraño se puede caracterizar por la ubicación y la configuración en el sitio de incorporación de la molécula de ADN recombinante en el genoma de la planta. El sitio en el genoma de la planta donde se ha insertado un ADN recombinante también se denomina "sitio de inserción" o "sitio diana". La inserción del ADN recombinante en la región del genoma de la planta denominado "ADN de la planta previo a la inserción" puede asociarse con una delección del ADN de la planta, denominada "eliminación del sitio diana". Una "región flanqueante" o "secuencia flanqueante" como se usa en el presente documento se refiere a una secuencia de al menos 20 pb, preferentemente al menos 50 pb, y hasta 5000 pb de ADN diferente del ADN introducido, preferentemente ADN del genoma de la planta que está localizada inmediatamente cadena arriba y contiguo con o inmediatamente cadena abajo y contiguo con el ADN extraño. Los procedimientos de transformación que dan lugar a la integración aleatoria del ADN extraño darán como resultado transformantes con diferentes regiones flanqueantes, que son características y únicas para

cada transformante. Cuando el ADN recombinante se introduce en una planta a través del cruce tradicional, su sitio de inserción en el genoma de la planta o sus regiones flanqueantes generalmente no se cambiarán.

5 Un "ácido nucleico aislado (secuencia)" o "ADN aislado (secuencia)", como se usa en el presente documento, se refiere a un ácido nucleico o ADN (secuencia) que ya no está en el entorno natural del que se aisló, por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico en otro hospedador bacteriano o en un genoma de una planta, o un ácido nucleico o ADN fusionado a ADN o nucleico ácido de otro origen, como cuando está contenido en un gen quimérico bajo el control de un promotor expresable en plantas.

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

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

- 25 a) que la presencia del ADN extraño no comprometa otras características deseadas de la planta, como las relacionadas con el rendimiento agronómico o el valor comercial;
- b) que el evento se caracterice por una configuración molecular bien definida que se herede de forma estable y para la cual se pueden desarrollar herramientas apropiadas para el control de identidad;
- 30 c) que (el)los gen(es) de interés muestre(n) una expresión fenotípica espacial y temporal correcta, apropiada y estable, tanto en condiciones heterocigóticas (o hemicigóticas) como homocigóticas del evento, a un nivel comercialmente aceptable en un intervalo de condiciones ambientales en las que las plantas que portan el evento probablemente estén expuestas a uso agronómico normal.

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

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

Por lo tanto, un "evento élite" se refiere a un locus genético que comprende un ADN extraño, que cumple con los criterios descritos anteriormente. Una planta, material vegetal o progenie, tal como las semillas, pueden comprender uno o más eventos élite en su genoma.

40 Las herramientas desarrolladas para identificar un evento élite o la planta o material vegetal que comprende un evento élite, o productos que comprenden material vegetal que comprende el evento élite, se basan en las características genómicas específicas del evento élite, tal como, un mapa de restricción específico de la región genómica que comprende el ADN extraño, los marcadores moleculares o la secuencia de la región o regiones flanqueantes del ADN extraño.

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

Los cebadores de PCR adecuados para la invención pueden ser los siguientes:

- 5 - oligonucleótidos que varían en longitud de 17 nt a aproximadamente 200 nt, que comprenden una secuencia de nucleótidos de al menos 17 nucleótidos consecutivos, preferentemente 20 nucleótidos consecutivos, seleccionados del ADN de la planta en la secuencia flanqueante 5 '(SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1 al nucleótido 1451) en su extremo 3 '(cebadores que reconocen las secuencias flanqueantes 5'); o
- 10 - oligonucleótidos que varían en longitud de 17 nt a aproximadamente 200 nt, que comprenden una secuencia de nucleótidos de al menos 17 nucleótidos consecutivos, preferentemente 20 nucleótidos consecutivos, seleccionados del ADN de la planta en la secuencia flanqueante 3' (complemento de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 241 al nucleótido 1408) en su extremo 3 '(cebadores que reconocen secuencias flanqueantes 3'); o
- 15 - oligonucleótidos que varían en longitud de 17 nt a aproximadamente 200 nt, que comprenden una secuencia de nucleótidos de al menos 17 nucleótidos consecutivos, preferentemente 20 nucleótidos consecutivos, seleccionados de las secuencias de ADN insertadas (complemento de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1452 al nucleótido 1843) en su extremo 3' (cebadores que reconocen el ADN extraño); o
- 20 - oligonucleótidos que varían en longitud de 17 nt a aproximadamente 200 nt, que comprenden una secuencia de nucleótidos de al menos 17 nucleótidos consecutivos, preferentemente 20 nucleótidos consecutivos, seleccionados de las secuencias de ADN insertadas (SEQ ID NO: 3 del nucleótido 1 al nucleótido 240); o
- oligonucleótidos adecuados que varían en longitud de 17 nt a aproximadamente 200 nt, que comprenden una secuencia de nucleótidos de al menos 17 nucleótidos consecutivos, preferentemente 20 nucleótidos consecutivos, seleccionado de la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN insertado o su complemento (SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 11 desde la posición del nucleótido 1452 a 16638).

Los cebadores pueden, por supuesto, ser más largos que los 17 nucleótidos consecutivos mencionados, y pueden, por ejemplo, tener 20, 21, 30, 35, 50, 75, 100, 150, 200 nt de largo o incluso más. Los cebadores pueden consistir completamente en una secuencia de nucleótidos seleccionada de las secuencias de nucleótidos mencionadas de secuencias flanqueantes y secuencias de ADN extraño. Sin embargo, la secuencia de nucleótidos de los cebadores en su extremo 5' (es decir, fuera de los 17 nucleótidos consecutivos ubicados en 3') es menos crítica. Por lo tanto, la secuencia 5' de los cebadores puede comprender o consistir en una secuencia de nucleótidos seleccionada de las secuencias flanqueantes o ADN extraño, según sea apropiado, pero puede contener varios (por ejemplo, 1, 2, 5, o 10) desapareamientos. La secuencia 5' de los cebadores puede ser incluso completamente una secuencia de nucleótidos no relacionada con las secuencias flanqueantes o ADN extraño, tal como, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que representa uno o más sitios de reconocimiento de enzimas de restricción. Dichas secuencias no relacionadas o las secuencias de ADN flanqueantes con desapareamientos no deben ser preferentemente mayores de 100, más preferentemente no mayores de 50 o incluso 25 nucleótidos.

Además, los cebadores adecuados pueden comprender o consistir (esencialmente) en una secuencia de nucleótidos en su extremo 3' que abarca la región de unión entre las secuencias derivadas del ADN de la planta y las secuencias de ADN extraño (ubicadas en los nucleótidos 1451-1452 en la SEQ ID NO: 2 y los nucleótidos 240-241 en la SEQ ID NO: 3) siempre que los 17 nucleótidos consecutivos ubicados en 3' mencionados no deriven exclusivamente de ADN extraño o secuencias derivadas de plantas en las SEQ ID NO: 2 o 3.

También quedará inmediatamente claro para el experto en la materia que los pares de cebadores de PCR seleccionados correctamente no deben comprender secuencias complementarias entre sí.

40 Para los fines de la invención, el "complemento de una secuencia de nucleótidos representada en la SEQ ID NO: X" es la secuencia de nucleótidos que puede derivar de la secuencia de nucleótidos representada reemplazando los nucleótidos con su nucleótido complementario de acuerdo con las reglas de Chargaff ($A \leftrightarrow T$; $G \leftrightarrow C$) y leyendo la secuencia en dirección 5' a 3', es decir, en dirección opuesta a la secuencia de nucleótidos representada.

45 Ejemplos de cebadores adecuados son las secuencias de oligonucleótidos de la SEQ ID NO: 5 (cebador de reconocimiento de la secuencia flanqueante 3'), de la SEQ ID NO: 4 (cebador de reconocimiento de ADN extraño para su uso con los cebadores de reconocimiento de la secuencia flanqueante 3'), o de la SEQ ID NO: 7 (cebador de reconocimiento de ADN extraño para su uso con los cebadores de reconocimiento de la secuencia flanqueante 3').

50 Otros ejemplos de cebadores de oligonucleótidos adecuados comprenden en su extremo 3' las siguientes secuencias o consisten (esencialmente) en tales secuencias:

a. cebadores de reconocimiento de la secuencia flanqueante 5':

- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 264 al nucleótido 283
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 266 al nucleótido 285
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1240 al nucleótido 1259
- 55 - la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 265 al nucleótido 285

ES 2 712 773 T3

- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1495 al nucleótido 1515
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1670 al nucleótido 1691
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1673 al nucleótido 1694
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1678 al nucleótido 1698
- 5 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1469 al nucleótido 1489
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1667 al nucleótido 1689
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1687 al nucleótido 1708
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1688 al nucleótido 1710
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1691 al nucleótido 1711
- 10 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1472 al nucleótido 1492
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1489 al nucleótido 1510
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1666 al nucleótido 1688
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1687 al nucleótido 1709
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1692 al nucleótido 1712
- 15 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1467 al nucleótido 1488
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1469 al nucleótido 1490
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1488 al nucleótido 1509
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1489 al nucleótido 1511
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1678 al nucleótido 1699
- 20 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1472 al nucleótido 1493
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1472 al nucleótido 1494
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1481 al nucleótido 1502
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1670 al nucleótido 1692
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1469 al nucleótido 1491
- 25 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1488 al nucleótido 1510
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1691 al nucleótido 1712
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1692 al nucleótido 1713
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1692 al nucleótido 1714
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1467 al nucleótido 1489
- 30 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1678 al nucleótido 1700
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1481 al nucleótido 1503

ES 2 712 773 T3

- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1691 al nucleótido 1713
- c. cebadores de reconocimiento de la secuencia flanqueante 3':
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 828 al nucleótido 847
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 830 al nucleótido 849
 - 5 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 828 al nucleótido 846
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 828 al nucleótido 848
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 830 al nucleótido 848
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 830 al nucleótido 850
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 828 al nucleótido 845
 - 10 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 830 al nucleótido 847
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 828 al nucleótido 849
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 830 al nucleótido 851
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 828 al nucleótido 844
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 830 al nucleótido 846
 - 15 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 828 al nucleótido 850
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 830 al nucleótido 852
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 992 al nucleótido 1009
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 731 al nucleótido 752
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 776 al nucleótido 795
 - 20 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 731 al nucleótido 753
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 776 al nucleótido 794
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 776 al nucleótido 796
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 776 al nucleótido 793
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 776 al nucleótido 797
 - 25 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 776 al nucleótido 792
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 776 al nucleótido 798
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 733 al nucleótido 752
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 733 al nucleótido 753
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 733 al nucleótido 754
 - 30 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 733 al nucleótido 755
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 838 al nucleótido 854

- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 246 al nucleótido 263
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 838 al nucleótido 855
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 245 al nucleótido 264

d. cebadores de reconocimiento de la secuencia de ADN extraño para su uso con cebadores de reconocimiento de la secuencia flanqueante 3':

- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 173 al nucleótido 192
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 22 al nucleótido 41
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 172 al nucleótido 192
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 174 al nucleótido 192
- 10 - la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 191 al nucleótido 210
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 171 al nucleótido 192
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 175 al nucleótido 192
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 190 al nucleótido 210
- 15 - la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 192 al nucleótido 210
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 176 al nucleótido 192
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 189 al nucleótido 210
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 193 al nucleótido 210
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 188 al nucleótido 210
- 20 - la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 194 al nucleótido 210
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 199 al nucleótido 218
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 200 al nucleótido 218
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 197 al nucleótido 218
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 201 al nucleótido 218
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 201 al nucleótido 220
- 25 - la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 200 al nucleótido 220
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 199 al nucleótido 220
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 200 al nucleótido 221
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 199 al nucleótido 221
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 150 al nucleótido 172

30 Como se usa en el presente documento, "la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: Z desde la posición X a la posición Y" indica la secuencia de nucleótidos que incluye ambos extremos de nucleótidos.

Preferentemente, el fragmento amplificado tiene una longitud de entre 50 y 500 nucleótidos, tal como una longitud de entre 100 y 350 nucleótidos. Los cebadores específicos pueden tener una secuencia que es entre el 80 y el 100% idéntica a una secuencia dentro de la región flanqueante 5' o 3' del evento élite y el ADN extraño del evento élite, respectivamente, siempre que los desapareamientos todavía permitan la identificación específica del evento élite con estos cebadores en condiciones de PCR optimizadas. Sin embargo, el intervalo de desapareamientos permisibles, puede determinarse fácilmente de manera experimental y es conocido por los expertos en la materia.

La detección de fragmentos de integración puede producirse de varias maneras, por ejemplo, a través de la estimación del tamaño después del análisis en gel. Los fragmentos de integración también secuenciarse directamente. También se conocen en la técnica, otros métodos específicos de secuencia para la detección de fragmentos de ADN amplificados.

Como la secuencia de los cebadores y su ubicación relativa en el genoma son únicas para el evento élite, la amplificación del fragmento de integración ocurrirá solo en muestras biológicas que comprenden (el ácido nucleico de) el evento élite. Preferentemente, cuando se realiza una PCR para identificar la presencia de EE-GM3 en muestras desconocidas, se incluye un control de un conjunto de cebadores con los que se puede amplificar un fragmento dentro de un "gen constitutivo" de la especie de planta del evento. Los genes constitutivos son genes que se expresan en la mayoría de los tipos de células y que están relacionados con las actividades metabólicas básicas comunes a todas las células. Preferentemente, el fragmento amplificado del gen constitutivo es un fragmento que es más grande que el fragmento de integración amplificado. Dependiendo de las muestras a analizar, se pueden incluir otros controles.

Los protocolos de PCR convencionales se describen en la técnica, tal como en el "PCR Applications Manual" (Roche Molecular Biochemicals, 2ª edición, 1999) y otras referencias. Las condiciones óptimas para la PCR, incluida la secuencia de los cebadores específicos, se especifican en un "Protocolo de Identificación por PCR (o Reacción en Cadena de la Polimerasa)" para cada evento élite. Sin embargo, se entiende que una serie de parámetros en el Protocolo de Identificación por PCR deban ajustarse a condiciones específicas de laboratorio, y pueden modificarse

ligeramente para obtener resultados similares. Por ejemplo, el uso de un método diferente para la preparación de ADN puede requerir un ajuste de, por ejemplo, la cantidad de cebadores, la polimerasa y las condiciones de hibridación utilizadas. De manera similar, la selección de otros cebadores puede dictar otras condiciones óptimas para el Protocolo de Identificación por PCR. Sin embargo, estos ajustes serán evidentes para una persona experta en la materia, y además se detallan en los manuales de aplicación de PCR actuales, como el citado anteriormente.

Como alternativa, se pueden usar cebadores específicos para amplificar un fragmento de integración que se puede usar como una "sonda específica" para identificar EE-GM3 en muestras biológicas. Poner en contacto el ácido nucleico de una muestra biológica, con la sonda, en condiciones que permitan la hibridación de la sonda con su fragmento correspondiente en el ácido nucleico, da como resultado la formación de un ácido nucleico/sonda híbrida. La formación de este híbrido se puede detectar (por ejemplo, a través del marcado del ácido nucleico o la sonda), por lo que la formación de este híbrido indica la presencia de EE-GM3. Se han descrito en la técnica, tales métodos de identificación basados en la hibridación con una sonda específica (ya sea en un soporte de fase sólida o en solución). La sonda específica es preferentemente una secuencia que, en condiciones optimizadas, hibrida específicamente a una región dentro de la región flanqueante 5' o 3' del evento élite y preferentemente también comprende parte del ADN extraño contiguo a ella (en lo sucesivo denominada "región específica"). Preferentemente, la sonda específica comprende una secuencia de entre 50 y 500 pb, preferentemente de 100 a 350 pb, que es al menos un 80%, preferentemente entre 80 y 85%, más preferentemente entre 85 y 90%, especialmente preferentemente entre 90 y 95%, de la forma más preferente entre un 95% y un 100% idéntica (o complementaria) a la secuencia de nucleótidos de una región específica. Preferentemente, la sonda específica comprenderá una secuencia de aproximadamente 15 a aproximadamente 100 nucleótidos contiguos idénticos (o complementarios) a una región específica del evento élite.

Los oligonucleótidos adecuados como cebadores de PCR para la detección del evento élite EE-GM3 también se pueden usar para desarrollar un protocolo basado en PCR para determinar el estado de cigosidad de las plantas que contienen el evento élite. Para este fin, dos cebadores que reconocen el locus de tipo silvestre antes de la integración están diseñados de tal manera que se dirigen uno hacia el otro y tienen el sitio de inserción ubicado entre los cebadores. Estos cebadores pueden ser cebadores que reconocen específicamente las secuencias flanqueantes 5' y 3' contenidas en las SEQ ID NO: 2 o 3, respectivamente. Estos cebadores también pueden ser cebadores que reconocen específicamente la secuencia flanqueante 5' o 3'. Para la presente invención, los cebadores particularmente adecuados que reconocen el locus de tipo silvestre antes de la integración son cebadores que comprenden o consisten (esencialmente) en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 4 y la SEQ ID NO: 6. Este conjunto de cebadores, junto con un tercer cebador complementario para transformar secuencias de ADN (como un cebador que comprende o consiste (esencialmente) en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7) permite la amplificación simultánea por PCR de diagnóstico del locus específico de EE-GM3, así como del locus de tipo silvestre. Si la planta es homocigótica para el locus transgénico o el locus de tipo silvestre correspondiente, la PCR de diagnóstico dará lugar a un único producto de PCR típico, preferentemente de longitud típica, ya sea para el locus transgénico o de tipo silvestre. Si la planta es hemicigótica para el locus transgénico, aparecerán dos productos de PCR específicos del locus, lo que refleja tanto la amplificación del locus transgénico como de tipo silvestre.

Además, los métodos de detección específicos para el evento élite EE-GM3 que difieren de los métodos de amplificación basados en PCR también se pueden desarrollar utilizando la información de secuencia específica del evento élite que se proporciona en el presente documento. Dichos métodos de detección alternativos incluyen métodos de detección de amplificación de señal lineal basados en escisión invasiva de estructuras de ácido nucleico particulares, también conocida como tecnología Invader™, (como se describe, por ejemplo, en la patente de EE. UU. 5.985.557 "Invasive Cleavage of Nucleic Acids", 6,001,567 "Detection of Nucleic Acid sequences by Invader Directed Cleavage"). Para este fin, la secuencia diana híbrida con un primer oligonucleótido de ácido nucleico marcado que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1452 al nucleótido 1469 o su complemento o dicha sonda de ácido nucleico marcada que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 223 al nucleótido 240 o su complemento e hibrida adicionalmente con un segundo oligonucleótido de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1434 al nucleótido 1451 o su complemento o dicha sonda de ácido nucleico marcada que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 241 al nucleótido 258 o su complemento, en donde el primer y segundo oligonucleótido se solapan con al menos un nucleótido. La estructura dúplex o triple que se produce mediante esta hibridación permite la escisión selectiva de la sonda con una enzima (Cleavase®) dejando la secuencia diana intacta. La sonda marcada escindida se detecta posteriormente, potencialmente a través de una etapa intermedia que da como resultado una amplificación adicional de la señal.

Un "kit", como se usa en el presente documento, se refiere a un conjunto de reactivos con el propósito de realizar el método de la invención, más particularmente, la identificación del evento élite EE-GM3 en muestras biológicas o la determinación del estado de cigosidad de EE-GM3 que contiene material vegetal. Más particularmente, una realización preferida del kit de la invención comprende al menos dos cebadores específicos, como se describe anteriormente para la identificación del evento élite, o tres cebadores específicos para la determinación del estado de cigosidad. Opcionalmente, el kit puede comprender además cualquier otro reactivo descrito en el presente

documento en el Protocolo de Identificación por PCR. Como alternativa, según otra realización de esta invención, el kit puede comprender una sonda específica, como se describe anteriormente, que hibrida específicamente con ácido nucleico de muestras biológicas para identificar la presencia de EE-GM3 en las mismas. Opcionalmente, el kit puede comprender además cualquier otro reactivo (tal como, pero sin limitación, un tampón de hibridación, marcador) para la identificación de EE-GM3 en muestras biológicas, utilizando la sonda específica.

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

Como se usa en el presente documento, "identidad de secuencia" con respecto a las secuencias de nucleótidos (ADN o ARN), se refiere al número de posiciones con nucleótidos idénticos dividido por el número de nucleótidos en la más corta de las dos secuencias. La alineación de las dos secuencias de nucleótidos se realiza mediante el algoritmo de Wilbur y Lipmann (Wilbur y Lipmann, 1983, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 80: 726) utilizando un tamaño de ventana de 20 nucleótidos, una longitud de palabra de 4 nucleótidos y una penalización por huecos de 4. El análisis asistido por ordenador y la interpretación de los datos de secuencia, incluida la alineación de secuencia como se describe anteriormente, pueden, por ejemplo, realizarse convenientemente usando el paquete de software de análisis de secuencias del Genetics Computer Group (GCG, Centro de Biotecnología de la Universidad de Wisconsin). Las secuencias se indican como "esencialmente similares" cuando tales secuencias tienen una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 75%, particularmente al menos aproximadamente el 80%, más particularmente al menos aproximadamente el 85%, bastante particularmente al menos alrededor del 90%, especialmente al menos aproximadamente el 95%, más especialmente al menos aproximadamente el 98 %, o al menos aproximadamente el 99 %. Está claro que cuando se dice que las secuencias de ARN son esencialmente similares o tienen un cierto grado de identidad de secuencia con las secuencias de ADN, la timidina (T) en la secuencia de ADN se considera igual al uracilo (U) en la secuencia de ARN. Además, está claro que pueden aparecer pequeñas diferencias o mutaciones en secuencias de ADN a lo largo del tiempo y que se pueden permitir algunos desapareamientos para los cebadores o sondas específicos de eventos de la invención, por lo que cualquier secuencia de ADN indicada en el presente documento en cualquier realización de esta invención para cualquier ADN flanqueante 3' o 5' o para cualquier inserto o ADN extraño o cualquier cebador o sonda de esta invención, también incluye secuencias esencialmente similares a las secuencias proporcionadas en el presente documento, tales como secuencias que hibridan a o con al menos el 90%, 95 %, 96 %, 97 %, 98%, o al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia dada para cualquier ADN flanqueante 3' o 5', para cualquier cebador o sonda o para cualquier inserto o ADN extraño de esta invención.

El término "cebador", como se usa en el presente documento, abarca cualquier ácido nucleico que sea capaz de cebar la síntesis de un ácido nucleico naciente en un proceso dependiente de plantilla, tal como PCR. Típicamente, los cebadores son oligonucleótidos de 10 a 30 nucleótidos, pero se pueden emplear secuencias más largas. Los cebadores pueden proporcionarse en forma de doble cadena, aunque se prefiere la forma de cadena sencilla.

Las sondas se pueden usar como cebadores, pero están diseñadas para unirse al ADN o ARN diana y no es necesario usarlas en un proceso de amplificación.

El término "reconocer" como se usa en el presente documento cuando se refiere a cebadores específicos, se refiere al hecho de que los cebadores específicos hibridan específicamente con una secuencia de ácido nucleico en el evento élite en las condiciones establecidas en el método (como las condiciones de la Identificación de Identificación por PCR), donde la especificidad se determina por la presencia de controles positivos y negativos.

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

Como se usa en el presente documento, una muestra biológica es una muestra de una planta, material vegetal o productos que comprenden material vegetal. El término "planta" está destinado a abarcar tejidos de plantas de soja (*Glycine max*), en cualquier etapa de madurez, así como cualquier célula, tejido u órgano extraído de o derivado de cualquiera de dichas plantas, incluyendo sin limitación, cualquier semilla, hoja, tallo, flor, raíz, célula individual,

gameto, cultivo celular, cultivo de tejido o protoplasto. "Material vegetal", como se usa en el presente documento, se refiere al material obtenido o derivado de una planta. Los productos que comprenden material vegetal se refieren a alimentos, piensos u otros productos que se producen utilizando material vegetal o pueden estar contaminados por material vegetal. Se entiende que, en el contexto de la presente invención, en dichas muestras biológicas se analiza la presencia de ácidos nucleicos específicos para EE-GM3, lo que implica la presencia de ácidos nucleicos en las muestras. Por lo tanto, los métodos a los que se hace referencia en el presente documento para identificar el evento élite EE-GM3 en muestras biológicas, se relacionan con la identificación en muestras biológicas de ácidos nucleicos que comprenden el evento élite.

Como se usa en el presente documento, "que comprende" se debe interpretar como que especifica la presencia de las características, enteros, etapas, pasos, reactivos o componentes indicados a los que se hace referencia, pero no excluye la presencia o adición de una o más características, enteros, etapas o componentes, o grupos de los mismos. Por lo tanto, por ejemplo, un ácido nucleico o proteína que comprende una secuencia de nucleótidos o aminoácidos, puede comprender más nucleótidos o aminoácidos que los realmente citados, es decir, estar incrustado en un ácido nucleico o proteína más grande. Un gen quimérico que comprende una secuencia de ADN que está definida funcional o estructuralmente, puede comprender secuencias de ADN adicionales, tales como un promotor y secuencias de terminación de la transcripción.

La presente invención también se refiere al desarrollo de un evento élite EE-GM3 en plantas de soja comprendiendo este evento, la plantas y semillas de progenie que comprenden el evento élite EE-GM3 obtenido de estas plantas y a las células vegetales, o material vegetal derivado de plantas que comprenden este evento. Las plantas que comprenden el evento élite EE-GM3 se pueden obtener como se describe en el Ejemplo 1. Esta invención también se refiere a semillas que comprenden el evento élite EE-GM3 depositadas en el NCIMB con el número de depósito NCIMB 41659 o derivados de las mismas que comprenden el evento élite EE-GM3. "Derivados (de semilla)", como se usa en el presente documento, se refiere a plantas que pueden crecer a partir de dicha semilla, la progenie que resulta del cruce o retrocruzamiento, así como las células vegetales, órganos, partes, tejido, cultivo celular, protoplastos y material vegetal de la misma.

Las plantas o el material vegetal de soja que comprenden EE-GM3 se pueden identificar de acuerdo con el Protocolo de Identificación por PCR descrito para EE-GM3 en el Ejemplo 2. Brevemente, el ADN genómico de la soja presente en la muestra biológica se amplifica por PCR usando un cebador que reconoce específicamente una secuencia dentro de la secuencia flanqueante 5' o 3' de EE-GM3, tal como el cebador con la secuencia de la SEQ ID NO: 5, y un cebador que reconoce una secuencia en el ADN extraño, tal como el cebador con la secuencia de la SEQ ID NO: 4. Los cebadores de ADN que amplifican parte de una secuencia endógena de soja se utilizan como control positivo para la amplificación por PCR. Si tras la amplificación por PCR, el material produce un fragmento del tamaño esperado, el material contiene material vegetal de una planta de soja que alberga el evento élite EE-GM3.

Las plantas que albergan EE-GM3 se caracterizan por su tolerancia al glifosato, así como por su tolerancia a los inhibidores de HPPD, tal como el isoxaflutol. Las plantas que albergan EE-GM3 también se caracterizan por tener características agronómicas que son comparables a las variedades de soja disponibles comercialmente, en ausencia de la aplicación de herbicida. Se ha observado que la presencia de un ADN extraño en la región de inserción del genoma de la planta de soja descrita en el presente documento, confiere características fenotípicas y moleculares particularmente interesantes a las plantas que comprenden este evento.

Una realización de esta invención proporciona un evento élite en plantas de soja, que se puede obtener mediante la inserción de 2 transgenes en una ubicación específica en el genoma de la soja, cuyo evento e élite confiere tolerancia al glifosato y a un herbicida inhibidor de HPPD como el isoxaflutol en tales plantas de soja, y en donde tal evento élite no causa ningún efecto sobre el rendimiento agronómico de tales semillas de soja que afecten negativamente el rendimiento de tales plantas de soja, en comparación con las líneas isogénicas (como se usa en el presente documento, "líneas isogénicas" o "líneas casi isogénicas" son líneas de soja del mismo origen genético pero que carecen de transgenes, tal como las plantas del mismo origen genético que la planta utilizada para la transformación, o la segregación de líneas hermanas que han perdido los transgenes). En particular, la presente invención proporciona un evento élite en plantas de soja, en donde la inserción o presencia de dicho evento élite en el genoma de tales plantas de soja no causa un aumento de la susceptibilidad a la enfermedad, no causa un arrastre en el rendimiento o no causa un aumento en el alojamiento, en tales plantas de soja, en comparación con las líneas isogénicas. Por lo tanto, la presente invención proporciona un evento élite en plantas de soja, denominado EE-GM3, que da como resultado plantas de soja que pueden tolerar la aplicación de glifosato y un herbicida inhibidor de HPPD (ya sea de forma simultánea o por separado) sin afectar negativamente el rendimiento de dichas plantas de soja en comparación con las líneas isogénicas, cuyas plantas de soja no tienen una diferencia estadísticamente significativa en su susceptibilidad a la enfermedad, o alojamiento, tal como las plantas de soja isogénicas. Estas características hacen que el evento élite actual sea muy interesante para controlar las malezas resistentes al glifosato en los campos de soja, y también se puede usar en enfoques para prevenir o retrasar un mayor desarrollo de la resistencia al glifosato en los campos de soja (por ejemplo, mediante la aplicación de glifosato e isoxaflutol, asegurando 2 modos de acciones aplicadas en un campo de soja).

En el presente documento también se proporciona una planta de soja o una parte de la misma que comprende el evento EE-GM3, en donde la semilla de soja representativa que comprende el evento EE-GM3 se ha depositado bajo el número de acceso 41659 de NCIMB. En el presente documento, además se proporcionan las semillas de tales plantas, que comprenden dicho evento, y también se describe en el presente documento un producto de soja producido a partir de tales semillas, en el que dicho producto de soja comprende el evento EE-GM3. Dicho producto de soja puede ser o puede comprender sémola, semillas molidas, harina, copos, etc. En particular, dicho producto de soja comprende un ácido nucleico que produce un amplicón diagnóstico o específico para el evento EE-GM3, comprendiendo dicho amplicón las SEQ ID NO: 2 o 3. En el presente documento también se describe un método para producir un producto de soja, que comprende obtener semillas de soja que comprenden el evento EE-GM3, y producir dicho producto de soja a partir de ellas.

También se proporciona en el presente documento una planta de soja, que es la progenie de cualquiera de las plantas de soja anteriores, y que comprende el evento EE-GM3.

En el presente documento se describe adicionalmente un método para producir una planta de soja tolerante al glifosato y/o a herbicidas de isoxaflutol, que comprende la introducción en el genoma de dicho evento de planta EE-GM3, particularmente al cruzar una primera planta de soja que carece del evento EE-GM3 con una planta de soja que comprende EE-GM3, y la selección de una planta progenie tolerante al glifosato y/o al isoxaflutol.

También se proporciona en el presente documento una planta tolerante al glifosato y/o isoxaflutol que comprende el evento élite EE-GM3, particularmente sin resistencia al rendimiento, y con características agronómicas aceptables, que comprende una proteína 2mEPSPS y HPPD, y capaz de producir un amplicón diagnóstico para el evento EE-GM3. También se proporcionan en el presente documento, los amplicones aislados específicos (fragmentos de secuencia de ADN) como tales, que pueden obtenerse utilizando las herramientas de detección específicas descritas en el presente documento, particularmente los amplicones que incluyen en su secuencia un fragmento de ADN que se origina a partir de ADN de planta y un fragmento de ADN extraño o heterólogo a dicha planta, como el ADN insertado en el genoma de la planta por transformación, como se define en el presente documento.

En el presente documento, se describe adicionalmente un método para controlar malezas en un campo de plantas de soja que comprenden el evento EE-GM3, o un campo a plantar con tales plantas de soja, que comprende tratar el campo con una cantidad eficaz de un herbicida basado en isoxaflutol, en donde dichas plantas son tolerantes a dicho herbicida.

En el presente documento se describe adicionalmente un ADN que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o una secuencia esencialmente similar a la misma, y cualquier planta, célula, tejido o semilla, particularmente de soja, que comprende dicha secuencia de ADN, como una planta, célula, tejido o semilla que comprende EE-GM3, particularmente un ADN que comprende 2 regiones adyacentes que comprenden o que consisten (esencialmente) en la SEQ ID NO: 1, o un ADN que comprende 2 regiones adyacentes que comprenden o que consisten en la SEQ ID NO: 1 con algunos nucleótidos cambiados, eliminados o agregados, tal como un ADN que comprende una duplicación de la SEQ ID NO: 1 con 4, 6, 8 o 10 nucleótidos eliminados o reemplazados, ubicados cerca (tal como separados 200-500 nt, o menos de 2000 o 10.000 nt) entre sí. Esto incluye el ADN de la SEQ ID NO: 11 desde la posición del nucleótido 2257 hasta la posición del nucleótido 16601 en donde se han reemplazado 2, 4, 6, 8 o 10 nucleótidos por otros nucleótidos, o en donde se han eliminado o agregado 2, 4, 6, 8 o 10 nucleótidos, o el ADN de la SEQ ID NO: 11 desde la posición del nucleótido 2257 a la posición del nucleótido 16601 de la SEQ ID NO: 11, así como el ADN de la SEQ ID NO: 11, y cualquier planta, célula, tejido o semilla, particularmente de soja, que comprende cualquiera de tales secuencias de ADN. También se incluye en el presente documento cualquier planta, célula, tejido o semilla de soja, que comprende la secuencia de ADN (heteróloga o extraña a una planta, semilla, tejido o célula de soja convencional) de la SEQ ID NO: 11. En el presente documento también se describe cualquier planta, célula, tejido o semilla de soja que comprende la secuencia de ADN de la SEQ ID NO: 11 desde la posición del nucleótido 2257 hasta la posición del nucleótido 16601, o que comprende una secuencia de ADN con al menos el 99% o 99,5% de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 11, o que comprende una secuencia de ADN con al menos el 99% o 99,5% de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 11 desde la posición del nucleótido 2257 hasta la posición del nucleótido 16601.

También se proporciona, en el presente documento, una planta, célula vegetal, tejido o semilla de soja transgénica, que comprende en su genoma el evento EE-GM3 caracterizado por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos esencialmente similar a la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1441 al nucleótido 1462 y una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos esencialmente similar a la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 230 al 251, o el complemento de dichas secuencias, así como una planta, célula vegetal, tejido o semilla de soja, que comprende en su genoma el evento EE-GM3 caracterizado por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos esencialmente similar a la SEQ ID NO: 2 y una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos esencialmente similar a la SEQ ID NO: 3, o el complemento de dichas secuencias.

60

Incluso se describe adicionalmente en el presente documento, una planta, célula, tejido o semilla de soja, que comprende EE-GM3, caracterizada por comprender en el genoma de sus células una secuencia de ácido nucleico con al menos un 80%, 90%, 95% o 100% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1431 a 1472 y una secuencia de ácido nucleico con al menos un 80%, 90%, 95% o 100% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 220 a 261, o el complemento de dichas secuencias.

El término "isoxaflutol", como se usa en el presente documento, se refiere al herbicida isoxaflutol [es decir, (5-ciclopropil-4-isoxazolil) [2-(metilsulfonil)-4-(trifluorometil) fenil] metanona], el metabolito activo del mismo, dicetonitrilo, y cualquier mezcla o solución que comprenda dichos compuestos. Los herbicidas inhibidores de HPPD útiles para la aplicación en el evento de esta invención son los diquetonitrilos, p. Ej. 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-metilsulfonil-4-trifluorometilfenil) -propano-1,3-diona y 2-ciano-1-[4-(metilsulfonil)-2-trifluorometilfenil]-3-(1 -metilciclopropil) propano-1,3-fiona; otros isoxazoles; y los pirazolinatos, por ejemplo topamezona [es decir, [3-(4,5-dihidro-3-isoxazolil) -2-metil-4-(metilsulfonil) fenil] (5-hidroxi-1-metil-1H-pirazol-4-il) metanona], y pirasulfotol [(5-hidroxi-1,3-dimetilpirazol-4-il) (2-metil-4-trifluorometilfenil) metanona]; o pirazofeno [2-[4-(2,4-diclorobenzoil)-1,3-dimetilpirazol-5-iloxi] acetofenona].

En una realización de la presente invención, un campo a ser plantado con plantas de soja que contienen el evento EE-GM3, se puede tratar con un herbicida inhibidor de HPPD, como el isoxaflutol ('IFT'), antes de plantar las plantas de soja o sembrar las semillas, lo que limpia el campo de malezas que son eliminadas por el inhibidor de HPPD, lo que permite realizar prácticas de no labranza, seguidas del cultivo o siembra de las semillas de soja en el mismo campo pretratado más adelante (aplicación de quemado utilizando un herbicida inhibidor de HPPD). La actividad residual de IFT también protegerá a las plantas de soja emergentes y en crecimiento de la competencia de las malezas en las primeras etapas de crecimiento. Una vez que las plantas de soja tengan un cierto tamaño y las malas hierbas tiendan a reaparecer, se puede aplicar glifosato o una mezcla de inhibidor de HPPD-glifosato como herbicida postemergente sobre la parte superior de las plantas.

En otra realización de esta invención, un campo en el que se sembraron semillas que contenían el evento EE-GM3, se puede tratar con un herbicida inhibidor de HPPD, tal como IFT, antes de que emerjan las plantas de soja, pero después de sembrar las semillas (el campo se puede dejar libre de malezas antes de sembrar otros medios, típicamente prácticas de labranza convencionales como arado, arado de chissel o preparación de lecho de siembra), donde la actividad residual mantendrá el campo libre de malezas eliminadas por el herbicida, de modo que las plantas de soja emergentes y en crecimiento no tengan competencia por las malezas (aplicación preemergente de un herbicida inhibidor de HPPD). Una vez que las plantas de soja tengan un cierto tamaño y las malas hierbas tiendan a reaparecer, se puede aplicar glifosato - o una mezcla de inhibidor de HPPD-glifosato - como herbicida postemergente sobre la parte superior de las plantas.

En otra realización de esta invención, las plantas que contienen el evento EE-GM3, se puede tratar con un herbicida inhibidor de HPPD, tal como IFT, sobre la parte superior de las plantas de soja que surgieron de las semillas que se sembraron, lo que limpia el campo de las malezas eliminadas por el inhibidor de HPPD, cuya aplicación se puede hacer junto a (p. ej., en una mezcla de tanque de pulverización), seguida o ir precedida de un tratamiento con glifosato como herbicida postemergente en la parte superior de las plantas (aplicación postemergente de un herbicida inhibidor de HPPD (con o sin glifosato)).

Además, de acuerdo con la presente invención, las plantas de soja que albergan EE-GM3 pueden tratarse con los siguientes insecticidas, herbicidas o fungicidas o las semillas de soja que albergan EE-GM3 pueden recubrirse con una capa que comprende los siguientes insecticidas, herbicidas o fungicidas:

Herbicidas de Soja:

Alacloro, Bentazona, Trifluralin, Clorimurón-etilo, Cloransulam-metilo, Fenoxaprop, Fomesafen, Fluazifop, Glifosato, Imazamox, Imazaquín, Imazetapir, (S-)Metolaclor, Metribuzina, Pendimetalina, Tepraloxidim, Isoxaflutol.

Insecticidas de Soja:

Lambda-cihalotrina, Metomil, Paratión, Tiocarb, Imidacloprid, Clotianidina, Tiametoxam, Tiacloprid, Acetamiprid, Dinotofurano, Flubendiamida, Rynaxypyr, Cyazypyr, Spinosad, Spinetoram, Emamectina - benzoato, Fipronilo, Etiprol, Deltametrina, β -ciflutrina, Cihalotrina, gamma y lambda, 4-[[[6-clorpiridin-3-il) metil] (2,2-difluoretil) amino] furan-2 (5H)-on, Espirotetramat, Espirodiclofeno, Triflumurón, Flonicamid, Tiodicarb, beta-Ciflutrina.

Fungicidas de Soja:

Azoxistrobina, Ciproconazol, Epoxiconazol, Flutriafol, Pyraclostrobina, Tebuconazol, Trifloxistrobina, Protiocconazol, Tetraconazol.

Los siguientes ejemplos describen el desarrollo e identificación del evento élite EE-GM3, el desarrollo de diferentes líneas de soja que comprenden este evento y el desarrollo de herramientas para la identificación específica del evento élite EE-GM3 en muestras biológicas.

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

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

Debe entenderse que es posible que sea necesario ajustar una serie de parámetros en cualquier protocolo de laboratorio, como los protocolos de PCR en los Ejemplos a continuación, a las condiciones específicas del laboratorio y que se puedan modificar ligeramente para obtener resultados similares. Por ejemplo, el uso de un método diferente para la preparación de ADN o la selección de otros cebadores en un método de PCR puede dictar otras condiciones óptimas para el protocolo de PCR. Sin embargo, estos ajustes serán evidentes para un experto en la materia, y además se detallan en los manuales de aplicación de PCR actuales.

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

- SEQ ID NO: 1: Secuencia de nucleótidos de fragmento Sall del vector pSF10.
- SEQ ID NO: 2: secuencia de nucleótidos que comprende la región 5' que flanquea el ADN extraño que comprende los genes de tolerancia a herbicidas en EE-GM3.
- SEQ ID NO: 3: secuencia de nucleótidos que comprende la región 3' que flanquea el ADN extraño que comprende los genes de tolerancia a herbicidas en EE-GM3.
- SEQ ID NO: 4: Cebador SOY028
- SEQ ID NO: 5: Cebador SOY029
- SEQ ID NO: 6: Cebador SMP187
- SEQ ID NO: 7: Cebador STV019
- SEQ ID NO: 8: secuencia de nucleótidos del amplicón
- SEQ ID NO: 9: cebador 1 para la amplificación del fragmento control (SOY01)
- SEQ ID NO: 10: cebador 2 para la amplificación del fragmento control (SOY02)
- SEQ ID NO: 11: secuencia de nucleótidos de ADN extraño y secuencias flanqueantes de plantas en EE-GM3
- SEQ ID NO: 12: Cebador SHA130
- SEQ ID NO: 13: Cebador SHA178

Ejemplos

20 1. Transformación de *Glycine max* con genes de tolerancia a herbicidas.

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

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

Tabla 1. Posiciones de nucleótidos del ADN comprendidas entre los sitios de restricción Sall de pSF10 (SEQ ID NO: 1)

Posiciones de nucleótidos	Orientación	Descripción y referencias
188-479	complemento	3' nos: secuencia que incluye la región 3' no traducida del gen de la nopalina sintasa del ADN-T de pTIT37 de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Depicker et al., 1982, Journal of Molecular and Applied Genetics, 1, 561-573)
480-1556	complemento	hppdPf W336: la secuencia codificante de la 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa de <i>Pseudomonas fluorescens</i> cepa A32 modificada por la sustitución del aminoácido Glicina 336 con un Triptófano, como se describe por Boudec et al. (2001) Patente de EE.UU. US6245968B1

Posiciones de nucleótidos	Orientación	Descripción y referencias
1557-1928	complemento	TPotp Y: secuencia codificante de un derivado peptídico de tránsito optimizado (la posición 55 cambiada a Tirosina), que contiene la secuencia de los genes de subunidad pequeña RuBisCO de <i>Zea mays</i> (maíz) y <i>Helianthus annuus</i> (girasol), como se describe por Lebrun et al. (1996) US5510471
1929-2069	complemento	5'tev: secuencia que incluye la secuencia líder del virus del grabado del tabaco como se describe por Carrington y Freed (1990) Journal of Virology, 64, 1590-1597
2070-3359	complemento	Ph4a748 ABBC: secuencia que incluye la región promotora del gen de la histona H4 de <i>Arabidopsis thaliana</i> , que contiene una duplicación interna (Chabouté et al., 1987) Plant Molecular Biology, 8, 179-191.
3360-4374		Ph4a748: secuencia que incluye la región promotora del gen de la histona H4 de <i>Arabidopsis thaliana</i> (Chabouté et al., 1987) Plant Molecular Biology, 8, 179-191.
4375-4855		intrón1 h3At: primer intrón del gen II de la histona H3.III variante de <i>Arabidopsis thaliana</i> (Chaubert et al., 1992) Journal of Molecular Biology, 225, 569-574.
4856-5227		TPotp C: secuencia codificante del péptido de tránsito optimizado, que contiene la secuencia de los genes de subunidad pequeña RuBisCO de <i>Zea mays</i> (maíz) y <i>Helianthus annuus</i> (girasol), como se describe por Lebrun et al. (1996) US5510471
5228-6565		2mepsps: la secuencia codificante del gen de la 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato sintetasa mutante doble de <i>Zea mays</i> (maíz) (Lebrun et al., 1997) documento número WO9704103-A1
6566-7252		3'histonAt: secuencia que incluye la región 3' no traducida del gen de la histona H4 de <i>Arabidopsis thaliana</i> (Chabouté et al., 1987) Plant Molecular Biology, 8, 179-191.

1.2. Evento EE-GM3

El fragmento pSF10 linealizado con Sail purificado por HPLC de aproximadamente 7,3 kb (que contiene el gen de tolerancia al glifosato *2mEPSPS* y el gen de tolerancia al inhibidor de *HPPD-Pf-W336*) se usó para obtener plantas de soja transformadas mediante transferencia directa de genes a células de soja tipo Jack (Nickell, C. D., G. R. Noel, D. J. Thomas y R. Waller. Registration of 'Jack' soybean. Crop Sci 1365. 30.1990), seguido por la regeneración de células vegetales transformadas en plantas de soja fértiles transgénicas.

1.2.1 Identificación del evento élite EE-GM3

El evento élite EE-GM3 se seleccionó basándose en un extenso procedimiento de selección basado en la buena expresión y estabilidad de los genes de tolerancia a herbicidas, y se evaluó su compatibilidad con características agronómicas óptimas como la altura de la planta, la altura al nódulo, el rodal, el vigor, el rendimiento de la siembra. Las plantas de soja que contienen este evento se seleccionaron de una amplia gama de diferentes eventos de transformación obtenidos utilizando los mismos genes químicos. Los parámetros utilizados en la selección de este evento fueron: a) tolerancia aceptable a la aplicación de herbicida isoxaflutol en ensayos de campo, b) tolerancia aceptable a la aplicación de herbicida glifosato en ensayos de campo, c) tolerancia aceptable a la aplicación combinada de herbicidas isoxaflutol y glifosato en ensayos de campo, d) una inserción de los transgenes de tolerancia a herbicidas en un solo locus en el genoma de la planta de soja, con ausencia de estructura del vector, e) agronomía general similar a las plantas parentales utilizadas para la transformación (madurez, alojamiento, susceptibilidad a la enfermedad, etc.) y f) no hay un arrastre de rendimiento significativo causado por la inserción del ADN transformante (en comparación con una línea isogénica sin el evento, como la línea de plantas utilizada para la transformación, cultivada en las mismas condiciones).

En la generación T3, se seleccionó una línea homocigótica del evento de transformación de soja EE-GM3 para la producción de semillas. Se realizaron estudios de campo agronómico replicado en múltiples ubicaciones en las regiones de adaptación de la variedad parental, Jack. Las evaluaciones de campo incluyeron tolerancia a herbicidas y rendimiento agronómico. El rendimiento agronómico de las plantas que contienen EE-GM3 se encontró comparable a Jack (cuando no se aplicaron herbicidas).

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

- morfología de plantas y características de semillas similares en comparación con Jack,
- ningún cambio en la respuesta a las enfermedades de la soja en comparación con Jack, y
- no hay cambios en la germinación de semillas o latencia en comparación con Jack.

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

10 Las semillas (generación T2) cosechadas de plantas T1 autopolinizadas cultivadas en el campo se sembraron "planta por fila". El análisis de Chi cuadrado de los datos de segregación para las filas (total o parcialmente tolerantes) y de plantas individuales dentro de las filas (tolerantes o sensibles) demuestra la herencia mendeliana esperada de una única inserción para EE-GM3.

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

25 El evento seleccionado EE-GM3 se introdujo en diferentes orígenes genéticos comerciales y se compararon los resultados de los ensayos de campo en diferentes ubicaciones. Las plantas se pusieron a prueba con herbicida glifosato y/o herbicida isoxaflutol utilizando diferentes tratamientos. Las plantas mostraron buena tolerancia a los herbicidas. Cientos de diferentes cultivares de soja que contienen el evento EE-GM3 se utilizaron en un estudio de herencia y se aplicaron herbicidas. Las líneas seleccionadas de este ensayo se incrementaron posteriormente en el campo y también se trataron con herbicida. A partir de ese ensayo, se aumentaron 50 líneas seleccionadas, y éstas también se trataron con herbicida. Las puntuaciones de fitotoxicidad para las últimas líneas rociadas con isoxaflutol y glifosato mostraron cierta variabilidad en la respuesta, pero el intervalo de respuestas entre las líneas reflejó una
30 variabilidad similar a la observada a lo largo de 4 repeticiones del evento EE-GM3 en el origen Jack original, cultivado con el mismo tratamiento y condiciones ambientales. Por lo tanto, se observó tolerancia a los herbicidas relevantes a lo largo de una amplia gama de germoplasma para plantas que comprenden EE-GM3.

35 Además, las plantas que contienen el evento EE-GM3 tenían una morfología normal de hojas, flores y vainas, excelente fertilidad, y no mostraron enfermedad o susceptibilidad anormal a los insectos en múltiples orígenes genéticos. Durante la introgresión en múltiples orígenes genéticos no se observaron problemas o anomalías aberrantes.

40 En una temporada, se diseñó un estudio de 10 ubicaciones para comparar el rendimiento agronómico de la soja con tolerancia doble a los herbicidas que comprendía el evento de transformación EE-GM3 con la variedad parental de la transformación, Jack y algunas variedades de soja no transgénicas. Usando un diseño de bloques completos al azar, las plantas de EE-GM3 se cultivaron en parcelas replicadas con control de malezas convencional o con los herbicidas, glifosato e isoxaflutol previstos. Las parcelas con plantas de soja que contienen el evento de transformación EE-GM3 se rociaron con herbicida isoxaflutol a una tasa diana de 70 gramos ai/Ha y con herbicida glifosato a una tasa diana de 1060 gramos ai/Ha. La aplicación de herbicidas se realizó en estas plantas como un aerosol foliar en aproximadamente la etapa de crecimiento de las plantas V4-V5. Las observaciones agronómicas se
45 realizaron en la temporada temprana, media y tardía. La densidad de la planta (parámetro; recuento de rodales) fue mayor para las parcelas de variedades Jack y no transgénicas que en el caso de las parcelas EE-GM3 en una desviación estándar. La diferencia en el recuento de rodales inicial puede haber sido el resultado de la calidad del lote de semillas, ya que la semilla de siembra EE-GM3 se produjo en el vivero de contra temporada, mientras que la semilla de las variedades no transgénicas se produjo en la temporada de producción normal de los estados contiguos. Sin embargo, el número de días para alcanzar el 50% de emergencia y las tasas de vigor de la planta fueron las mismas, indicando que los lotes de semillas eran comparables para estos parámetros de rendimiento. En los recuentos de rodales de la temporada tardía, las variedades Jack y no transgénicas permanecieron diferentes por una desviación estándar a las plantas EE-GM3. Los rendimientos de las parcelas de plantas de eventos EE-GM3 también fueron más bajos que los de Jack en una desviación estándar, tal vez como resultado de la menor densidad
50 de plantas de las parcelas de eventos EE-GM3. El rendimiento de las variedades no transgénicas fue mayor que el de Jack como podría esperarse debido al avance en el potencial de rendimiento encontrado en las variedades más recientes.

- En un ensayo, las tasas de sanidad vegetal se realizaron en tres etapas de crecimiento: V4-5, R1 y madurez total. La primera evaluación fue poco después de la aplicación del herbicida previsto. En el momento de la evaluación final de la sanidad vegetal, las plantas que contenían EE-GM3 rociadas con ambos herbicidas tenían la misma puntuación que las plantas Jack no pulverizadas, o las plantas no pulverizadas que comprendían EE-GM3. En las calificaciones del personal agronómico, las plantas rociadas con herbicida recibieron una calificación de sanidad de 3-4 (lesión moderada) en las etapas de crecimiento de las plantas V4-5 y R1. Las plantas no pulverizadas (Jack no transformadas o plantas de soja que contienen EE-GM3) se calificaron como 4,6-4,8 (la calificación de 5 indica que no hay lesión). En la calificación final de sanidad vegetal, todas las parcelas recibieron la misma calificación de 5 (sin lesiones).
- Una temporada de ensayo fue una de lluvias excepcionales, y la lesión en los cultivos en las plantas EE-GM3 después de la aplicación del herbicida previsto fue más obvia que la observada en otras temporadas. Las evaluaciones de campo también incluyeron el control de los caracteres de aptitud (reproducción, resistencia a enfermedades, fecundidad, dispersión de semillas, latencia, persistencia). En cuanto a las características reproductivas; días a la emergencia, días a 50% de floración y días a 90% de vainas en maduración, las plantas EE-GM3 y Jack no fueron diferentes. No se observaron diferencias en la reacción a las infestaciones naturales de enfermedades de las plantas y plagas de insectos. Aunque EE-GM3 produjo menos rendimiento final que Jack, no se encontraron diferencias en la fecundidad (peso de 100 semillas). La evaluación de los parámetros de dispersión de semillas (fragmentación de la vaina y alojamiento de la planta) encontró que EE-GM3 y Jack tenían la misma puntuación de fragmentación de la vaina, pero encontraron que las plantas de la EE-GM3 eran menos propensas a ser alojadas. La evaluación de las semillas cosechadas de los 10 lugares no encontró preocupaciones planteadas por las pruebas de germinación o latencia.

En estos ensayos durante la temporada con lluvias excepcionales, el rendimiento final de las plantas EE-GM3, independientemente del tratamiento de control de malezas, fue menor que el rendimiento de Jack por una desviación estándar (tal vez como resultado de la menor densidad de plantas de las parcelas de eventos EE-GM3). En la temporada excepcionalmente húmeda, se notificaron lesiones en el cultivo (decoloración en 10-30% del área de cultivo) para parcelas EE-GM3 hasta seis semanas después de la aplicación foliar de los herbicidas de glifosato e isoxaflutol. Sin embargo, por madurez, se asignaron las clasificaciones de sanidad vegetal "sin lesiones" a todas las parcelas. Se espera que los ensayos de campo de múltiples ubicaciones replicados con EE-GM3 introgresado en el origen del cultivar de soja de élite, cuando se comparan con líneas hermanas casi isogénicas que no contienen el transgén, no muestren diferencias de rendimiento entre las plantas que contienen el evento EE-GM3 y las líneas casi isogénicas (en ausencia de tratamiento herbicida).

Además, en un ensayo de campo replicado, se encontró una tolerancia significativa al cultivo (decoloración de menos del 10%) en plantas de soja que comprenden EE-GM3 cuando se trataron antes o después de la emergencia con IFT (70 gr ai/ha con 0,5% de NIS, Agridex), pero también se encontró una tolerancia significativa al cultivo (decoloración de menos del 10%) en las plantas de soja que contenían EE-GM3 cuando se trataron con una aplicación después de la emergencia de pirasulfotol (35 gr ai/ha con NIS al 0,5%, Agridex), otro herbicida inhibidor de HPPD.

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

Se determinó que la secuencia de las regiones que flanquean el ADN extraño que comprende los genes de tolerancia a herbicidas en el evento élite EE-GM3 es la siguiente:

1.2.2.1. Región flanqueante derecha (5')

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

1.2.2.2. Región flanqueante izquierda (3')

El fragmento identificado como que comprende la región flanqueante 3' se secuenció y su secuencia de nucleótidos se representa en la SEQ ID NO: 3. La secuencia entre el nucleótido 1 y 240 corresponde al ADN extraño, mientras que la secuencia entre el nucleótido 241 y 1408 corresponde al ADN de la planta.

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

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

El ADN extraño que comprende los genes de tolerancia a herbicidas de EE-GM3 contiene, por lo tanto, en orden las siguientes secuencias:

- del nucleótido 1 al nucleótido 199: la secuencia de nucleótidos correspondiente al complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID 1 del nt 6760 al nt 6958;
- 5 - del nucleótido 200 al nucleótido 624: la secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID 1 del nt 6874 al nt 7298;
- del nucleótido 625 al nucleótido 7909: la secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID 1 del nt 7 al nt 7291;
- del nucleótido 7910 al nucleótido 15163: la secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID 1 del nt 12 al nt 7265; y
- 10 - del nucleótido 15164 al nucleótido 15187: la secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID 3 del nt 217 al nt 240 (esta secuencia no corresponde a ADN de plásmido pSF10 o ADN de planta de tipo silvestre y, por lo tanto, se denomina ADN de relleno).

15 Este ADN extraño está precedido inmediatamente cadena arriba y contiguo al ADN extraño por la secuencia flanqueante 5' de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1 al 1451, y está seguido inmediatamente cadena abajo y contiguo al ADN extraño por la secuencia flanqueante 3' de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 241 al nucleótido 1408.

La secuenciación completa confirmada de ADN de las secuencias de ADN extraño y flanqueantes en EE-GM3 dio como resultado la secuencia informada en la SEQ ID NO: 11. En esta secuencia, el ADN insertado es desde la posición del nucleótido 1452 hasta la posición del nucleótido 16638, y las 2 copias casi completas de pSF10 dispuestas en orientación de cabeza a cola son desde la posición del nucleótido 2257 hasta la posición del nucleótido 16601. La secuencia de ADN flanqueante 5' en la SEQ ID NO: 11 es la secuencia desde la posición del nucleótido 1 hasta la posición del nucleótido 1451 en la SEQ ID NO: 11, y la secuencia del ADN flanqueante 3' en la SEQ ID NO: 11 es la secuencia desde la posición del nucleótido 16639 hasta la posición del nucleótido 17806 en la SEQ ID NO: 11.

25 2. Desarrollo de Protocolos de Identificación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para EE-GM3

2.1. Cebadores

Se desarrollaron cebadores específicos que reconocen secuencias dentro del evento élite.

30 Se desarrolló un cebador que reconoce una secuencia dentro de la región flanqueante 3' de EE-GM3. A continuación, se seleccionó un segundo cebador dentro de la secuencia del ADN extraño, de modo que los cebadores abarcan una secuencia de aproximadamente 263 nucleótidos. Se encontró que los siguientes cebadores dan resultados particularmente claros y reproducibles en una reacción de PCR en el ADN de EE-GM3:

SOY028: 5'-ATC.gCT.TTA.ACg.TCC.CTC.Ag-3 (diana: ADN inserto) (SEQ ID NO: 4)
 SOY029: 5'-CAA.ggC.CTC.gAg.ATT.ATC-3' (diana: ADN de la planta) (SEQ ID NO: 5)

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

SOY01 5'-gTC.AgC.CAC.ACA.gTg.CCT.AT-3' SEQ ID NO: 9)
 SOY02 5'-gTT.ACC.gTA.CAg.gTC.TTT.CC-3' SEQ ID NO: 10)

2.2. Fragmentos amplificados

Los fragmentos amplificados esperados en la reacción de PCR son:

Para el par de cebadores SOY01- 413 pb (control endógeno)
 SOY02:
 Para el par de cebadores SOY028- 263 pb (evento élite EE-GM3)
 SOY029:

2.3. ADN plantilla

40 La plantilla de ADN se preparó a partir de un punzón de hojas de acuerdo con Edwards et al. (Nucleic Acid

Research, 19, p1349, 1991). Cuando se usa ADN preparado con otros métodos, se debe realizar una prueba utilizando diferentes cantidades de plantilla. Por lo general, 50 ng de ADN genómico plantilla producen los mejores resultados.

2.4. Controles positivos y negativos asignados

- 5 Para evitar falsos positivos o negativos, se determinó que los siguientes controles positivos y negativos deberían incluirse en una ejecución de PCR:
- Control Master Mix(control ADN negativo). Esta es una PCR en la que no se agrega ADN a la reacción. Cuando se observa el resultado esperado, no hay productos de PCR, esto indica que el cóctel de PCR no estaba contaminado con ADN diana.
 - 10 - Un control positivo de ADN (muestra de ADN genómico que se sabe que contiene las secuencias transgénicas). La amplificación exitosa de este control positivo demuestra que la PCR se ejecutó en condiciones que permiten la amplificación de secuencias diana.
 - Un control de ADN de tipo silvestre. Esta es una PCR en la que el ADN plantilla proporcionado es ADN genómico preparado a partir de una planta no transgénica. Cuando se observa el resultado esperado, no se observa una amplificación de un producto de PCR del transgén sino una amplificación del producto de PCR endógeno, esto indica que no hay una amplificación del origen del transgén detectable en una muestra de ADN genómico.

2.5. Condiciones de PCR

20 Los resultados óptimos se obtuvieron en las siguientes condiciones (en la descripción de las diversas condiciones para obtener resultados óptimos se pretende proporcionar ejemplos de tales condiciones). Claramente, un experto en la materia podría variar las condiciones, los reactivos y los parámetros, como el uso de otras polimerasas Taq, y lograr resultados deseables):

- la mezcla de PCR para reacciones de 25 µl contiene:
 - 20 ng de ADN plantilla
 - 25 2,5 µl de Tampón de Amplificación 10x (suministrado por el fabricante con la polimerasa Taq)
 - 0,5 µl de dNTP 10 mM
 - 0,4 µl de SOY01 (10 pmoles/µl)
 - 0,4 µl de SOY02 (10 pmoles/µl)
 - 0,7 µl de SOY028 (10 pmoles/µl)
 - 30 0,7 µl de SOY029 (10 pmoles/µl)
 - 0,1 µl de polimerasa de ADN Taq (5 unidades/µl)
 - agua hasta 25 µl

- el perfil de termociclado a seguir para obtener resultados óptimos es el siguiente:

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

2.6. Análisis en gel de agarosa

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

2.7. Validación de los resultados

- 40 Se determinó que los datos de las muestras de ADN de plantas transgénicas dentro de una única ejecución de PCR y un solo cóctel de PCR no deberían ser aceptables a menos que 1) el control positivo de ADN muestre los

productos de PCR esperados (fragmentos transgénicos y endógenos), 2) el control negativo de ADN sea negativo para la amplificación por PCR (sin fragmentos) y 3) el control de ADN de tipo silvestre muestre el resultado esperado (amplificación de fragmentos endógenos).

5 Al seguir el Protocolo de Identificación por PCR para EE-GM3 como se describe anteriormente, los carriles que muestran cantidades visibles de los productos de PCR transgénicos y endógenos de los tamaños esperados, indican que la planta correspondiente a partir de la cual se preparó el ADN genómico plantilla, ha heredado el evento élite EE-GM3. Los carriles que no muestran cantidades visibles de ninguno de los productos de PCR transgénicos y que muestran cantidades visibles del producto de PCR endógeno, indican que la planta correspondiente a partir de la cual se preparó el ADN genómico plantilla, no comprende el evento élite. Los carriles que no muestran cantidades
10 visibles de los productos de PCR endógenos y transgénicos, indican que la calidad y/o cantidad del ADN genómico no permitió que se generara un producto de PCR. Estas plantas no se pueden puntuar. La preparación del ADN genómico debe repetirse y se debe realizar una nueva ejecución de PCR, con los controles apropiados.

2.8. Uso del protocolo de PCR discriminatorio para identificar EE-GM3

15 Antes de intentar analizar incógnitas, se realiza una ejecución de prueba, con todos los controles apropiados. El protocolo desarrollado puede requerir optimización para los componentes que pueden diferir entre laboratorios (preparación de ADN de plantilla, ADN polimerasa Taq, calidad de los cebadores, dNTP, termociclador, etc.).

La amplificación de la secuencia endógena juega un papel clave en el protocolo. Se tienen que lograr condiciones de PCR y de termociclado que amplifiquen cantidades equimolares tanto de la secuencia endógena como de la transgénica en una plantilla de ADN genómico transgénico conocido. Cuando el fragmento endógeno marcado no se
20 amplifica o cuando las secuencias marcadas no se amplifican con las mismas intensidades de tinción con bromuro de etidio, como se determina por electroforesis en gel de agarosa, se puede requerir la optimización de las condiciones de la PCR.

El material de hojas de varias plantas de soja, algunas de las cuales comprendían EE-GM3 se probaron de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente. Las muestras del evento élite EE-GM3 y de soja de tipo silvestre se tomaron como controles positivos y negativos, respectivamente.
25

La Figura 2 ilustra el resultado obtenido con el Protocolo de Identificación por PCR de evento élite para EE-GM3 en varias muestras de plantas de soja. Se encontró que las muestras en los carriles 2 y 3 contenían el evento élite EE-GM3 cuando se detectó la banda de 263 pb, mientras que las muestras en los carriles 4 a 8 no comprenden EE-GM3. Los carriles 6 y 7 comprenden muestras de otros eventos de transformación de soja obtenidos con los mismos genes quiméricos con tolerancia a herbicidas; el carril 8 contiene ADN de plantas de soja de tipo silvestre y el carril 9
30 representa la muestra de control negativo (agua), los carriles 1 y 10 representan el Marcador de Peso Molecular (escalera de 100 pb).

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

35 Se establece un ensayo de PCR discriminante (dPCR) para detectar la presencia de niveles bajos de EE-GM3 en semillas a granel. Se detectó con éxito un nivel mínimo de 0,4% (p/p) de semillas transgénicas en un volumen de semillas no transgénicas en condiciones repetibles. Por lo tanto, se determina que el Límite de Detección es del 0,4% (p/p).

Los siguientes cebadores se aplican en esta reacción de PCR de la diana:

40 Cebador directo dirigido a la secuencia de ADN-T:
SHA130 5'-CTA.TAT.TCT.ggT.TCC.AAT.TTA.TC-3' (SEQ ID NO:12)
Cebador inverso dirigido a la secuencia flanqueante 3':
SMP178 5'-TgA.ggC.ACg.TAT.TgA.TgA.CC-3' (SEQ ID NO: 13)

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

45 La reacción de PCR de la diana se lleva a cabo en aproximadamente 200 ng de ADN plantilla preparado a partir de semillas a granel molidas de acuerdo con un kit de extracción de purificación de ADN Gentra Puregene modificado (Qiagen). Cuando se usa ADN preparado con otros métodos, debe realizarse una prueba utilizando muestras con niveles relativos conocidos de EE-GM3.

50 Una reacción de PCR del sistema de referencia validada, dirigida a una secuencia endógena, debería realizarse idealmente en una ejecución de PCR separada para verificar la idoneidad de la muestra de ADN para el análisis de PCR para evitar resultados falsos negativos.

Para muestras de prueba desconocidas, el experimento de PCR debería incluir idealmente las muestras de control positivo y negativo apropiadas, es decir:

- 5 - Control Master Mix(control ADN negativo). Esta es una PCR en la que no se agrega ADN a la reacción. Cuando se observa el resultado esperado (sin producto de PCR) tanto para la reacción del sistema objetivo como para el de referencia, esto indica que el cóctel de PCR no estaba contaminado con el ADN diana.
- Un control positivo de ADN (muestra de ADN genómico que se sabe que contiene las secuencias transgénicas). La amplificación exitosa de este control positivo demuestra que la PCR se ejecutó en condiciones que permiten la amplificación de secuencias diana.
- 10 - También se puede agregar un control de ADN de tipo silvestre en esta PCR. Esta es una PCR en la que el ADN plantilla proporcionado es ADN genómico preparado a partir de una planta no transgénica. Cuando se observa el resultado esperado, no se observa una amplificación de un producto de PCR del transgén sino una amplificación del producto de PCR endógeno, esto indica que no hay una amplificación del origen del transgén detectable en una muestra de ADN genómico.

Los resultados óptimos se obtienen en las siguientes condiciones:

15 Obviamente, se pueden usar otras polimerasas Taq, y a continuación, las condiciones pueden diferir para seguir las recomendaciones del proveedor.

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

20 200 ng de ADN plantilla

5 µl de 5xTampón de Reacción

0,25 µl de dNTP 20 mM

0,7 µl de SHA130 (10 pmoles/µl)

0,4 µl de SMP178 (10 pmoles/µl)

25 0,1 µl de polimerasa de ADN GO-Taq (5 unidades/µl)

Añadir agua hasta 25 µl

- el perfil de termociclado a seguir para obtener resultados óptimos es el siguiente:

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

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

Al seguir el método de PCR como se describe anteriormente, los carriles que muestran cantidades visibles de los productos de la PCR diana y del sistema de referencia de los tamaños esperados, indican que la muestra de prueba a partir de la cual se preparó el ADN genómico plantilla, contenía niveles del evento élite EE-GM3 por encima del límite de detección de la reacción objetivo.

35 Los carriles que no muestran cantidades visibles de ninguno de los productos de PCR diana y que muestran cantidades visibles del producto de PCR del sistema de referencia, indican que la muestra de prueba a partir de la cual se preparó el ADN genómico plantilla, contenía niveles del evento élite EE-GM3 por debajo del límite de detección de la reacción objetivo.

40

Los carriles que no muestran cantidades visibles de los productos de PCR endógenos y transgénicos, indican que la calidad y/o cantidad del ADN genómico no permitió que se generara un producto de PCR. Estas plantas no se pueden puntuar. La preparación del ADN genómico debe repetirse y se debe realizar una nueva ejecución de PCR, con los controles apropiados.

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

10 Se obtiene un fragmento de integración específico de EE-GM3 mediante amplificación por PCR utilizando los cebadores específicos SOY028 (SEQ ID NO: 4) y SOY029 (SEQ ID NO: 5) que producen un amplicón con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 8 o por síntesis química y está marcado. Este fragmento de integración se utiliza como una sonda específica para la detección de EE-GM3 en muestras biológicas. El ácido nucleico se extrae de las muestras de acuerdo con los procedimientos convencionales. Este ácido nucleico se pone en contacto, a continuación, con la sonda específica en condiciones de hibridación que se optimizan para permitir la formación de un híbrido. La formación del híbrido se detecta, a continuación, para indicar la presencia de ácido nucleico EE-GM3 en la muestra. Opcionalmente, el ácido nucleico en las muestras se amplifica utilizando los cebadores específicos antes de ponerlo en contacto con la sonda específica. Como alternativa, el ácido nucleico se marca antes de ponerlo en contacto con la sonda específica en lugar del fragmento de integración. Opcionalmente, la sonda específica se une a un soporte sólido (tal como, pero sin limitación, un filtro, una tira o perlas), antes de ponerla en contacto con las muestras.

20 **4. Protocolo para la determinación basada en PCR del estado de cigosidad del material vegetal de soja EE-GM3**

4.1. Cebadores

25 Dos cebadores que reconocen las secuencias de nucleótidos del locus de tipo silvestre antes de la inserción del evento élite, se diseñaron de tal manera que se dirigen entre sí y tienen el sitio de inserción del ADN extraño que comprende los genes de tolerancia al herbicida en el medio. Este conjunto de cebadores, junto con un tercer cebador complementario de secuencias de ADN extraño y dirigido hacia el ADN flanqueante, permite la amplificación simultánea por PCR de la secuencia específica de EE-GM3, así como de la secuencia de tipo silvestre.

Se encontró que los siguientes cebadores dan resultados particularmente claros y reproducibles en una reacción de PCR de puntuación de cigosidad en el ADN de EE-GM3:

SMP187:	5'-ATA.TCA.ACC.CgT.AgC.TCg.AC-3' (SEQ ID NO: 6) (diana: ADN de plantas de tipo silvestre cadena arriba de la secuencia flanqueante 3')
SOY029	5'-CAA.ggC.CTC.gAg.ATT.ATC-3' (SEQ ID NO:5) (diana: ADN de plantas de la secuencia flanqueante 3')
STV019	5'-ggC.ATT.AAA.TTg.gTg.AAA.ATT.gC-3' (SEQ ID NO: 7) (diana: ADN inserto)

4.2. Fragmentos amplificados

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

Para el par de cebadores SMP187 -	SOY029: 319 pb (locus de tipo silvestre)
Para el par de cebadores STV019 -	SOY029: 706 pb (locus de EE-GM3)

4.3. ADN plantilla

35 La plantilla de ADN se preparó a partir de un punzón de hojas de acuerdo con Edwards et al. (Nucleic Acid Research, 19, p1349, 1991). Cuando se usa ADN preparado con otros métodos, se debe realizar una prueba utilizando diferentes cantidades de plantilla. Por lo general, 25 o 50 ng de ADN genómico plantilla producen los mejores resultados.

4.4. Controles positivos y negativos asignados

40 Para evitar falsos positivos o negativos, es recomendable que los siguientes controles positivos y negativos se incluyan en una ejecución de PCR:

- Control Master Mix(control ADN negativo). Esta es una PCR en la que no se agrega ADN a la reacción. Cuando se observa el resultado esperado, no hay productos de PCR, esto indica que el cóctel de PCR no estaba contaminado con ADN diana.

- Un control positivo de ADN (muestra de ADN genómico que se sabe que contiene las secuencias transgénicas). La amplificación exitosa de este control positivo demuestra que la PCR se ejecutó en condiciones que permiten la amplificación de secuencias diana.
- 5 - Un control de ADN de tipo silvestre. Esta es una PCR en la que el ADN plantilla proporcionado es ADN genómico preparado a partir de una planta no transgénica. Cuando se observa el resultado esperado, no se observa una amplificación de un producto de PCR del transgén sino una amplificación del producto de PCR endógeno, esto indica que no hay una amplificación del origen del transgén detectable en una muestra de ADN genómico.

4.5. Condiciones de PCR

10 Los resultados óptimos se obtuvieron en las siguientes condiciones. Obviamente, se pueden usar otras polimerasas Taq, tal como GO-Taq y a continuación, pueden diferir las condiciones para seguir las recomendaciones del proveedor.

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

x µl de ADN plantilla (25 ng)

15 2,5 µl de Tampón de Amplificación 10x (suministrado por el fabricante con la polimerasa Taq)

0,5 µl de dNTP 10 mM

0,5 µl de SMP187 (10 pmoles/µl)

0,5 µl de STV019 (10 pmoles/µl)

1 µl de SOY029 (10 pmoles/µl)

20 0,1 µl de polimerasa de ADN Taq (5 unidades/µl)

agua hasta 25 µl

- el perfil de termociclado a seguir para obtener resultados óptimos es el siguiente:

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

4.6. Análisis en gel de agarosa

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

4.7. Validación de los resultados

Los datos de muestras de ADN de plantas transgénicas dentro de una única ejecución de PCR y una única PCR Master Mix no serán aceptables a menos que:

- 30 - el control positivo muestre los productos de PCR esperados (amplificación de dianas transgénicas)
- el control de ADN positivo de tipo silvestre muestre el resultado esperado (amplificación de la diana de tipo silvestre).
- el control negativo sea negativo para la amplificación por PCR (sin fragmentos).

Los carriles que muestran cantidades visibles del producto de PCR transgénico del tamaño esperado y que no muestran cantidades visibles del producto de PCR de tipo silvestre, indican que la planta correspondiente a partir de la cual se preparó la plantilla de ADN genómico, es homocigótica para el casete de genes transgénicos.

5 Los carriles que muestran cantidades visibles de los productos de PCR transgénicos y de tipo silvestre de los tamaños esperados, indican que la planta correspondiente a partir de la cual se preparó el ADN genómico plantilla, es hemicigótica para el casete de genes transgénicos. Los carriles que no muestran cantidades visibles del producto de PCR transgénico y que muestran cantidades visibles del producto de PCR de tipo silvestre, indican que la planta correspondiente a partir de la cual se preparó el ADN genómico plantilla, no ha heredado la secuencia transgénica analizada y, por lo tanto, es homocigótica para el locus de tipo silvestre.

10 Los carriles que no muestran cantidades visibles de los productos de PCR transgénicos y de tipo silvestre, indican que la calidad y/o cantidad del ADN genómico no permitió que se generara un producto de PCR. Estas plantas no se pueden puntuar. La preparación del ADN genómico debe repetirse y se debe realizar una nueva ejecución de PCR, con los controles apropiados.

15 **4.8. Uso del protocolo de puntuación de la cigosidad para la identificación del estado de cigosidad en plantas que contienen EE-GM3**

La Figura 3 ilustra el resultado obtenido con la PCR de puntuación de cigosidad para EE-GM3 en varias muestras de plantas de soja. Se encontró que las muestras en los carriles 2 y 5 contenían solo el fragmento de PCR (706 pb) característico del evento élite EE-GM3, mientras que las muestras en los carriles 4, 6 y 7 contenían solo el fragmento característico de la presencia del locus de ts. Los carriles 3, 8 y 9 contenían ambos fragmentos. Los carriles 2 y 5, por lo tanto, contienen EE-GM3 en forma homocigótica, los carriles 3, 8 y 9 contienen EE-GM3 en forma hemicigótica y los carriles 4, 6 y 7 contienen el locus de ts en forma homocigótica (acigoto para EE-GM3). El carril 10 representa la muestra de control negativo (agua) y los carriles 1 y 11 representan el Marcador de Peso Molecular (escalera de 100 pb).

5. Introgresión de EE-GM3 en cultivares preferidos

25 El evento élite EE-GM3 se introduce mediante retrocruzamiento repetido en cultivares de soja comerciales tal como, pero sin limitación, Cultivar de soja 7631014 (US2009252860); Cultivar de soja 7431014 (US2009252859); Cultivar de soja 7925084 (US2009252858); Cultivar de soja 7311153 (US2009252857); Cultivar de soja S070159 (US2009252856); Cultivar de soja 7535357 (US2009246353); Cultivar de soja S070160 (US2009246352); Cultivar de soja 26074414 (US2009249508); Cultivar de soja 7509171 (US2009249507); Cultivar de soja S070158 (US2009246351); Cultivar de soja 7511119 (US2009249506); Cultivar de soja 7113111 (US2009238945); Cultivar de soja S06-02RM018047 (US7592518); Cultivar de soja 7013345 (US2009232957); Cultivar de soja 7041461 (US2009235376); Cultivar de soja 7549450 (US2009232956); Cultivar de soja 7317090 (US2009232955); Cultivar de soja 2N2V58015 (US2009226597); Cultivar de soja 7243182 (US2009226596); Cultivar de soja 7143182 (US2009226595); Cultivar de soja 7043182 (US2009220673); Cultivar de soja S070157 (US2009222950); Cultivar de soja 306924721 (US2009220672); Cultivar de soja 7614385 (US2009220671); Cultivar de soja 7925118 (US2009214750); Cultivar de soja 7821295 (US2009214749); Cultivar de soja 7811336 (US2009214748); Cultivar de soja S070150 (US2009214747); Cultivar de soja 6214260 (US2009214746); Cultivar de soja S070152 (US2009214745); Cultivar de soja 7429331 (US2009214751); Cultivar de soja 26034631 (US2009208634); Cultivar de soja S07-03JR108674 (US7560621); Cultivar de soja S07-03KL016279 (US7560620); Cultivar de soja S06-CL959411 (US7554017); CULTIVAR DE SOJA SG3870NRR (US2009158453); CULTIVAR DE SOJA HFPR-G (CA2645702); Cultivar de soja S06-02JR423016 (US7521606); Cultivar de soja S06-01JR119814 (US7518039); Cultivar de soja S06-01JR119448 (US7518038); Cultivar de soja 6540220 (US2009055960); Cultivar de soja S060292 (US2009055959); Cultivar de soja S050228 (US2009055958); Cultivar de soja S06-02JR423003 (US7491873); Cultivar de soja S06-02JR423005 (US7491872); Cultivar de soja S06-02JR409114 (US7485782);

45 Cultivar de soja S06-SJ144056 (US7473823); Cultivar de soja (US7470835); Cultivar de soja 6910450 (US2008282369); Cultivar de soja 6223012 (US7446246); Cultivar de soja 6549250 (US7446245); Cultivar de soja 17731225 (US2008271204); Cultivar de soja 6928285 (US2008271203); Cultivar de soja 6736054 (US2008271169); Cultivar de soja S060299 (US2008271199); Cultivar de soja S060294 (US2008271202); Cultivar de soja 6943322 (US2008271201); Cultivar de soja 5343260 (US2008263719); Cultivar de soja 6439359 (US2008263704); Cultivar de soja 6238359 (US2008263703); Cultivar de soja 6547272 (US2008263702); Cultivar de soja 6929431 (US2008263701); Cultivar de soja 6703392 (US2008263700); Cultivar de soja 6044483 (US2008263699); Cultivar de soja S050224 (US2008263698); Cultivar de soja 6719022 (US2008263697); Cultivar de soja 5826056 (US2008263696); Cultivar de soja 6265047 (US2008263724); Cultivar de soja 6928331 (US2008263695); Cultivar de soja 6719331 (US2008263694); Cultivar de soja 6636454 (US2008263693); Cultivar de soja 6226454 (US2008263718); Cultivar de soja Q0073801 (US2008256657); Cultivar de soja 6326393 (US2008256652); Cultivar de soja 6408448 (US2008256651); Cultivar de soja 6449315 (US2008250524); Cultivar de soja S060296 (US2008250523); Cultivar de soja 6012078 (US2008250522); Cultivar de soja 6342078 (US2008250521); Cultivar de soja 6419156 (US2008250520); Cultivar de soja 5723264 (US2008250519); Cultivar de soja S050225 (US2008250518); Cultivar de soja S060298 (US2008244783); Cultivar de soja 6935331 (US2008244782); Cultivar

de soja 6819456 (US2008244787); Cultivar de soja S060297 (US2008244781); Cultivar de soja 6135319 (US2008244786); Cultivar de soja 6819331 (US2008244780); Cultivar de soja 6137445 (US2008244779); Cultivar de soja 6917445 (US2008244778); Cultivar de soja 6111333 (US2008244777); Cultivar de soja S050229 (US2008244776); Cultivar de soja 6114011 (US2008244775); Cultivar de soja 6900358 (US2008244784); Cultivar de soja 6345184 (US2008244774); Cultivar de soja 6836085 (US2008244773); Cultivar de soja 6635047 (US2008244772); Cultivar de soja 6139105 (US2008244771); Cultivar de soja 6434385 (US2008244770); CULTIVAR DE SOJA S060295 (US2008244769); Cultivar de soja 6035184 (US2008244768); Cultivar de soja S060293 (US2008209590); Cultivar de soja 6733322 (US2008209594); Cultivar de soja 6421326 (US2008209593); Cultivar de soja S060077 (US2008209589); Cultivar de soja 6600375 (US2008209592); Cultivar de soja S06-CL821457 (US7420104); Cultivar de soja S07-02KG294306 (US7414178); Cultivar de soja S06-BA046119 (US7414175); Cultivar de soja S07-02KG294307 (US7411114); Cultivar de soja SG3865N (US2008189802); Cultivar de soja 6701475 (US7408097); Cultivar de soja 1335025 (US2008178316); Cultivar de soja 1686017 (US2008178315); Cultivar de soja 2388028 (US2008178314); Cultivar de soja 2387029 (US2008178313); Cultivar de soja S06-WW152330 (US7388129); Cultivar de soja 6424090 (US7385118); Cultivar de soja 6723322 (US7385115); Cultivar de soja SG4377NRR (US7385114); Cultivar de soja S06-02JR111334 (US7381864); Cultivar de soja 6141287 (US7378577); Cultivar de soja MT110501 (US7378576); Cultivar de soja (US7378575); Cultivar de soja S06-WW169267 (US7375261); Cultivar de soja 6223392 (US7371939); Cultivar de soja S06-CL968413 (US7371937); Cultivar de soja S06-CL951107 (US7368636); Cultivar de soja S06-MT9152077 (US7361810); Cultivar de soja 4211676 (US2008092253); Cultivar de soja S06-M059029 (US7355101); Cultivar de soja 6548193 (US7345228); Cultivar de soja 6440261 (US7345227); Cultivar de soja S060291 (US7342151); Cultivar de soja S06-MT9206166 (US7339094); Cultivar de soja S06-WW013107 (US7339093); Cultivar de soja S06-M03256 (US7335820); Cultivar de soja 6134466 (US7332656); Cultivar de soja S06-01JR123373 (US7329800); Cultivar de soja S06-MT9211059 (US7326831); Cultivar de soja 26170838 (US2008016590); Cultivar de soja 306612412 (US2008016588); Cultivar de soja 26660135 (US2008016587); Cultivar de soja 306734323 (US2008016586); Cultivar de soja S06-01JR122235 (US7317144); Cultivar de soja 5900450 (US7314986); Cultivar de soja S06-MT116260 (US7314984); Cultivar de soja S06-SJ143606 (US7312381); Cultivar de soja S06-98181-G01-35167 (US7309819); Cultivar de soja 26082635 (US7304219); Cultivar de soja BA922834 (US7304217); Cultivar de soja 01JR123480 (US7304216); Cultivar de soja M061422 (US7304215); Cultivar de soja 17082821 (US2007277262); Cultivar de soja 17621620 (US2007277261); Cultivar de soja 00977706 (US2007277260); Cultivar de soja S060182 (US2007277259); Cultivar de soja 26312034 (US7301078); Cultivar de soja 26143837 (US7301077); Cultivar de soja 435.TCS (US2007271626); Cultivar de soja 495.RC (US2007271625); Cultivar de soja 5306230 (US7297845); Cultivar de soja S06-WW167686 (US7291772); Cultivar de soja 6141145 (US2007245426); Cultivar de soja S050232 (US2007226829); Cultivar de soja 5333301 (US2007226828); CULTIVAR DE SOJA S050215 (US2007226827); Cultivar de soja 3235020 (US2007226826); Cultivar de soja 5720482 (US2007226825); Cultivar de soja S050216 (US2007226824); Cultivar de soja 5512112 (US2007226823); Cultivar de soja 3233021 (US2007226822); Cultivar de soja 1336024 (US2007226821); Cultivar de soja 5348287 (US2007226820); Cultivar de soja 5204220 (US2007226819); Cultivar de soja 6188027 (US2007226818); Cultivar de soja 4183026 (US2007226817); Cultivar de soja S06-WW157958 (US7271325); Cultivar de soja 5733056 (US2007209091); Cultivar de soja 90501911 (US2007209090); Cultivar de soja S050221 (US2007204361); Cultivar de soja 5802205 (US2007204360); Cultivar de soja 1000642 (US2007204359); Cultivar de soja 5420128 (US2007204358); Cultivar de soja S050222 (US2007199094); Cultivar de soja S050217 (US2007199093); CULTIVAR DE SOJA S050223 (US2007199092); Cultivar de soja S050218 (US2007199091); Cultivar de soja 5419227 (US2007199089); Cultivar de soja 5319227 (US2007199088); Cultivar de soja 5723045 (US2007199087); Cultivar de soja 5051007 (US2007199086); Cultivar de soja 5826175 (US2007192893); Cultivar de soja S050231 (US2007192892); Cultivar de soja 5826376 (US2007192891); Cultivar de soja 5628386 (US2007192890); Cultivar de soja 5138236 (US2007186307); Cultivar de soja 5608398 (US2007186306); CULTIVAR DE SOJA S050230 (US2007186305); Cultivar de soja 5624126 (US2007180561); Cultivar de soja 5019225 (US2007180560); Cultivar de soja 5549483 (US2007180559); Cultivar de soja 4189010 (US2007180551); Cultivar de soja 1486018 (US2007180550); CULTIVAR DE SOJA S050235 (US2007180549); Cultivar de soja 5023230 (US2007180548); CULTIVAR DE SOJA S050238 (US2007174930); Cultivar de soja 5830261 (US2007174928); CULTIVAR DE SOJA S050226 (US7247772); Cultivar de soja 5806063 (US7247771); CULTIVAR DE SOJA S050233 (US7244881); Cultivar de soja 5726085 (US7241939); Cultivar de soja MT000792 (US7238867); Cultivar de soja 5521161 (US7235718); Cultivar de soja WW109447 (US7235717); Cultivar de soja BA947474 (US7220898); Cultivar de soja 5939002 (US7217870); Cultivar de soja 5726175 (US7217869); Cultivar de soja 5432082 (US7217868); Cultivar de soja SG0850RR (US7211715); Cultivar de soja SG1750NRR (US7208658); Cultivar de soja MT017827 (US7208657); Cultivar de soja 4N2V74028 (US7205458); Cultivar de soja CL431203 (US7202400); Cultivar de soja 4N0S63222 (US7199288); Cultivar de soja 5520279 (US7196253); Cultivar de soja 5834401 (US7196252); Cultivar de soja 5621161 (US7196251); Cultivar de soja CL722114 (US7196250); Cultivar de soja 5741081 (US7193140); Cultivar de soja CL727422 (US7186895); Cultivar de soja 4N2V55022 (US7183468); Cultivar de soja 5083011 (US7173169); Cultivar de soja 5626085 (US7169976); CULTIVAR DE SOJA S050051 (US7169974); Cultivar de soja 4506816 (US2006294626); Cultivar de soja WW152201 (US7132594); Cultivar de soja CL727636 (US7132593); Cultivar de soja M08851 (US7126047); Cultivar de soja 4324401 (US7105728); Cultivar de soja S050164 (US7105727); Cultivar de soja 4136015 (US2006195931); Cultivar de soja 3133014 (US2006195930); Cultivar de soja S040132 (US2006195929); Cultivar de soja 4328386 (US2006195928); Cultivar de soja 1339013 (US2006195927); Cultivar de soja 4423183 (US2006195925); Cultivar de soja S040131 (US2006195924); Cultivar de soja 4929388 (US2006195923); Cultivar de soja 4817034 (US2006195922); Cultivar de soja 4916816 (US7098385); Cultivar de soja 4713487 (US2006191032); Cultivar de soja 4348019 (US2006191031);

Cultivar de soja S040122 (US2006191030); Cultivar de soja S040133 (US2006185031); Cultivar de soja CL821418 (US7091404); Cultivar de soja 4441080 (US7091403); Cultivar de soja 4805442 (US2006179509); Cultivar de soja 4921237 (US2006179508); Cultivar de soja 4417380 (US2006174369); Cultivar de soja 4405070 (US2006174368); Cultivar de soja 4417779 (US7084328); Cultivar de soja S040125 (US2006168678); Cultivar de soja 4909380 (US7081572); Cultivar de soja S050162 (US7081571); Cultivar de soja 6084016 (US7081570); Cultivar de soja S050163 (US7078600); Cultivar de soja S040135 (US7078598); Cultivar de soja S040117 (US7078597); Cultivar de soja M03393 (US7071391); Cultivar de soja 4145306 (US7064253); Cultivar de soja 900213 (US2006117405); Cultivar de soja 1000126 (US2006117404); Cultivar de soja 901023 (US2006117403); Cultivar de soja S040130 (US7053280); Cultivar de soja 4706198 (US7053279); Cultivar de soja S040118 (US7053278); Cultivar de soja S040119 (US7053277); Cultivar de soja S040123 (US7053276); Cultivar de soja 4442112 (US7049497); Cultivar de soja 917013 (US7045689); Cultivar de soja S040124 (US7045691); Cultivar de soja 4238491 (US7045690); Cultivar de soja S010136 (US7041882); Cultivar de soja 900613 (US7030297); Cultivar de soja 4337175 (US7030301); Cultivar de soja S040121 (US7030300); Cultivar de soja 4216033 (US7030299); Cultivar de soja S040128 (US7022901); Cultivar de soja S040120 (US7022900); Cultivar de soja S040127 (US7019199); Cultivar de soja S040134 (US7015378); Cultivar de soja S040129 (US7015377); Cultivar de soja 4513420 (US7005564); Cultivar de soja 943013 (US2006031958); Cultivar de soja S030136 (US2006021081); Cultivar de soja 927013 (US2006021080); Cultivar de soja 1000109 (US2006015962); Cultivar de soja 90046112 (US2006010530); Cultivar de soja 90897327 (US2006010529); Cultivar de soja 90362421 (US2006010528); Cultivar de soja 03022253 (US2006010527); Cultivar de soja 02022433 (US2006010526); Cultivar de soja 02022323 (US2006010525); Cultivar de soja 02912951 (US2006010524); Cultivar de soja 0102115 (US2006010523); Cultivar de soja 915034 (US2006010522); Cultivar de soja 0509255 (US2006010521); Cultivar de soja 4803070 (US6982368); Cultivar de soja 4704310 (US6979762); Cultivar de soja SJ919784 (US2005268362); Cultivar de soja CL615261 (US2005268361); Nueva soja (US2004199964); Cultivar de soja 0509214 (US2005210542); Cultivar de soja 70826751 (US2005193442); Cultivar de soja 0509243 (US2005193441); Cultivar de soja 0509246 (US2005193440); Cultivar de soja 0509253 (US2005193439); Cultivar de soja 0509247 (US2005193438); Cultivar de soja 0509252 (US2005193437); Cultivar de soja 0509241 (US2005193436); Cultivar de soja 0509249 (US6884927); Cultivar de soja 0509244 (US2005183158); Cultivar de soja 0509240 (US2005183157); Cultivar de soja 0509239 (US2005183156); Cultivar de soja 0509254 (US2005183155); Cultivar de soja 0509245 (US2005183154); Cultivar de soja 0509251 (US2005183153); Cultivar de soja 4283008 (US6888050); Cultivar de soja 2386009 (US2005183152); Cultivar de soja 3282002 (US6870080); Cultivar de soja 0509248 (US2005183151); Cultivar de soja 5091007 (US6906249); Cultivar de soja 0509236 (US2005166281); Cultivar de soja 0509235 (US2005166280); Cultivar de soja 0509237 (US2005166279); Cultivar de soja SG5322NRR (US2005164390); Cultivar de soja SG5030NRR (US2005166278); Cultivar de soja SG4911NRR (US2005166277); Cultivar de soja S030153 (US2005160504); Cultivar de soja S030158 (US2005144680); CULTIVAR DE SOJA S030160 (US2005144679); Cultivar de soja S030161 (US2005144678); Cultivar de soja S030157 (US2005144677); Cultivar de soja S030155 (US2005144676); Cultivar de soja S030156 (US2005144675); CULTIVAR DE SOJA S030159 (US2005144674); Cultivar de soja S030154 (US6900376); Cultivar de soja S020030 (US2005114929); Cultivar de soja S030010 (US2005114928); Cultivar de soja SG1431RR (US2005097629); CULTIVAR DE SOJA SG1330NRR (US2005097642); Cultivar de soja S030150 (US2005071900); CULTIVAR DE SOJA S022209 (US2005050601); Cultivar de soja S022217 (US2005050600); Cultivar de soja S022219 (US2005050599); Cultivar de soja S030151 (US2005050598); Cultivar de soja 0491735 (US2005022272); Cultivar de soja S022218 (US2005022271); Cultivar de soja 6190006 (US2004268447); Cultivar de soja SG1120RR (US2004250316); Cultivar de soja 0487681 (US2004237153); Cultivar de soja 0491717 (US2004237152); Cultivar de soja S02220 (US2004237151); Cultivar de soja 0491715 (US2004237150); Cultivar de soja 0491712 (US2004237149); Cultivar de soja 0491718 (US2004237148); Cultivar de soja 99271316 (US2004221344); Cultivar de soja S022212 (US2004221343); Cultivar de soja 0491737 (US2004221342); Cultivar de soja S022211 (US2004221341); Cultivar de soja S022210 (US2004221340); Cultivar de soja S022213 (US2004221339); Cultivar de soja 0491725 (US2004221346); Cultivar de soja 03129016 (US2004221329); Cultivar de soja S022208 (US2004221328); Cultivar de soja S022207 (US2004221345); Cultivar de soja 02932 (US2004210968); Cultivar de soja 94137321 (US2004205862); Cultivar de soja 94106224 (US2004205861); Cultivar de soja 94143901 (US2004205859); Cultivar de soja 0487685 (US2004205858); Cultivar de soja 92440927 (US2004205857); Cultivar de soja 0487686 (US2004205856); Cultivar de soja S022215 (US2004205855); Cultivar de soja S022214 (US2004205854); Cultivar de soja 0491726 (US2004205849); Cultivar de soja 92478609 (US2004205853); Cultivar de soja 922013 (US6781040); Cultivar de soja 0491727 (US2004205852); Cultivar de soja 0491728 (US2004205851); Cultivar de soja 1465003 (US2004098766); Cultivar de soja 3186004 (US2004019936); Cultivar de soja 7085005 (US2004205850); Cultivar de soja S022204 (US2004199958); Cultivar de soja S022206 (US2004199957); Cultivar de soja 0491731 (US2004199956); Cultivar de soja 0491733 (US2004199955); Cultivar de soja 0491738 (US2004199954); Cultivar de soja 0491732 (US2004199953); Cultivar de soja 0491729 (US2004199952); Cultivar de soja S020011 (US2004199951); Cultivar de soja 0491739 (US2004199950); Cultivar de soja 0491730 (US2004199949); Cultivar de soja 13873 (US2004199948); Cultivar de soja 954011 (US2004181822); Cultivar de soja 010022 (US2004181831); Cultivar de soja 4181001 (US2003229926); Cultivar de soja 0491721 (US2004168228); Cultivar de soja 0491723 (US6911581); Cultivar de soja 0491716 (US2004168226); Cultivar de soja 0491713 (US2004168225); Cultivar de soja 0491711 (US2004168224); Cultivar de soja 0491722 (US2004168223); Cultivar de soja 0491724 (US2004168222); Cultivar de soja 0491720 (US2004168221); Cultivar de soja 0487682 (US2004168220); Cultivar de soja 0491714 (US2004168219); Cultivar de soja 0491719 (US2004168218); Cultivar de soja DP 5634 RR(US2003177540); Cultivar de soja S56-D7 (US2004098765); Cultivar de soja 926877 (US2004064859); Cultivar de soja SE73753

ES 2 712 773 T3

(US2004055059); Cultivar de soja SN83594 (US2004055058); Cultivar de soja SE71112 (US2004055056); Cultivar de soja SE73090 (US2004055054); Cultivar de soja SN79526 (US2004055053); Cultivar de soja SW90702 (US2004055052); Cultivar de soja SN79525 (US2004055051); Cultivar de soja SE90345 (US2004055050); Cultivar de soja 0149928 (US2004055049); Cultivar de soja SN83780 (US2004055048); Cultivar de soja 0053840 (US2004055047); Cultivar de soja 924001 (US2004055046); Cultivar de soja 0004747 (US2004055057); Cultivar de soja 0037357 (US2004055045); Cultivar de soja SN83366 (US2004055044); Cultivar de soja SN76208 (US2004055043); Cultivar de soja 0037370 (US2004055042); Cultivar de soja SX95512 (US2004049821); Cultivar de soja 0096008 (US2004049820); Cultivar de soja SN83544 (US2004049819); Cultivar de soja 0088401 (US2004049818); Cultivar de soja SN64195 (US2004049817); Cultivar de soja 0034754 (US2004049816); Cultivar de soja SN71173 (US2004049815); Cultivar de soja SN83211 (US2004049814); Cultivar de soja 92422749 (US2004045058); Cultivar de soja 0120311 (US2004045057); Cultivar de soja S010344 (US2004003438); Cultivar de soja 70876922 (US2004003437); Cultivar de soja 924496 (US2004003436); Cultivar de soja 19705120 (US2003237116); Cultivar de soja 19704220 (US2003235914); Cultivar de soja S37-N4 (US2003237113); Cultivar de soja 19602310 (US2003233685); Cultivar de soja 19704120 (US2003233684); Cultivar de soja 19704230 (US2003233683); Cultivar de soja 1000126 (US2003233682); Cultivar de soja 93831526 (US2003221226); Cultivar de soja 0322581 (US2003221225); Cultivar de soja 0332149 (US2003213028); Cultivar de soja 0332144 (US2003213027); Cultivar de soja 924788 (US2003213026); Cultivar de soja 924861 (US2003213025); Cultivar de soja 928070 (US2003213024); Cultivar de soja S010354 (US2003213023); Cultivar de soja S010360 (US2003213022); Cultivar de soja S010361 (US2003213021); Cultivar de soja S010363 (US2003213020); Cultivar de soja S010364 (US2003213019); Cultivar de soja 0332148 (US2003208805); Cultivar de soja 0332147 (US2003208804); Cultivar de soja 0332146 (US2003208803); Cultivar de soja 0332135 (US2003208802); Cultivar de soja 1000144 (US2003208801); Cultivar de soja 0332143 (US2003208800); Cultivar de soja 0332145 (US2003208799); Cultivar de soja S010345 (US2003204884); Cultivar de soja 0332131 (US2003204883); Cultivar de soja 0332130 (US2003204882); Cultivar de soja 0332129 (US2003204881); Cultivar de soja 0332122 (US2003204880); Cultivar de soja S010350 (US2003204879); Cultivar de soja S010355 (US2003204878); Cultivar de soja 031766 (US2003204877); Cultivar de soja S010353 (US2003204876); Cultivar de soja 0322580 (US2003200579); Cultivar de soja 0322579 (US2003200578); Cultivar de soja S010347 (US2003200577); Cultivar de soja S010349 (US2003200576); Cultivar de soja 0332141 (US2003200575); Cultivar de soja 0332142 (US2003200574); Cultivar de soja 0332133 (US2003200573); Cultivar de soja 0332134 (US2003200572); Cultivar de soja 0332139 (US2003200571); Cultivar de soja 0332137 (US2003200570); Variedad de soja XB33U08 (US7598435); Variedad de soja XB27D08 (US7592519); Variedad de soja XB41M08 (US7589261); Variedad de soja XB05J08 (US7589260); Variedad de soja XB33T08 (US7589259); Variedad de soja XB30Y08 (US7586025); Variedad de soja XB40U08 (US7582813); Variedad de soja XB29M08 (US7582811); VARIEDAD DE SOJA 93Y10 (US2009144843); VARIEDAD DE SOJA D4325666 (US2009055957); VARIEDAD DE SOJA D4125897 (US2009055956); VARIEDAD DE SOJA D4698573 (US2009055955); VARIEDAD DE SOJA D4356652 (US2009019592); VARIEDAD DE SOJA D4456885 (US2009019591); VARIEDAD DE SOJA D4698013 (US2009019590); VARIEDAD DE SOJA D4637114 (US2009019589); VARIEDAD DE SOJA D4102367 (US2009019595); VARIEDAD DE SOJA D4266582 (US2009019594); VARIEDAD DE SOJA D4422801 (US2009019593); VARIEDAD DE SOJA D4520980 (US2009019588); VARIEDAD DE SOJA D4521369 (US2009019587); VARIEDAD DE SOJA D4223057 (US2009019586); VARIEDAD DE SOJA D4682156 (US2009019585); VARIEDAD DE SOJA D4233569 (US2009019584); VARIEDAD DE SOJA D4925614 (US2009019583); VARIEDAD DE SOJA D4203144 (US2009019604); VARIEDAD DE SOJA D4102536 (US2009019582); VARIEDAD DE SOJA D4865324 (US2009019581); VARIEDAD DE SOJA D4825495 (US2009019580); VARIEDAD DE SOJA D4659251 (US2009019579); VARIEDAD DE SOJA D4258962 (US2009019578); VARIEDAD DE SOJA D4253969 (US2009019577); VARIEDAD DE SOJA D4696658 (US2009019603); VARIEDAD DE SOJA D4256925 (US2009019576); VARIEDAD DE SOJA D4253681 (US2009019575); VARIEDAD DE SOJA D4789254 (US2009019574); VARIEDAD DE SOJA D4713125 (US2009019573); VARIEDAD DE SOJA D4526223 (US2009019572); VARIEDAD DE SOJA D4556201 (US2009019571); VARIEDAD DE SOJA D4012368 (US2009019570); VARIEDAD DE SOJA D4452019 (US2009019569); VARIEDAD DE SOJA D4201483 (US2009019568); VARIEDAD DE SOJA D4463892 (US2009019567); VARIEDAD DE SOJA D4159630 (US2009019566); VARIEDAD DE SOJA D4470236 (US2009019565); VARIEDAD DE SOJA D4063284 (US2009019564); VARIEDAD DE SOJA D4021792 (US2009013429); VARIEDAD DE SOJA D4902530 (US2009013428); VARIEDAD DE SOJA D4367012 (US2009013427); VARIEDAD DE SOJA D4923560 (US2009013426); VARIEDAD DE SOJA D4253854 (US2009013425); VARIEDAD DE SOJA D4210110 (US2009007290); VARIEDAD DE SOJA D4523081 (US2009007289); VARIEDAD DE SOJA D4328762 (US2009007288); VARIEDAD DE SOJA D4483789 (US2009007287); VARIEDAD DE SOJA D4311702 (US2009007286); VARIEDAD DE SOJA D4127789 (US2008313765); VARIEDAD DE SOJA D4361423 (US2008313764); VARIEDAD DE SOJA D4208814 (US2008313763); VARIEDAD DE SOJA D4201139 (US2008313762); VARIEDAD DE SOJA D4120384 (US2008313761); VARIEDAD DE SOJA D4572906 (US2008313760); VARIEDAD DE SOJA D4301279 (US2008313759); VARIEDAD DE SOJA D4422957 (US2008313758); VARIEDAD DE SOJA D4256958 (US2008313757); VARIEDAD DE SOJA 4074328 (US2008282366); VARIEDAD DE SOJA XB47Q06 (US2008244767); VARIEDAD DE SOJA XB26R06 (US2008244766); VARIEDAD DE SOJA 4991629 (US2008216190); VARIEDAD DE SOJA 4158090 (US2008216189); Variedad de soja XB40K07 (US2008209582); VARIEDAD DE SOJA D0069201 (US2008178345); VARIEDAD DE SOJA D0064801 (US2008178320); VARIEDAD DE SOJA D0063801 (US2008178344); VARIEDAD

DE SOJA D0061501 (US2008178343); VARIEDAD DE SOJA 4938051 (US2008178319); VARIEDAD DE SOJA 4880500 (US2008178318); VARIEDAD DE SOJA 4835953 (US2008178317); VARIEDAD DE SOJA 4684181 (US2008178342); VARIEDAD DE SOJA 4427363 (US2008178340); VARIEDAD DE SOJA 4676311 (US2008178339); VARIEDAD DE SOJA 4953710 (US2008178337); VARIEDAD DE SOJA 4857548 (US2008178336); VARIEDAD DE SOJA 4551757 (US2008178335); VARIEDAD DE SOJA 4027271 (US2008178334); VARIEDAD DE SOJA 4274171 (US2008178333); VARIEDAD DE SOJA 0341931 (US2008178332); VARIEDAD DE SOJA 4282159 (US2008178331); VARIEDAD DE SOJA 4852004 (US2008178330); VARIEDAD DE SOJA 4688589 (US2008178329); VARIEDAD DE SOJA 4614131 (US2008178327); VARIEDAD DE SOJA 4201823 (US2008178326); VARIEDAD DE SOJA 92M22 (US2008178350); VARIEDAD DE SOJA 4174206 (US2008178322); VARIEDAD DE SOJA 4305498 (US2008178321); VARIEDAD DE SOJA 4423586 (US2008172761); VARIEDAD DE SOJA 4568207 (US2008172756); VARIEDAD DE SOJA 4840308 (US2008172755); VARIEDAD DE SOJA 4256323 (US2008172754); VARIEDAD DE SOJA 4789516 (US7399907); VARIEDAD DE SOJA 90Y40 (US2008168581); VARIEDAD DE SOJA 4959932 (US7396983); VARIEDAD DE SOJA 4062885 (US7394000); Variedad de soja 4858197 (US7390940); Variedad de soja 4092390 (US7390939); Variedad de soja 4735486 (US7390938); Variedad de soja 4219527 (US7388132); Variedad de soja 4599695 (US7388131); Variedad de soja 4554257 (US7388130); Variedad de soja 4896902 (US7385113); Variedad de soja 4367308 (US7385112); Variedad de soja 4589609 (US7385111); Variedad de soja 4640250 (US7385110); Variedad de soja 4540394 (US7385109); Variedad de soja 4297661 (US7385108); Variedad de soja 4958786 (US7381866); Variedad de soja 4440685 (US7375262); Variedad de soja 4008211 (US7371938); Variedad de soja 4778469 (US7368637); Variedad de soja 4766295 (US7355103); Variedad de soja 4436909 (US7355102); Variedad de soja 4812469 (US7351886); Variedad de soja 4761767 (US7351885); Variedad de soja 4142393 (US7329801); Variedad de soja 4502135 (US7326832); Variedad de soja 4353363 (US7321082); Variedad de soja 91B42 (US7317143); VARIEDAD DE SOJA 0330739 (US2007271622); Variedad de soja 0384279 (US7294768); VARIEDAD DE SOJA 4175567 (US2007256187); VARIEDAD DE SOJA 4336643 (US2007256186); VARIEDAD DE SOJA 4671685 (US2007256185); VARIEDAD DE SOJA 4309194 (US2007256190); VARIEDAD DE SOJA 0330738 (US2007256184); VARIEDAD DE SOJA 0045477 (US2007256183); VARIEDAD DE SOJA 0437973 (US2007256182); VARIEDAD DE SOJA 0457028 (US2007256181); VARIEDAD DE SOJA 0367478 (US2007256180); VARIEDAD DE SOJA 0358232 (US2007256179); VARIEDAD DE SOJA 0417158 (US2007256178); VARIEDAD DE SOJA 4559809 (US2007256177); VARIEDAD DE SOJA 0196172 (US2007256176); VARIEDAD DE SOJA 4785923 (US2007256175); VARIEDAD DE SOJA 4587513 (US2007256174); VARIEDAD DE SOJA 0409670 (US2007256173); VARIEDAD DE SOJA 4010165 (US2007256172); VARIEDAD DE SOJA 0421133 (US2007256171); VARIEDAD DE SOJA 0240187 (US2007256170); VARIEDAD DE SOJA 0387907 (US2007256169); VARIEDAD DE SOJA 0232405 (US2007256168); VARIEDAD DE SOJA 0146529 (US2007256167); VARIEDAD DE SOJA 4788561 (US2007256166); VARIEDAD DE SOJA 457114 (US2007256165); VARIEDAD DE SOJA 0149217 (US2007256164); VARIEDAD DE SOJA 4247825 (US2007254366); VARIEDAD DE SOJA 0212938 (US2007256163); VARIEDAD DE SOJA 0146565 (US2007256162); VARIEDAD DE SOJA 4647672 (US2007256161); VARIEDAD DE SOJA 0215818 (US2007256160); VARIEDAD DE SOJA 0384531 (US2007256159); VARIEDAD DE SOJA 4878185 (US2007254365); VARIEDAD DE SOJA 4498438 (US2007256158); VARIEDAD DE SOJA 0436052 (US2007256157); VARIEDAD DE SOJA 4782157 (US2007256156); VARIEDAD DE SOJA 0385457 (US2007256155); VARIEDAD DE SOJA 0385240 (US2007256154); VARIEDAD DE SOJA 4735316 (US2007256153); VARIEDAD DE SOJA 0277524 (US2007256152); VARIEDAD DE SOJA 0276951 (US2007256151); Variedad de soja XB37L07 (US2007245429); Variedad de soja XB35X07 (US2007226837); Variedad de soja XB35S07 (US2007226836); Variedad de soja XB35F07 (US2007226835); Variedad de soja XB34R07 (US2007226834); Variedad de soja XB34L07 (US2007226833); Variedad de soja XB34D07 (US2007226832); Variedad de soja XB33G07 (US2007226831); Variedad de soja 98Y11 (US2007169220); Variedad de soja 0137335 (US7241941); Variedad de soja XB15E07 (US2007150980); Variedad de soja 92M52 (US2007150979); Variedad de soja XB47R07 (US2007136888); Variedad de soja XB46V07 (US2007136887); Variedad de soja XB57E07 (US2007136886); Variedad de soja XB54X07 (US2007136885); Variedad de soja XB54V07 (US2007136884); Variedad de soja XB52Q07 (US2007136883); Variedad de soja XB37M07 (US2007136882); Variedad de soja XB37J07 (US2007136881); Variedad de soja XB34Q07 (US2007136880); Variedad de soja XB32S07 (US2007136879); Variedad de soja XB32J07 (US2007136878); Variedad de soja XB31R07 (US2007136877); Variedad de soja XB31J07 (US2007136876); Variedad de soja XB29K07 (US2007136875); Variedad de soja XB31H07 (US2007136874); Variedad de soja XB30G07 (US2007136873); Variedad de soja XB30E07 (US2007136872); Variedad de soja XB25E07 (US2007136871); Variedad de soja XB26X07 (US2007136870); Variedad de soja XB23L07 (US2007136869); Variedad de soja XB19Z07 (US2007136868); Variedad de soja XB19E07 (US2007136867); Variedad de soja XB18M07 (US2007136866); Variedad de soja XB18K07 (US2007136865); Variedad de soja XB18J07 (US2007136864); Variedad de soja XB17W07 (US2007136863); Variedad de soja XB17U07 (US2007136862); Variedad de soja XB15B07 (US2007136861); Variedad de soja XB12R07 (US2007136860); Variedad de soja XB11J07 (US2007136859); Variedad de soja XB04E07 (US2007136858); Variedad de soja XB02K07 (US2007136857); Variedad de soja XB49V07 (US2007136856); Variedad de soja XB48X07 (US2007136855); Variedad de soja 92M75 (US2007136854); Variedad de soja XB48W07 (US2007136853); Variedad de soja XB44G07 (US2007136852); Variedad de soja XB42K07 (US2007136851); Variedad de soja XB42H07 (US2007136850); Variedad de soja XB41J07 (US2007136849); Variedad de soja XB40Y07 (US2007136848); Variedad de soja XB40X07 (US2007136847); Variedad de soja XB39E07 (US2007136846); Variedad de soja XB38W07 (US2007136845);

Variedad de soja XB38S07 (US2007136844); Variedad de soja XB23V07 (US2007136843); Variedad de soja
 XB31M07 (US2007130652); Variedad de soja XB28E07 (US2007130651); Variedad de soja XB25S07
 (US2007130650); Variedad de soja XB21N07 (US2007130649); Variedad de soja XB03Q07 (US2007130648);
 5 Variedad de soja XB49Q07 (US2007130647); Variedad de soja XB06M07 (US2007130646); Variedad de soja S04-
 97130-15-02 (US7196249); Variedad de soja S04-97026-N99-42648-01 (US7189896); Variedad de soja S05-97016-
 G99-21212 (US7186894); Variedad de soja S05-99048-19 (US7164064); Variedad de soja 92B14 (US7161065);
 Variedad de soja 98R31 (US2007006350); Variedad de soja S05-97177-N00-22972 (US7132592); Variedad de soja
 XB25G06 (US2006225160); Variedad de soja 91M70 (US2006174381); Variedad de soja XB24R06
 10 (US2006162029); Variedad de soja S03-95368-N98-52902 (US7078594); Variedad de soja S05-97130-51
 (US7078599); Variedad de soja XB11L06 (US2006130187); Variedad de soja 94B13 (US7064251); Variedad de soja
 94B74 (US7064250); Variedad de soja XB27J06 (US2006112462); Variedad de soja XB29N06 (US2006112460);
 Variedad de soja XB28T06 (US2006112459); Variedad de soja XB16W06 (US2006112458); Variedad de soja
 XB18C06 (US2006112456); Variedad de soja XB 10M06 (US2006107391); Variedad de soja XB06K06
 (US2006107390); Variedad de soja XB28V06 (US2006107389); Variedad de soja XB004A06 (US2006107388);
 15 Variedad de soja XB12L06 (US2006107387); Variedad de soja XB005A06 (US2006107386); Variedad de soja
 XB25H06 (US2006107385); Variedad de soja XB39W06 (US2006107384); Variedad de soja XB27K06
 (US2006107383); Variedad de soja XB29R06 (US2006107382); Variedad de soja XB16S06 (US2006107381);
 Variedad de soja XB36V06 (US2006107380); Variedad de soja XB07N06 (US2006107379); Variedad de soja
 XB23H06 (US2006107378); Variedad de soja XB35C06 (US2006107377); Variedad de soja XB32L06
 20 (US2006107376); Variedad de soja XB58P06 (US2006107375); Variedad de soja XB36M06 (US2006107374);
 Variedad de soja XB22G06 (US2006107373); Variedad de soja XB36Q06 (US2006107372); Variedad de soja 91M61
 (US2006107371); Variedad de soja XB32A06 (US2006107370); Variedad de soja XB19V06 (US2006107369);
 Variedad de soja XB43C06 (US2006107368); Variedad de soja XB22N06 (US2006107367); Variedad de soja
 XB38E06 (US2006107366); Variedad de soja XB37U06 (US2006107365); Variedad de soja XB37Q06
 25 (US2006107364); Variedad de soja XB00D06 (US2006107363); Variedad de soja XB14N06 (US2006107362);
 Variedad de soja XB31H06 (US2006107361); Variedad de soja XB21Z06 (US2006107360); Variedad de soja
 XB005B06 (US2006107359); Variedad de soja XB15W06 (US2006107358); Variedad de soja XB33N06
 (US2006107357); Variedad de soja XB18W06 (US2006107356); Variedad de soja XB32M06 (US2006107355);
 Variedad de soja XB19F06 (US2006107354); Variedad de soja S03-95021-55-138-AB (US7026531); Variedad de
 30 soja 94M41 (US7002061); Variedad de soja 91M50 (US6998518); Variedad de soja 92B13 (US6989475); Variedad
 de soja 93B68 (US6989474); Variedad de soja 93B09 (US6979759); Variedad de soja 92M00 (US6972352);
 Variedad de soja XB08P05 (US2005120433); Variedad de soja XB26V05 (US2005150023); Variedad de soja
 XB21R05 (US2005108795); Variedad de soja XB28E05 (US2005114942); Variedad de soja XB58K05
 (US2005114941); Variedad de soja XB27B05 (US2005114940); Variedad de soja XB21S05 (US2005150022);
 35 Variedad de soja XB26U05 (US2005138695); Variedad de soja XB35K05 (US2005150021); Variedad de soja
 XB18S05 (US2005120436); Variedad de soja XB25C05 (US2005120435); Variedad de soja 90M01
 (US2005120434); Variedad de soja XB22H05 (US2005150020); Variedad de soja XB22K05 (US2005114939);
 Variedad de soja XB58G05 (US2005114938); Variedad de soja XB57U05 (US2005120432); Variedad de soja
 XB49M05 (US2005120431); Variedad de soja XB20D05 (US2005144683); Variedad de soja XB41B05
 40 (US2005150019); Variedad de soja XB38T05 (US2005120430); Variedad de soja XB13T05 (US2005120429);
 Variedad de soja XB19Y05 (US2005120428); Variedad de soja XB43D05 (US2005120427); Variedad de soja
 XB40E05 (US2005120426); Variedad de soja XB39N05 (US2005120425); Variedad de soja 93M01
 (US2005120424); VARIEDAD DE SOJA XB31W05 (US2005223439); Variedad de soja XB32C05 (US2005114937);
 Variedad de soja XB40D05 (US2005120423); Variedad de soja 92M61 (US2005120422); Variedad de soja 91M91
 45 (US2005114936); Variedad de soja XB33Y05 (US2005120421); Variedad de soja XB34A05 (US2005120420);
 Variedad de soja XB13U05 (US2005114935); Variedad de soja XB12K05 (US2005114934); Variedad de soja
 XB30P05 (US2005120419); Variedad de soja XB57T05 (US2005114933); Variedad de soja XB17S05
 (US2005114932); Variedad de soja XB25Y05 (US2005114930); Variedad de soja XB25S05 (US2005150017);
 Variedad de soja XB43W04 (US2004177420); Variedad de soja XB44W04 (US2004177419); Variedad de soja
 50 XB53J04 (US2004199960); Variedad de soja XB43V04 (US2004216192); Variedad de soja XB49K04
 (US2004172668); Variedad de soja XB27P04 (US2004205864); Variedad de soja XB29L04 (US2004177418);
 Variedad de soja XB29K04 (US2004177417); Variedad de soja XB41U04 (US2004231017); Variedad de soja
 XB34D04 (US2004177416); Variedad de soja XB09J04 (US2004172711); Variedad de soja XB32Y04
 (US2004194169); Variedad de soja XB44D04 (US2004172710); Variedad de soja XB44C04 (US2004172709);
 55 Variedad de soja XB10L04 (US2004172708); Variedad de soja XB19U04 (US2004172707); Variedad de soja
 XB02F04 (US2004172706); Variedad de soja XB25X04 (US2004172705); Variedad de soja XB26L04
 (US2004172704); Variedad de soja XB11F04 (US2004172703); Variedad de soja XB40Z04 (US2004177415);
 Variedad de soja XB40Y04 (US2004181833); Variedad de soja XB007C04 (US2004181832); Variedad de soja
 96M20 (US2004172702); Variedad de soja XB39J04 (US2004172701); Variedad de soja XB29A04 (US2004172700);
 60 Variedad de soja XB35P04 (US2004172699); Variedad de soja XB58Z04 (US2004177414); Variedad de soja
 XB43R04 (US2004172698); Variedad de soja XB35L04 (US2004172697); Variedad de soja XB06H04
 (US2004172696); Variedad de soja XB59U04 (US2004172695); Variedad de soja XB64C04 (US2004172694);
 Variedad de soja 95M80 (US2004172693); Variedad de soja XB35Q04 (US2004177413); Variedad de soja XB04D04
 (US2004177412); Variedad de soja XB08L04 (US2004177411); Variedad de soja XB18Q04 (US2004177410);
 65 Variedad de soja XB16Q04 (US2004177409); Variedad de soja XB55K04 (US2004172692); Variedad de soja
 XB57M04 (US2004172691); Variedad de soja XB25L04 (US2004205863); Variedad de soja XB48T04

(US2004194168); Variedad de soja XB42X04 (US2004199959); Variedad de soja XB31T04 (US2004177408); Variedad de soja XB31U04 (US2004194167); Variedad de soja XB30E04 (US2004177407); Variedad de soja XB31R04 (US2004177406); Variedad de soja S03-95341-A98-60618 (US6909033); Variedad de soja SN97-6946 (US2004168227); Variedad de soja 94M70 (US6864408); Variedad de soja 92M70 (US6797866); Variedad de soja 5 92M71 (US6858782); Variedad de soja 91M40 (US6828490); Variedad de soja 93M80 (US6849789); Variedad de soja XB39N03 (US6864407); Variedad de soja 93M90 (US6846975); Variedad de soja 90M90 (US6852913); Variedad de soja 92M72 (US6960708); Variedad de soja 91M90 (US6849788); Variedad de soja 92M50 (US6855876); Variedad de soja 92M30 (US6951974); Variedad de soja 93M60 (US6797865); Variedad de soja 93M40 (US6791016); Variedad de soja 93M41 (US6835875); Variedad de soja XB15P03 (US6797864); Variedad de 10 soja XB24H03 (US6936752); Variedad de soja XB05A03 (US6815585); Variedad de soja 92M80 (US6849787); Variedad de soja XB33S03 (US6855875); Variedad de soja XB48P03 (US6797863); Variedad de soja XB29X03 (US6806406); Variedad de soja XB02C03 (US6800795); Variedad de soja XB29W03 (US6858781); Variedad de soja 91M10 (US6958437); Variedad de soja 92M10 (US6916975); Variedad de soja XB10G03 (US6806405); Variedad de soja 92M31 (US6846974); Variedad de soja XB38D03 (US6806404); Variedad de soja XB34N03 (US6803508); 15 Variedad de soja XB30W03 (US6809236); Variedad de soja XB37J03 (US6844488); Variedad de soja SE72581 (US2004148665); Variedad de soja SE90076 (US2004148664); Variedad de soja SD82997 (US2004148663); Variedad de soja 0037393 (US2004148662); Variedad de soja 0088414 (US2004148661); Variedad de soja 0149926 (US2004148660); Variedad de soja 0037209 (US2004148659); Variedad de soja 93B36 (US6833498); Variedad de soja 90B74 (US6812384); Variedad de soja 90B51 (US6818809); Variedad de soja 91B03 (US6815584); Variedad de 20 soja 95B43 (US6818808); Variedad de soja 95B42 (US6815583); Variedad de soja 92B47 (US6812383); Variedad de soja SE90346 (US2004055055); Variedad de soja 0007583 (US2004010824); Variedad de soja 0008079 (US2004010823); Variedad de soja S02-AP98041-2-333-01 (US2003121076); Variedad de soja S02-98041-2-251-01 (US2003182694); Variedad de soja S02-AP98041-2-262-02 (US2003196220); Variedad de soja S02-95021-55-240-BA (US2003188348); Variedad de soja APA94-31572 (US2003061641); Variedad de soja 25 AP98041-1-203 (US2003056251); Variedad de soja APA95-15294 (US2003061640); Variedad de soja AP98041-4-117 (US2003056250); Variedad de soja 91B33 (US6580018); Variedad de soja 93B85 (US6605762); Variedad de soja 92B76 (US6610911); Variedad de soja 92B38 (US6605761); Variedad de soja 94B24 (US6613967); Variedad de soja 94B73 (US6605760); Variedad de soja 93B86 (US6610910); Variedad de soja 91B12 (US6583343); Variedad de soja 95B34 (US6605759); Variedad de soja 94B23 (US6605758); Variedad de soja 90B11 30 (US6583342); Variedad de soja 91B92 (US6586659); Variedad de soja 95B96 (US6605757); Variedad de soja 93B72 (US6566589); Variedad de soja 95B97 (US6613966); Variedad de soja 92B95 (US6608243); Variedad de soja 93B47 (US6583341); Variedad de soja 97B52 (US6605756); Variedad de soja 93B15 (US6617499); Variedad de soja 94B54 (US6613965); Variedad de soja 93B67 (US6573433); Variedad de soja 93B87 (US6727410); Variedad de soja 96B51 (US6613964); Variedad de soja 92B84 (US6730829); Variedad de soja 92B12 35 (US6605755); Variedad de soja 90A07 (US6320105); Variedad de soja 93B26 (US6342659); Variedad de soja 96B21 (US6369301); Variedad de soja 92B63 (US6326529); Variedad de soja 93B46 (US6323402); Variedad de soja 92B75 (US6362400); Variedad de soja 93B08 (US6323401); Variedad de soja 97B62 (US6323400); Variedad de soja 92B37 (US6323399); Variedad de soja 92B56 (US6339186); Variedad de soja 93B66 (US6307131); Variedad de soja 92B62 (US6346657); Variedad de soja 92B36 (US6369300); Variedad de soja 90B73 40 (US6316700); Variedad de soja 95B95 (US6323398); Variedad de soja 93B65 (US6229074); Variedad de soja 92B24 (US6284950); Variedad de soja 94B53 (US6235976); Variedad de soja 94B22 (US6140557); Variedad de soja 93B84 (US6143956); Variedad de soja 95B32 (US6229073); Variedad de soja 95B53 (US6147283); Variedad de soja 93B35 (US6153816); Variedad de soja 93B07 (US6143955); Variedad de soja 92B74 (US6124526); Variedad de soja 92B35 (US6166296); Variedad de soja 94B45 (US6162968); Variedad de soja 96B01 45 (US6143954); Variedad de soja 93B53 (US6335197).

Se observa que la introgresión del evento élite en estos cultivares no influye significativamente en ninguna de las características fenotípicas o agronómicas deseables de estos cultivares (sin arrastre de rendimiento), mientras que la expresión del transgén, según lo determinado por la tolerancia al glifosato y/o isoxaflutol, cumple niveles comercialmente aceptables. Esto confirma el estado del evento EE-GM3 como un evento élite.

50 El evento élite EE-GM3 se puede combinar ventajosamente con uno o más de los otros eventos de soja disponibles en el mercado, incluidos, pero sin limitación, otros eventos de tolerancia a herbicidas, tal como los eventos descritos en las peticiones del USDA-APHIS: 09-349-01p, 09-201-01p, 09-183-01p, 09-082-01p, 09-015-01p, 06-354-01p, 06-271-01p, 06-178-01p, 98-238-01p, 98-014-01p, 97-008-01p, 96-068-01p, 95-335-01p, 93-258-01p (véase, por ejemplo, www.aphis.usda.gov/brs/not_reg.html), o el evento MON89788 (tolerancia al Glifosato) descrito en el 55 documento US 2006-282915, evento DP-305423-1 (Alta tolerancia al ácido oleico/inhibidor de ALS) descrito en el documento WO 2008/054747, eventos A2704-12 y A5547-127 (tolerancia al Glufosinato) descritos respectivamente en los documentos WO 2006/108674 o WO 2006/108675, MON87701 descrito en el documento US2009130071, evento 3560.4.3.5 descrito en el documento US2009036308, evento DP-305423-1 descrito en el documento US2008312082, o evento BPS-CV127-9 (Evento 127) del documento WO 2010/080829.

60 Tal como se utiliza en las reivindicaciones a continuación, a menos que se indique claramente lo contrario, el término "planta" pretende abarcar tejidos vegetales, en cualquier etapa de madurez, así como cualquier célula, tejido u órgano extraído de o derivado de cualquiera de dichas plantas, incluyendo sin limitación, cualquier semilla, hoja,

tallo, flor, raíz, célula individual, gameto, cultivo celular, cultivo de tejido o protoplasto.

La semilla de referencia que comprende el evento élite EE-GM3 se depositó como 32-RRMM-0531 en el NCIMB (Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen AB9YA, Escocia) el 12 de octubre de 2009, con el número de acceso de NCIMB, NCIMB 41659 y se confirmó la viabilidad de la misma. Los nombres alternativos para EE-GM3 son evento FG-072 o evento MST-FGØ72-3.

Los expertos en la materia pueden producir varios cambios o modificaciones en las realizaciones descritas. Estos pueden hacerse sin apartarse del espíritu o alcance de la invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 10 <110> Bayer Bioscience N.V.
M.S Technologies LLP
MASON Justin Thomas
LETTOW Leslie James
EBY Mark Alan
EBY William H.
- 15 WELZ Gunter
VERHAEGHE Steven
DE BEUCKELEER Marc
HABEX veerle
FERRULO Jean-Marc
- 20 <120> Evento Élite EE-GM3 y métodos y kits para identificar dicho evento en muestras biológicas
- <130> BCS 09-2009
- <140> tba
<141> 23/11/2010
- 25 <150> 09014564,0
<151> 23/11/2009
- <150> 61/263.690
<151> 23/11/2009
- <150> 61/367.227
<151> 23/07/2010
- 30 <160> 13
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
<211> 7296
<212> ADN
35 <213> Artificial
- <220>
<223> Fragmento Sall del vector pSF10
- <220>
<221> terminador
40 <222> (188)..(479)
<223> 3' nos: secuencia que incluye la región 3' no traducida del gen de la nopalina sintasa del ADN-T de pTiT37 de Agrobacterium tumefaciens -complemento
- <220>
45 <221> misc_feature
<222> (480)..(1556)
<223> hppdPf W336: la secuencia codificante de la 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa de Pseudomonas fluorescens cepa A32 modificada por la sustitución del aminoácido Glicina 336 con un Triptófano -

ES 2 712 773 T3

complemento

- 5 <220>
 <221> péptido de tránsito
 <222> (1557)..(1928)
 <223> TPotp Y: secuencia codificante de un derivado peptídico de tránsito optimizado (la posición 55 cambiada a Tirosina), que contiene la secuencia de los genes de subunidad pequeña RuBisCO de Zea mays (maíz) y Helianthus annuus (girasol)-complemento
- 10 <220>
 <221> 5' UTR
 <222> (1929)..(2069)
 <223> 5'tev: secuencia que incluye la secuencia líder del virus del grabado del tabaco - complemento
- 15 <220>
 <221> promotor
 <222> (2070)..(3359)
 <223> Ph4a748 ABBC: secuencia que incluye la región promotora del gen de la histona H4 de Arabidopsis thaliana, que contiene una duplicación interna - complemento
- 20 <220>
 <221> promotor
 <222> (3360)..(4374)
 <223> Ph4a748: secuencia que incluye la región promotora del gen de la histona H4 de Arabidopsis thaliana
- 25 <220>
 <221> Intrón
 <222> (4375)..(4855)
 <223> intrón1 h3At: primer intrón del gen II de la histona H3.III variante de Arabidopsis thaliana
- 30 <220>
 <221> péptido de tránsito
 <222> (4856)..(5227)
 <223> TPotp C: secuencia codificante del péptido de tránsito optimizado, que contiene la secuencia de los genes de subunidad pequeña RuBisCO de Zea mays (maíz) y Helianthus annuus (girasol)
- 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5228)..(6565)
 <223> 2mepsps: la secuencia codificante del gen de la 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato sintetasa mutante doble de Zea mays (maíz) (Lebrun et al., 1997)
- 40 <220>
 <221> terminador
 <222> (6566)..(7252)
 <223> 3' histonAt: secuencia que incluye la región 3' no traducida del gen de la histona H4 de Arabidopsis thaliana (Chaboué et al., 1987)
- <400> 1

```

gtcgactcta gcagatctgg ccggcccacc ggtgggcat atgggcccgc ggccgcgaat      60
tcgagctcgg tacctacctg gcgaaagggg gatgtgctgc aaggcgatta agttgggtaa      120
cgccagggtt ttcccagtca cgacgttgta aaacgacggc cagtgaattg cggccgcaat      180
tcccgatcta gtaacataga tgacaccgcg cgcgataatt taccctagtt tgcgcgctat      240
atTTTgTTTT ctatcgcgta ttaaatgtat aattgcgggg ctctaatacat aaaaacccat      300
ctcataaata acgtcatgca ttacatgtta attattacat gcttaacgta attcaacaga      360
aattatatga taatcatcgc aagaccggca acaggattca atcttaagaa actttattgc      420
  
```

ES 2 712 773 T3

caaatgtttg aacgatcggg gaaattcgtc gagtcaccct cggccgggct ttttgacgct 480
 taatcggcgg tcaatacacc acgacgcacc tggtcacggt cgatggactc gaacagcgcc 540
 ttgaagttcc actcgccaaa cccatcgtcg cccttgcgct ggatgaattc gaagaacacc 600
 gggcccatca gggtttccga gaagatctgc agcagcaggc gtttgtcgcc ttccacggaa 660
 gatccgtcca gcaggatacc gcgtgcctgc agttgatcca ccggctcgcc gtggtcaggc 720
 aggcggcctt cgagcatttc gtaataagtg tctggcggcg cggtcatgaa gcgcatgccg 780
 attttcttca acgctgcccc ggtcttgacc aggtcgtcgg tgaggaacgc cacgtgctgg 840
 atgccttcgc cgttgaactg catcaggaac tcttcgatct gccccgcgcc cttggacgac 900
 tcttcgttca gcgggatgcg gatcatgccg tccggcgcac tcatggcctt ggaagtcagg 960
 ccggtgtact cgcccttgat atcgaagtaa cgcgcttcac ggaagttgaa caatttctcg 1020
 tagaagttgg cccagtagac catgcggccg cgatagacgt tgtgggtcag gtggtcgatg 1080
 actttgagac ctgcaccgac cggattgcbc tccacacctt cgaggtagac gaagtcgatg 1140
 tcgtagatcg agctgccttc gccgaaacgg tcgatcaggt acaacggcgc gccgccgatg 1200
 cccttgatcg ccggcagggt caattccatc ggccccggtgt caatatggat cggctgggcb 1260
 ccgagttcca gggcgcgggt gtaggccttt tgcgagtcct tcacgcggaa cgccatgccg 1320
 cacaccgacg ggccgtgttc ggccgcaaag taggaggcga tgctgttggg ctctgttgtg 1380
 aggatcagggt tgatctcgcc ctggcggtag aggtgcacgt tcttggaaac gtgggtcgcg 1440
 actttggtga agcccatgat ctcgaagatc ggctccaggg taccggcggt cggcgacgcg 1500
 aattcgatga attcaaagcc catcaggccc attgggtttt cgtatagatc tgccatgcac 1560
 cggatccttc cgccgttgct gacgttgccg aggttcttgg aggagcggcg ggcgacgggg 1620
 aggctggcgg tggacttgag cccctggaac ggagcgacgg cggtggccga cgaggccatc 1680
 atcacggtgg gcgccataga cagcggcggc aggtacgaca gcgtctcgaa cttcttgttg 1740
 ccgtaggccg gccacacctg catatattga actcttccac cgttgctggg aagggtggag 1800
 aagtcgttag ctttcttggg ggtggggaag gcggcgttgg acttaaggcc ggtgaacgga 1860
 gccaccatgt tggcctgagc aggggcggtc cggctaacgg tcgcgactga ggaggagatc 1920
 gaagccatgg ctatcgttcg taaatggtga aaattttcag aaaattgctt ttgctttaa 1980
 agaaatgatt taaattgctg caatagaagt agaatgcttg attgcttgag attcgtttgt 2040
 tttgtatatg ttgtgtttcg aattctagag tcgagagaaa ttgatgtctg tagaagaaga 2100
 agaacggtta agagtagatt tgggtgagaa agatgtgaaa ttgtttttat aggcaaagac 2160
 ggagagtcta ttttttgagc aatcagatcg catatataat ctaacggctg agatatcgat 2220
 ccgtgtgtac aataaaatga tgtataaacc gtcgatctgt tttaatcgac ggttcatatt 2280

ES 2 712 773 T3

agtgatccgc gtgatggcag tgatagccac taagaatcgt cttttgtttt acatgtggcg 2340
 ccacaaatta gggtaatgaa gcggaatat tttggaactc ggaaaataaa attgcgccat 2400
 cacattatth gaaaatthtc acatgcttht atthtaaaaa cccacgaatt acaagttaca 2460
 accgaaaaag atthtataata tagtgattta tactaaththt gtagtagctt aatgtatatt 2520
 gatactggaa aaacaatgac aatcatagca tccgtgtgta caataaatg atgtataaac 2580
 cgtcgatctg ththtaatcga cggthcatat tagtgatccg cgtgatggca gtgatagcca 2640
 ctaagaatcg ththththttht tacatgtggc gccacaaatt agggtaatga agcggcaata 2700
 thththggaact cggaaaaataa aattgcgcca tcacattatt tgaaaaththt cacatgcttht 2760
 thththtaaaa acccacgaat tacaagttac aaccgaaaaa gatttataat atagtgattt 2820
 atactaaththt tgtagtagct taatgtatat tgatactgga aaaacaatga caatcatatg 2880
 ttagtattat caagttatcg tattgatatt gatattggaa catacaatgg gtattgcctt 2940
 cththcgacca thaaatatcac caaaththtaca aagththtgt ataccaagtt atcaattgta 3000
 aatgggatgt caacaththt thththcccttht gagaaactat agaccacaag aacacacttc 3060
 aatagataaa gtaactaththt acataagagg thththaaaatc acattaacaa aaataattac 3120
 caaccggcac tcacaaatac aaacagagca cacgacatgt caaagccaca agtaaattcg 3180
 ttgagtgggtg gththtcattac aattgtgtca cththcgacac aaactatctt gctctgggaa 3240
 tcatctcagc atcaaagatc atgctcactt caggggaact tagtgatcc atgcctcgac 3300
 tcataththtct cctcgacctg caggcatgca agctctagag cggccgccac cgcggtggag 3360
 gtactcgagt cgcgacgtac gththcgaacaa thggthththta aagcttgcat gcctgcaggt 3420
 cgaggagaaa tatgagtcga ggcattggata cactaagtht ccctgaagtg agcatgatct 3480
 thgatgctga gatgattccc agagcaagat agththtgtgct gcaagtgaca caattgtaat 3540
 gaaaccacca ctcaacgaat thactthtggg cththtgacatg tcgtgtgctc thththgtatt 3600
 thtgagtgcc gththtggtaat ththththttht aatgtgattt thaaacctct tatgthaaata 3660
 gththactthtct ctattgaggt gththtcttht gththtctatagtt thctcaaagg gaaaththtaaa 3720
 thththgacatc ccaththtaca ththgataactt gththtatacaca aactththgthaa atththggthgat 3780
 atththtggthc gaaagaaggc aataccctatt gththtattgthcca ataththcaatath caaththacgata 3840
 actththgataat actaaththctat gaththtgcatt gthththththccag ththcaaththata caththtaagct 3900
 ctacaaaatht agththataatc actaththattat aaaththctththth cggththgthaac ththgthaaattcg 3960
 thggththththta aaaththaaagc atththgthaaath thththcaaththaa ththtgatggcg caathththtatt 4020
 ththccgagtht caaaaththattg ccgththctatt accctaththth gththggcgccac atththgthaaacaa 4080
 aaagacgath ctthtagthggct atcactgcca ththcagcgghat cactaththaatg aaccgthctgat 4140
 thaaacagath cgacgththta ththctaththt thththgtacac acgghatcgath atctcagccg 4200

ES 2 712 773 T3

ttagatttaa tatgcgatct gattgctcaa aaaatagact ctccgtcttt gcctataaaa 4260
 acaatttcac atctttctca cccaaatcta ctcttaaccg ttctttcttct tctacagaca 4320
 tcaatttctc tcgactctag aggatccaag cttatcgatt tcgaaccctt caggcgaaga 4380
 acaggatga tttgtttgta attagatcag gggtttaggt ctttccatta ctttttaatg 4440
 ttttttctgt tactgtctcc gcgatctgat tttacgacaa tagagtttcg ggttttgtcc 4500
 cattccagtt tgaaaataaa ggtccgtctt ttaagtttgc tggatcgata aacctgtgaa 4560
 gattgagtct agtcgattta ttggatgatc cattcttcat cgtttttttc ttgcttcgaa 4620
 gttctgtata accagatttg tctgtgtgcg attgtcatta cctagccgtg tatcgagaac 4680
 tagggttttc gagtcaattt tgcccctttt gggtatatct ggttcgataa cgattcatct 4740
 ggattagggg ttttaagtgg gacgttttagt attccaattt cttcaaaatt tagttatgga 4800
 taatgaaaat cccaattga ctgttcaatt tcttgttaaa tgcgcagatc cccatggctt 4860
 cgatctctc ctgagtcgcy accgttagcc ggaccgcccc tgctcaggcc aacatgggtg 4920
 ctccgttcac cggccttaag tccaacgccg ctttccccac caccaagaag gctaacgact 4980
 tctccaccct tcccagcaac ggtggaagag ttcaatgtat gcagggtggy ccggcctacg 5040
 gcaacaagaa gttcgagacy ctgtcgtacc tgccgcccgt gtctatggcy cccaccgtga 5100
 tgatggcctc gtcggccacc gccgtcgtc cgttccaggg gctcaagtcc accgccagcc 5160
 tccccgtcgc ccgccgtcc tccagaagcc tcggcaacgt cagcaacggc ggaaggatcc 5220
 ggtgcatggc cggcgccgag gagatcgtc tgcaagccat caaggagatc tccggcaccg 5280
 tcaagctgcc ggggtccaag tcgctttcca accggatcct cctactcgc gccctgtccg 5340
 aggggacaac agtggttgat aacctgctga acagtgagga tgtccactac atgctcgggg 5400
 ccttgaggac tcttggctc tctgtcgaag cggacaaagc tgccaaaaga gctgtagttg 5460
 ttggctgtgg tggaaagttc ccagttgagg atgctaaaga ggaagtgcag ctcttcttgg 5520
 ggaatgctgg aatcgcaatg cggtccttga cagcagctgt tactgctgct ggtggaaatg 5580
 caacttacgt gcttgatgga gtaccaagaa tgagggagag acccattggc gacttggtg 5640
 tcggattgaa gcagcttggg gcagatgttg attgtttcct tggcactgac tgcccacctg 5700
 ttcgtgtcaa tggaaatcga gggctacctg gtggcaaggt caagctgtct ggctccatca 5760
 gcagtcagta cttgagtgcc ttgctgatgg ctgctccttt ggctcttggg gatgtggaga 5820
 ttgaaatcat tgataaatta atctccattc cgtacgtcga aatgacattg agattgatgg 5880
 agcgttttgg tgtgaaagca gagcattctg atagctggga cagattctac attaagggag 5940
 gtcaaaaata caagtcccct aaaaatgcct atgttgaagg tgatgcctca agcgcaagct 6000
 atttcttggc tgggtctgca attactggag ggactgtgac tgtggaaggt tgtggcacca 6060

ES 2 712 773 T3

ccagtttgca gggatgatgtg aagtttgctg aggtactgga gatgatggga gcgaaggtta 6120
 catggaccga gactagcgta actgttactg gccaccgcg ggagccattt gggaggaaac 6180
 acctcaaggc gattgatgtc aacatgaaca agatgcctga tgctgccatg actcttgctg 6240
 tggttgccct ctttgccgat ggcccgcag ccatcagaga cgtggcttcc tggagagtaa 6300
 aggagaccga gaggatgggt gcgatccgga cggagctaac caagctggga gcatctgttg 6360
 aggaagggcc ggactactgc atcatcacgc cgccggagaa gctgaacgtg acggcgatcg 6420
 acacgtacga cgaccacagg atggcgatgg ctttctccct tgccgcctgt gccgaggtcc 6480
 ccgtcaccat ccgggaccct gggatgcacc ggaagacctt ccccgactac ttcgatgtgc 6540
 tgagcacttt cgtcaagaat taagctctag aactagtgga tccccgatc cgcgtttggt 6600
 ttttctgggt ttctcactta agcgtctgcg ttttactttt gtattgggtt tggcgtttag 6660
 tagtttgctg tagcgttctt gttatgtgta attacgcttt ttcttcttgc ttcagcagtt 6720
 tcggttgaaa tataaatcga atcaagtttc actttatcag cgttgtttta aattttggca 6780
 ttaaattgggt gaaaattgct tcaattttgt atctaaatag aagagacaac atgaaattcg 6840
 acttttgacc tcaaactctt gaacatttat ttcctgattt cacgatggat gaggataacg 6900
 aaagggcggg tcctatgtcc gggaaagttc ccgtagaaga caatgagcaa agctactgaa 6960
 acgcgacac gacgtcgc atggtagcggat atgagttaaa ccgactcaat tcctttatta 7020
 agacataaac cgattttggg taaagtgtaa cagttagctg atataaaacc gaaacaaacc 7080
 ggtacaagtt tgattgagca acttgatgac aaacttcaga attttggtta ttgaatgaaa 7140
 atcatagtct aatcgtaaaa aatgtacaga agaaaagcta gagcagaaca aagattctat 7200
 attctgggtc caatttatca tcgctttaac gtccttcaga tttgatcggg ctgcaggaat 7260
 taaacgcccg ggcacgtggg atcctctaga gtcgac 7296

<210> 2
 <211> 1843
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> región flanqueante 5' del ADN extraño que comprende genes de tolerancia a herbicidas en EE-GM3

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1451)
 <223> ADN de plantas

10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1452)..(1843)
 <223> inserto o ADN extraño

15

<400> 2

ES 2 712 773 T3

gacttccatg tctagattca ttgtactaag atttcaaacg atatatatat atatatatat 60
 atatatatatc aattacatct ttttcaaaaa acatatatgc atcgtattttt ctaatacatt 120
 tttttatata tgttattagt taaaatttat taaaatcat aaaattaagt aagtttcaca 180
 taacatccaa tgattttctc gtaatttttaa gactggacta aagaatatag tagtaacact 240
 tctcttcaaa taatatactt tatttgcccg aggaatagca ttgccatatt gaactattag 300
 gaaagctgaa catcaattgg tacacttggg tggttcccac ggtttattat tgtctacatc 360
 tggatcatcca agcagagggt atatcttcta taactcgaca aatcttcggt gtgcctatat 420
 agagttgctt gtacgactaa aacgcttata ataatcgta tacaatctat gattcacagt 480
 tatgatacgt gtatgcaata aatgaataga tagataaata tgatacaatt atacaattat 540
 tctaaaatat atagaatata atatatgtat gtataaaaaa ttcataaaac accaataagc 600
 atataattgc aattttgcaa aaccaaatta agaataaac tcaaatatta ctagaacaaa 660
 aaaaaattat aatcattgt cttcataaat taattctaag tatctacaaa tagaaataat 720
 atgaatttta tataaaaaag taatataaat tttattcctt tcttaaattt atgaaaaata 780
 atacttctat atttctatac atgtttctat acatgcggtt caatgtctga tagtgatagg 840
 aaactctact gtattttcaa aagttttttt ttgtttaaat atattttttg tcatgtaatt 900
 gtgtgtgttt tcatttacgt ccatgtaaaa agaaaatatt ttagttctat taaaatattt 960
 tttttatttt ttatccttaa aatactttaa ataataattt ttcctattta aagcattttt 1020
 tataatttaa agcgctattt aaaacgtttt tagaataaaa acataaaaca aacacatttt 1080
 aaaatgattg aatgaaaaa taaaactaat gaaaacgaaa acaataactaa attacaggaa 1140
 agaaaaatat attcaaactt ttatgtttaa aggtttttga atatttctct gattcgtttg 1200
 aaatatgtga agaaaattaa aatatcaagt agtaggttac aacagttcgg gtgcaacagt 1260
 gactatgaca gcaagataat agggccaata tatttgata cctctcttaa gacgtaacaa 1320
 ttttgagcga gaaaataatg gaaaaaaaat aagtcattca aatgataata gatataataa 1380
 ttatttttta ttttaaatat cttattaata tttttatttt tttatcatat tataaattat 1440
 attatattta tgtagctttg ctattgtct tctacgggaa ctttcccgga cataggaacc 1500
 gccctttcgt ttcctcatc catcgtgaaa tcaggaaata aatgttcgaa gatttgaggt 1560
 caaaagtcga atttcatggt gtctcttcta tttagataca aaattgaagc aattttcacc 1620
 aatttaatgc caaaatttaa aacaacgctg tcctgatttc acgatggatg aggataacga 1680
 aagggcggtt cctatgtccg ggaaagttcc cgtagaagac aatgagcaaa gctactgaaa 1740
 cgcgacacg acgtcgcatt ggtacggata tgagttaaac cgactcaatt cttttattaa 1800
 gacataaacc gattttgggt aaagtgtaac agtgagctga tat 1843

<210> 3
 <211> 1408
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>

ES 2 712 773 T3

<223> región flanqueante 3' del ADN extraño que comprende genes de tolerancia a herbicidas en EE-GM3

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(240)

5 <223> inserto o ADN extraño

<220>

<221> misc_feature

<222> (241)..(1408)

<223> ADN de plantas

10 <400> 3

```

taacagtgag ctgatataaa accgaaacaa accggtacaa gtttgattga gcaacttgat      60
gacaaacttc agaatthttg ttattgaatg aaaatcatag tctaatacgta aaaaatgtac     120
agaagaaaag ctagagcaga acaaagattc tatattctgg ttccaattta tcatcgcttt     180
aacgtccctc agatttgatc gggctgcagg aattaatgtg gttcatccgt ctttttgta      240
atgCGgtcat caatacgtgc ctcaaagatt gccaaataga ttaatgtggT tcatctccct     300
atatgttttg cttgttgat tttgctatca catgtttatt gctccaaact aattataata      360
aaatgacttt caaatgattg gtgttgacat tcttttcaaa ttgttcgctg aagaaaagat     420
aatctcgagg cttgatttg ttaatgcttt cattaataaa taaataaaat aactctttcc     480
aaatthcaat tcatgcttht atattgtgtg gttcatcctc atcttatgtc actattatca     540
tttcatgttt gagacttht tggccatat ttgagaagac cttcttcatt ataggcaatt      600
ttatctccac aataatataa gagaatatct tgaattaata attattgagg atatattata     660
gggttctatg tggaaactaaa gacatggta cccattaag agagagtata gaggaattac      720
ttttatthtc cacgaggcga cgcgacttgT atthattthg gaattgtact thtgctgag      780
cagtgtggct ctatgtthgg gcctccactt gttgggtgtht tatatatgtg aaaggaggat     840
gagggtgatg gttcatttct ttgcattatt thtgttattc gcgcgaatga tatatgccct     900
gthththgaag attgataggg aagtccatat ataggaattg aagtgtcaaa aggggtgtgag     960
tatgtgctat gataatcacc caattaatgt acatctgggtg tgggtgthtga atthgtaggt    1020
cattaattaa tthtctctt ggtgaagtht ggagthctth tgcaattaca atthctgtht    1080
gtaagtgatt atgatggact thtagatgth tctcaaacag taggtgtaaa gaaaaatggg    1140
ccctggtatg aaaatthgtt thcactctth ctcatcata tctthaaaaa aagaatgata    1200
atthtgtaat aaaaataaaa aatattaaa thththctca aatcaacaa cthththt    1260
ttatgccaac aataatthtg ttaaagatgg agatthcaat ththataaa gagthcatta    1320
tagthgaaaa thgaatgaat gtatatgtht acgthththg tctcaagtga aactaagatc    1380
aaatattcat atctattgag ctggtctt                                     1408

```

<210> 4

<211> 20

<212> ADN

ES 2 712 773 T3

<213> Artificial

<220>
<223> cebador SOY028

5 <400> 4
atcgctttaa cgtccctcag 20

<210> 5
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> cebador SOY029

<400> 5
caaggcctcg agattatc 18

15 <210> 6
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador SMP187

20 <400> 6
atatcaaccg gtagctcgac 20

<210> 7
<211> 23
<212> ADN
25 <213> Artificial

<220>
<223> cebador STV019

<400> 7
ggcattaaat tggtagaaaat tgc 23

30 <210> 8
<211> 263
<212> ADN
<213> Artificial

35 <220>
<223> secuencia de nucleótidos del amplicón de PCR que usa los cebadores SOY028 - SOY029

<400> 8

atcgctttaa cgtccctcag atttgatcgg gctgcaggaa ttaatgtggt tcatccgtct 60

ttttgtaaat gcggtcatca atacgtgcct caaagattgc caaatagatt aatgtggttc 120

atctccctat atgttttgct tgtttgattt tgctatcaca tgtttattgc tccaaactaa 180

ttataataaa atgactttca aatgattggt gttgacattc ttttcaaatt gttcgtgaa 240

gaaaagataa tctcgaggcc ttg 263

<210> 9
<211> 20

ES 2 712 773 T3

<212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 < 223 > cebador 1 para la amplificación del fragmento control (SOY01)

5 <400> 9
 gtcagccaca cagtgctat 20

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

<220>
 < 223 > cebador 2 para la amplificación del fragmento control (SOY02)

<400> 10
 gttaccgtac aggtcttcc 20

15 <210> 11
 <211> 17806
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 < 223 > secuencia de nucleótidos de ADN extraño y secuencias flanqueantes de plantas en EE-GM3

<400> 11

gacttccatg	tctagattca	ttgtactaag	atitcaaacg	atatatatat	atatatatat	60
atatatatattc	aattacatct	ttttcaaaaa	acatatatgc	atcgtatttt	ctaatacatt	120
tttttatata	tgttattagt	taaaatttat	taaaaatcat	aaaattaagt	aagtttcaca	180
taacatccaa	tgattttctc	gtaattttaa	gactggacta	agaatatag	tagtaacact	240
tctcttcaaa	taatatactt	tatttgcccg	aggaatagca	ttgcatatt	gaactattag	300
gaaagctgaa	catcaattgg	tacacttgga	tggttcccac	ggtttattat	tgtctacatc	360
tggtcatcca	agcagagggt	atatcttcta	taactcgaca	aatcttcggt	gtgcctatat	420
agagttgctt	gtacgactaa	aacgcttata	ataatcgtta	tacaatctat	gattcacagt	480

ES 2 712 773 T3

tatgatacgt gtatgcaata aatgaataga tagataaata tgatacaatt atacaattat	540
tctaaaatat atagaataca atatatgtat gtataaaaaa ttcataaaac accaataagc	600
atataattgc aattttgcaa aaccaaatta agaatataac tcaaatatta ctagaacaa	660
aaaaaattat aaatcattgt cttcataaat taattctaag tatctacaaa tagaaataat	720
atgaatttta tataaaaaag taatataaat tttattcctt tcttaaattt atgaaaaata	780
atacttctat atttctatac atgtttctat acatgctgtt caatgtctga tagtgatagg	840
aaactctact gtattttcaa aagttttttt ttgtttaaat atattttttg tcatgtaatt	900
gtgtgtgttt tcatttacgt ccatgtaaaa agaaaatatt ttagttctat taaaatattt	960
tttttatttt ttatccttaa aatactttaa ataataattt ttcctattta aagcattttt	1020
tataatttaa agcgctattt aaaacgtttt tagaataaaa acataaaaca aacacatttt	1080
aaaatgattg aaatgaaaaa taaaactaat gaaaacgaaa acaataactaa attacaggaa	1140
agaaaaatat attcaaactt ttatgtttaa aggtttttga atatctctct gattcgtttg	1200
aaatatgtga agaaaattaa aatatcaagt agtaggttac aacagttcgg gtgcaacagt	1260
gactatgaca gcaagataat agggccaata tatttggata cctctcttaa gacgtaaaca	1320
ttttgagcga gaaaataatg gaaaaaaaaat aagtcattca aatgataata gatataataa	1380
ttatttttta ttttaaatat cttattaata tttttatttt tttatcatat tataaattat	1440
attatattta tgtagctttg ctcatgtct tctacgggaa ctttcccgga cataggaacc	1500
gccctttcgt taccctcatc catcgtgaaa tcaggaaata aatgttcgaa gatttgagggt	1560
caaaagtcga atttcatgtt gtctcttcta tttagataca aaattgaagc aattttcacc	1620
aatttaatgc caaaatttaa aacaacgctg tcctgatttc acgatggatg aggataacga	1680
aagggcgggt cctatgtccg ggaaagttcc cgtagaagac aatgagcaaa gctactgaaa	1740
cgcgacacg acgtcgcatt ggtacggata tgagttaaac cgactcaatt cttttattaa	1800
gacataaacc gattttgggt aaagtgtaac agtgagctga tataaaaccg aaacaaaccg	1860
gtacaagttt gattgagcaa cttgatgaca aacttcagaa ttttggttat tgaatgaaaa	1920
tcatagtcta atcgtaaaaa atgtacagaa gaaaagctag agcagaacaa agattctata	1980
ttctggttcc aatttatcat cgctttaacg tccctcagat ttgatcgggc tgcaggaatt	2040
aaacgcccgg gcacgtggga tcctctagag tcgactctag cagatctggc cggcccaccg	2100
gtgggccata tgggcccgcg gccgcgaatt cgagctcggg acctacctgg cgaaaggggg	2160
atgtgctgca aggcgattaa gttgggtaac gccagggttt tcccagtcac gacgttgtaa	2220
aacgacggcc agtgaattgc ggccgcaatt cccgatctag taacatagat gacaccgcgc	2280
gcgataattt atcctagttt gcgctgctata ttttgttttc tatcgcgat taaatgtata	2340
attgctggac tctaatacata aaaaccatc tcataaataa cgatcatgcat tacatgtaa	2400

ES 2 712 773 T3

ttattacatg cttaacgtaa ttcaacagaa attatatgat aatcatcgca agaccggcaa 2460
 caggattcaa tcttaagaaa ctttattgcc aaatgtttga acgatcgggg aaattcgtcg 2520
 agtcaccctc ggccgggctt tttgacgctt aatcggcggt caatacacca cgacgcacct 2580
 ggtcacgttc gatggactcg aacagcgcct tgaagttcca ctcgccaaac ccatcgtcgc 2640
 ccttgcgctg gatgaattcg aagaacaccg ggcccatcag ggtttccgag aagatctgca 2700
 gcagcaggcg tttgtcgcct tccacggaag atccgtccag caggataccg cgtgcctgca 2760
 gttgatccac cggctcgcct tggtcaggca ggcgcccttc gagcatttcg taataagtgt 2820
 ctggcggcgc ggtcatgaag cgcattgccga ttttcttcaa cgcgtcccag gtcttgacca 2880
 ggtcgtcggg gaggaacgcc acgtgctgga tgccttcgcc gttgaactgc atcaggaact 2940
 cttcgatctg ccccgcgccc ttggacgact cttcgttcag cgggatgagg atcatgccgt 3000
 ccggcgcact catggccttg gaagtcaggc cgggtgactc gcccttgata tcgaagtaac 3060
 gcgcttcacg gaagttgaac aatttctcgt agaagttggc ccagtagacc atgcggccgc 3120
 gatagacggt gtgggtcagg tggtcgatga ctttgagacc tgcaccgacc ggattgagct 3180
 ccacaccttc gaggtacacg aagtcgatgt cgtagatcga gctgccttcg ccgaaacggt 3240
 cgatcaggta caacggcgcg ccgccgatgc cttgatcgc cggcaggttc aattccatcg 3300
 gcccgggtgc aatatggatc ggctgggagc cgagttccag ggcgcggttg taggcctttt 3360
 gcgagtcctt cacgcggaac gccatgccgc acaccgacgg gccgtgttcg gccgcaaagt 3420
 aggaggcgat gctgttgggc tcgttgttga ggatcagggt gatctcgccc tggcgggtaca 3480
 ggtgcacggt cttggaacgg tgggtcgcga ctttggtgaa gcccatgatc tcgaagatcg 3540
 gctccagggt acccggcgtc ggcgacgcga attcgatgaa ttcaaagccc atcaggccca 3600
 ttgggttttc gtatagatct gccatgcacc ggatccttcc gccgttgctg acgttgccga 3660
 ggcttctgga ggagcggcgg gcgacgggga ggctggcggg ggacttgagc ccctggaacg 3720
 gagcgacggc ggtggccgac gaggccatca tcacggtggg cgccatagac agcggcggca 3780
 ggtacgacag cgtctcgaac ttcttgttgc cgtaggccgg ccacacctgc atatattgaa 3840
 ctcttcacc gttgctggga aggggtggaga agtcgtagc cttcttgggtg gtggggaagg 3900
 cggcgttggga ctttaaggccg gtgaacggag ccacatggt ggctgagca ggggcgggtcc 3960
 ggctaaccgt cgcgactgag gaggagatcg aagccatggc tatcgttcgt aaatggtgaa 4020
 aattttcaga aaattgcttt tgctttaaaa gaaatgattt aaattgctgc aatagaagta 4080
 gaatgcttga ttgcttgaga ttcgtttggt ttgtatatgt tgtggtgaga attctagagt 4140
 cgagagaaat tgatgtctgt agaagaagaa gaacggttaa gagtagattt ggggtgagaaa 4200
 gatgtgaaat tgtttttata ggcaaagacg gagagtctat tttttgagca atcagatcgc 4260

ES 2 712 773 T3

atattaaatc taacggctga gatatcgatc cgtgtgtaca ataaaatgat gtataaacg 4320
tcgatctggt ttaatcgacg gttcatatta gtgatccgcg tgatggcagt gatagccact 4380
aagaatcgtc ttttgtttta catgtggcgc cacaaattag ggtaatgaag cggcaatatt 4440
ttggaactcg gaaaataaaa ttgcgccatc acattatttg aaaattttca catgctttta 4500
ttttaaaaac ccacgaatta caagttacaa ccgaaaaaga tttataatat agtgatttat 4560
actaattttg tagtagctta atgtatattg atactggaaa aacaatgaca atcataatcg 4620
atccgtgtgt acaataaaat gatgtataaa ccgctcgatct gttttaatcg acggttcata 4680
ttagtgatcc gcgtgatggc agtgatagcc actaagaatc gtcttttggt ttacatgtgg 4740
cgccacaaat tagggtaatg aagcggcaat attttggaac tcggaaaata aaattgcgcc 4800
atcacattat ttgaaaatth tcatatgctt ttatttttaa aaccacgaa ttacaagtta 4860
caaccgaaaa agatttataa tatagtgatt tataactaatt ttgtagtagc ttaatgtata 4920
ttgatactgg aaaaacaatg acaatcatat gttagtatta tcaagttatc gtattgatat 4980
tgatattgga acatacaatg ggtattgcct tctttcgacc ataaatatca ccaaatttac 5040
aaagtttgtg tataccaagt tatcaattgt aaatgggatg tcaacatttt aatttccctt 5100
tgagaaacta tagaccacaa gaacacactt caatagataa agtaactatt tacataagag 5160
gttttaaaat cacattaaca aaaataatta ccaaccggca ctcaaaaata caaacagagc 5220
acacgacatg tcaaagccac aagtaaattc gttgagtggg ggtttcatta caattgtgtc 5280
acttgcagca caaactatct tgctctggga atcatctcag catcaaagat catgctcact 5340
tcaggggaac ttagtgatc catgcctcga ctcatatttc tctcgcacct gcaggcatgc 5400
aagctctaga gcggccgcca ccgcggtgga ggtactcgag tcgcgacgta cgttcgaaca 5460
attggtttta aaagcttgca tgcctgcagg tcgaggagaa atatgagtcg aggcattggat 5520
acactaagtt cccctgaagt gagcatgatc tttgatgctg agatgattcc cagagcaaga 5580
tagtttgtgc tgcaagtgac acaattgtaa tgaaaccacc actcaacgaa tttacttgtg 5640
gctttgacat gtcgtgtgct ctgtttgtat ttgtgagtgc cggttggtta ttatttttgt 5700
taatgtgatt ttaaaacctc ttatgtaaat agttacttta tctattgaag tgtgttcttg 5760
tggcttatag tttctcaaag ggaaattaaa atgttgacat cccatttaca attgataact 5820
tggatatac aaactttgta aatttggtga ttttatggt cgaaagaagg caatacccat 5880
tgtatgttcc aatatcaata tcaatagat aacttgataa tactaacata tgattgtcat 5940
tgttttcca gtatcaatat acattaagct actacaaaat tagtataaat cactatatta 6000
taaacttttt tcggttgtaa cttgtaattc gtgggttttt aaaataaaag catgtgaaaa 6060
ttttcaaata atgtgatggc gcaattttat tttccgagtt ccaaaatatt gccgcttcat 6120
taccctaatt tgtggcgcca catgtaaaac aaaagacgat _tcttagtggc tatcactgcc 6180

ES 2 712 773 T3

atcacgcgga tcactaatat gaaccgtcga ttaaaacaga tcgacggttt atacatcatt 6240
 ttattgtaca cacggatcga tatctcagcc gttagattta atatgcgatc tgattgctca 6300
 aaaaatagac tctccgtctt tgcctataaa aacaatttca catctttctc acccaaactt 6360
 actcttaacc gttcttcttc ttctacagac atcaatttct ctcgactcta gaggatccaa 6420
 gcttatcgat ttcgaacccc tcaggcgaag aacaggatg atttgtttgt aattagatca 6480
 ggggttagg tctttccatt actttttaat gtttttctg ttactgtctc cgcgatctga 6540
 ttttacgaca atagagtttc gggttttgtc ccattccagt ttgaaaataa aggtccgtct 6600
 ttttaagttg ctggatcgat aaacctgtga agattgagtc tagtcgattt attggatgat 6660
 ccattcttca tcgttttttt cttgcttcga agttctgtat aaccagattt gtctgtgtgc 6720
 gattgtcatt acctagccgt gtatcgagaa ctagggtttt cgagtcaatt ttgccctttt 6780
 tggttatatac tggttcgata acgattcatc tggattaggg ttttaagtgg tgacgtttag 6840
 tattccaatt tcttcaaaat ttagttatgg ataataaaaa tccccattg actgttcaat 6900
 ttcttgtaa atgvcagat ccccatggct tcgatctcct cctcagtcgc gaccgttagc 6960
 cggaccgccc ctgctcaggc caacatggtg gctccgttca ccggccttaa gtccaacgcc 7020
 gccttcccca ccaccaagaa ggctaacgac ttctccaccc tttccagcaa cgggtgaaga 7080
 gttcaatgta tgcagggtg gccggcctac ggcaacaaga agttcgagac gctgtcgtac 7140
 ctgccgccc tgtctatggc gccaccgtg atgatggcct cgtcggccac cgccgtcgct 7200
 ccgttccagg ggctcaagtc caccgccagc ctccccgtcg cccgccgctc ctccagaagc 7260
 ctcggcaacg tcagcaacgg cggaggatc cgggtcatgg ccggcgccga ggagatcgtg 7320
 ctgcagccca tcaaggagat ctccggcacc gtcaagctgc cggggtccaa gtcgctttcc 7380
 aaccggatcc tcctactcgc cgccctgtcc gaggggacaa cagtggttga taacctgctg 7440
 aacagtgagg atgtccacta catgctcggg gccttgagga ctcttggtct ctctgtcgaa 7500
 gcggacaaag ctgcaaaaag agctgtagtt gttggctgtg gtggaaagtt cccagttgag 7560
 gatgctaaag aggaagtgca gctcttcttg gggaatgctg gaatcgcaat gcggtccttg 7620
 acagcagctg ttactgctgc tggtgaaat gcaacttacg tgcttgatgg agtaccaga 7680
 atgagggaga gaccattgg cgacttgggt gtcggattga agcagcttgg tgcagatggt 7740
 gattgtttcc ttggcactga ctgcccact gttcgtgtca atggaatcgg agggctacct 7800
 ggtggcaagg tcaagctgtc tggctccatc agcagtcagt acttgagtgc cttgctgatg 7860
 gctgctcctt tggctcttgg ggatgtggag attgaaatca ttgataaatt aatctccatt 7920
 ccgtacgtcg aatgacatt gagattgatg gagcgttttg gtgtgaaagc agagcattct 7980
 gatagctggg acagattcta cattaagga ggtcaaaaat acaagtcccc taaaaatgcc 8040

ES 2 712 773 T3

tatgttgaag gtgatgcctc aagcgcaagc tatttcttgg ctggtgctgc aattactgga 8100
 gggactgtga ctgtggaagg ttgtggcacc accagtttgc agggatgatgt gaagtttgct 8160
 gaggtactgg agatgatggg agcgaagggtt acatggaccg agactagcgt aactgttact 8220
 ggcccaccgc gggagccatt tgggaggaaa cacctcaagg cgattgatgt caacatgaac 8280
 aagatgcctg atgtcgccat gactcttggct gtggttggcc tctttgccga tggcccgaca 8340
 gccatcagag acgtggcttc ctggagagta aaggagaccg agaggatggt tgcgatccgg 8400
 acggagctaa ccaagctggg agcatctgtt gaggaagggc cggactactg catcatcacg 8460
 ccgcccgaga agctgaacgt gacggcgatc gacacgtacg acgaccacag gatggcgcgatg 8520
 gctttctccc ttgccgcctg tgccgaggtc cccgtcacca tccgggaccc tgggtgcacc 8580
 cggaagacct tccccgacta cttcgatgtg ctgagcactt tcgtcaagaa ttaagctcta 8640
 gaactagtgg atccccgat ccgcgtttgt gttttctggg tttctcactt aagcgtctgc 8700
 gttttacttt tgtattgggt ttggcgttta gtagtttgcg gtagcgttct tgttatgtgt 8760
 aattacgctt tttcttcttg cttcagcagt ttcggttgaa atataaatcg aatcaagttt 8820
 cactttatca gcgttgtttt aaattttggc attaaattgg tgaaaattgc ttcaattttg 8880
 tatctaaata gaagagacaa catgaaattc gacttttgac ctcaaacttt cgaacattta 8940
 tttctgatt tcacgatgga tgaggataac gaaagggcgg ttcctatgtc cgggaaagtt 9000
 cccgtagaag acaatgagca aagctactga aacgcggaca cgacgtcgca ttggtacgga 9060
 tatgagttaa accgactcaa ttcctttatt aagacataaa ccgattttgg ttaaagtgta 9120
 acagtgagct gatataaaac cgaaacaaac cggtagaagt ttgattgagc aacttgatga 9180
 caaacttcag aattttggtt attgaatgaa aatcatagtc taatcgtaaa aaatgtacag 9240
 aagaaaagct agagcagaac aaagattcta tattctgggtt ccaatttatc atcgctttaa 9300
 cgtccctcag atttgatcgg gctgcaggaa ttaaaccgcc gggcacgtgg gatcctctag 9360
 cagatctggc cggcccaccg gtgggccata tgggcccgcg gccgcgaatt cgagctcgg 9420
 acctacctgg cgaaaggggg atgtgctgca aggcgattaa gttgggtaac gccagggttt 9480
 tcccagtcac gacgttgtaa aacgacggcc agtgaattgc ggccgcaatt cccgatctag 9540
 taacatagat gacaccgcgc gcgataattt atcctagttt gcgcgctata ttttgttttc 9600
 tatcgctat taaatgtata attgcgggac tctaatacata aaaaccatc tcataaataa 9660
 cgatcatgat tacatgttaa ttattacatg cttaacgtaa ttcaacagaa attatatgat 9720
 aatcatcgca agaccggcaa caggattcaa tcttaagaaa ctttattgcc aaatgtttga 9780
 acgatcgggg aaattcgtcg agtcaccctc ggccgggctt tttgacgctt aatcggcgg 9840
 caatacacca cgacgcacct ggtcacgttc gatggactcg aacagcgctt tgaagttcca 9900
 ctcgccaac ccatcgctgc ccttgcgctg gatgaattcg aagaacaccg ggcccatcag 9960

ES 2 712 773 T3

ggtttccgag aagatctgca gcagcaggcg tttgtcgct tccacggaag atccgtccag 10020
 caggataccg cgtgcctgca gttgatccac cggctcggcg tggtcaggca ggcggccttc 10080
 gagcatttcg taataagtgt ctggcggcgc ggtcatgaag cgcagtcgga ttttcttcaa 10140
 cgcgtcccag gtcttgacca ggtcgtcggg gaggaacgcc acgtgctgga tgccttcgcc 10200
 gttgaactgc atcaggaact cttcgatctg ccccgcgcc ttggacgact cttcgttcag 10260
 cgggatgagg atcatgccgt ccggcgact catggccttg gaagtcaggc cgggtgactc 10320
 gcccttgata tcgaagtaac gcgcttcacg gaagttgaac aatttctcgt agaagttggc 10380
 ccagtagacc atgcggccgc gatagacggt gtgggtcagg tggtcgatga ctttgagacc 10440
 tgcaccgacc ggattgcgct ccacaccttc gaggtacacg aagtcgatgt cgtagatcga 10500
 gctgccttcg ccgaaacggg cgatcaggta caacggcgcg ccgccgatgc ctttgatcgc 10560
 cggcaggttc aattccatcg gcccgggtgc aatatggatc ggctgggcg cagagttccag 10620
 ggcgcggttg taggcctttt gcgagtcctt cacgcggaac gccatgccgc acaccgacgg 10680
 gccgtgttcg gccgcaaagt aggaggcgat gctgttgggc tcgttgttga ggatcaggtt 10740
 gatctcgccc tggcgggtaca ggtgcacggt cttggaacgg tgggtcgcga ctttggtgaa 10800
 gcccatgatc tcgaagatcg gctccagggt acccggcgtc ggcgacgcga attcgatgaa 10860
 ttcaaagccc atcaggccca ttgggttttc gtatagatct gccatgcacc ggatccttcc 10920
 gccgttgctg acgttgccga ggcttctgga ggagcggcgg gcgacgggga ggctggcggg 10980
 ggacttgagc ccctggaacg gagcgacggc ggtggccgac gaggccatca tcacgggtggg 11040
 cgccatagac agcggcggca ggtacgacag cgtctcgaac ttcttgttgc cgtaggccgg 11100
 ccacacctgc atatatgaa ctcttcacc gttgctggga aggggtggaga agtcgtagc 11160
 cttcttggtg gtggggaagg cggcgttggga ctttaaggccg gtgaacggag ccaccatggt 11220
 ggcctgagca ggggcgggtcc ggctaacggg cgcgactgag gaggagatcg aagccatggc 11280
 tatcgttcgt aatggtgaa aattttcaga aaattgcttt tgctttaaa gaaatgattt 11340
 aaattgctgc aatagaagta gaatgcttga ttgcttgaga ttcgtttggt ttgtatatgt 11400
 tgtggtgaga attctagagt cgagagaaat tgatgtctgt agaagaaga gaacgggtaa 11460
 gagtagattt ggggtgagaaa gatgtgaaat tgtttttata ggcaaagacg gagagtctat 11520
 tttttgagca atcagatcgc atattaaatc taacggctga gatatcgatc cgtgtgtaca 11580
 ataaaatgat gtataaacg tcgatctggt ttaatcgacg gttcatatta gtgatccgcg 11640
 tgatggcagt gatagccact aagaatcgtc ttttgtttta catgtggcg cacaattag 11700
 ggtaatgaag cggcaatatt ttggaactcg gaaaataaaa ttgcgccatc acattatttg 11760
 aaaattttca catgctttta ttttaaaaac ccacgaatta caagttacaa ccgaaaaaga 11820

ES 2 712 773 T3

ttataaatat agtgatttat actaattttg tagtagctta atgtatattg atactggaaa 11880
 aacaatgaca atcataatcg atccgtgtgt acaataaaat gatgtataaa ccgctgatct 11940
 gttttaatcg acggttcata ttagtgatcc gcgtgatggc agtgatagcc actaagaatc 12000
 gtcttttggt ttacatgtgg cgccacaaat tagggtaatg aagcggcaat attttggaa 12060
 tcggaaaata aaattgcgcc atcacattat ttgaaaattt tcacatgctt ttattttaaa 12120
 aaccacgaa ttacaagtta caaccgaaa agatttataa tatagtgatt tataactaatt 12180
 ttgtagtagc ttaatgtata ttgatactgg aaaaacaatg acaatcatat gttagtatta 12240
 tcaagttatc gtattgatat tgatattgga acatacaatg ggtattgcct tctttcgacc 12300
 ataaatatca ccaaatttac aaagtttgtg tataccaagt tatcaattgt aaatgggatg 12360
 tcaacatttt aatttccctt tgagaaacta tagaccacaa gaacacactt caatagataa 12420
 agtaactatt tacataagag gttttaaaat cacattaaca aaaataatta ccaaccggca 12480
 ctcaaaata caaacagagc acacgacatg tcaaagccac aagtaaattc gttgagtgg 12540
 ggtttcatta caattgtgtc acttgcagca caaactatct tgctctggga atcatctcag 12600
 catcaaagat catgctcact tcaggggaac ttagtgatc catgcctcga ctcatatttc 12660
 tcctcgacct gcaggcatgc aagctctaga gcggccgcca ccgcggtgga ggtactcgag 12720
 tcgcgacgta cgttcgaaca attggtttta aaagcttgca tgcttcgagg tcgaggagaa 12780
 atatgagtcg aggcattgat aactaagtt cccctgaagt gagcatgatc tttgatgctg 12840
 agatgattcc cagagcaaga tagtttgtgc tgcaagtgac acaattgtaa tgaaaccacc 12900
 actcaacgaa ttactttgtg gctttgacat gtcgtgtgct ctgtttgtat ttgtgagtgc 12960
 cggttggtaa ttatttttgt taatgtgatt ttaaaacctc ttatgtaa atgttacttta 13020
 tctattgaag tgtgttcttg tggcttatag tttctcaaag ggaaattaaa atgttgacat 13080
 cccatttaca attgataact tggatacac aaactttgta aatttgggta tatttatggt 13140
 cgaaagaagg caatacccat tgtatgttcc aatatcaata tcaatacgat aacttgataa 13200
 tactaacata tgattgtcat tgtttttcca gtatcaatat acattaagct actacaaaat 13260
 tagtataaat cactatatta taaatctttt tcggttgtaa cttgtaattc gtgggttttt 13320
 aaaataaaag catgtgaaaa ttttcaaata atgtgatggc gcaattttat tttccgagtt 13380
 ccaaaatatt gccgcttcat taccctaatt tgtggcgcca catgtaaac aaaagacgat 13440
 tcttagtggc tatcactgcc atcacgcgga tcaactaatat gaaccgctcga ttaaaacaga 13500
 tcgacggttt atacatcatt ttattgtaca cacggatcga tatctcagcc gttagattta 13560
 atatgcatc tgattgctca aaaaatagac tctccgtctt tgctataaaa aacaatttca 13620
 catctttctc acccaaactt actcttaacc gttcttcttc ttctacagac atcaatttct 13680
 ctcgactcta gaggatccaa gcttatcgat ttcgaacccc tcaggcgaag aacaggtatg 13740

ES 2 712 773 T3

atttgtttgt aattagatca ggggtttagg tctttccatt actttttaat gttttttctg 13800
 ttactgtctc cgcgatctga ttttacgaca atagagtttc gggttttgtc ccattccagt 13860
 ttgaaaataa aggtccgtct ttttaagttg ctggatcgat aaacctgtga agattgagtc 13920
 tagtcgattt attggatgat ccattcttca tcgttttttt cttgcttcga agttctgtat 13980
 aaccagattt gtctgtgtgc gattgtcatt acctagccgt gtatcgagaa ctagggtttt 14040
 cgagtcaatt ttgcccttt tggttatatc tggttcgata acgattcatc tggattaggg 14100
 ttttaagtg tgacgtttag tattccaatt tcttcaaaat ttagttatgg ataataaaaa 14160
 tccccattg actgttcaat ttcttgtaa atgvcagat ccccatggct tcgatctcct 14220
 cctcagtcgc gaccgttagc cggaccgcc ctgctcaggc caacatgggtg gctccgttca 14280
 ccggccttaa gtccaacgcc gccttcccca ccaccaagaa ggctaacgac ttctccacc 14340
 ttcccagcaa cgggtgaaga gttcaatgta tgcagggtg gccggcctac ggcaacaaga 14400
 agttcgagac gctgtcgtac ctgccgccgc tgtctatggc gccaccgtg atgatggcct 14460
 cgctggccac cgccgtcgt ccgttccagg ggctcaagtc caccgccagc ctccccgtcg 14520
 cccgccgctc ctccagaagc ctcggcaacg tcagcaacgg cggaggatc cggtgcatgg 14580
 ccggcgccga ggagatcgtg ctgcagccca tcaaggagat ctccggcacc gtcaagctgc 14640
 cggggcca gtcgctttcc aaccggatcc tcctactcgc cgccctgtcc gaggggacaa 14700
 cagtggttga taacctgctg aacagtgagg atgtccacta catgctcggg gccttgagga 14760
 ctcttggctc ctctgtcgaa gcggacaaag ctgccaaaag agctgtagtt gttggctgtg 14820
 gtggaaagtt cccagttgag gatgctaaag aggaagtgca gctcttcttg gggaatgctg 14880
 gaatcgcaat gcggtccttg acagcagctg ttactgctgc tggtggaat gcaacttacg 14940
 tgcttgatgg agtaccaaga atgagggaga gaccattgg cgacttgggtt gtcggattga 15000
 agcagcttg tgcagatggt gattgtttcc ttggcactga ctgcccacct gttcgtgtca 15060
 atggaatcgg agggctacct ggtggcaagg tcaagctgtc tggctccatc agcagtcagt 15120
 acttgagtgc cttgctgatg gctgctcctt tggctcttgg ggatgtggag attgaaatca 15180
 ttgataaatt aatctccatt ccgtacgtcg aaatgacatt gagattgatg gagcgttttg 15240
 gtgtgaaagc agagcattct gatagctggg acagattcta cattaagga ggtcaaaaat 15300
 acaagtcccc taaaaatgcc tatgttgaag gtgatgcctc aagcgcaagc tatttcttgg 15360
 ctgggtctgc aattactgga gggactgtga ctgtggaagg ttgtggcacc accagtttgc 15420
 aggggtgatgt gaagtttgct gaggtactgg agatgatggg agcgaagggtt acatggaccg 15480
 agactagcgt aactgttact ggcccaccgc gggagccatt tgggaggaaa cacctcaagg 15540
 cgattgatgt caacatgaac aagatgcctg atgtcgccat gactcttgct gtggttgccc 15600

ES 2 712 773 T3

tctttgccga tggccccgaca gccatcagag acgtggcttc ctggagagta aaggagaccg 15660
agaggatggt tgcgatccgg acggagctaa ccaagctggg agcatctggt gaggaagggc 15720
cggactactg catcatcacg ccgccggaga agctgaacgt gacggcgatc gacacgtacg 15780
acgaccacag gatggcgatg gctttctccc ttgccgcctg tgccgaggtc cccgtcacca 15840
tccgggaccc tgggtgcacc cggaagacct tccccgacta cttcgatgtg ctgagcactt 15900
tcgtcaagaa ttaagctcta gaactagtgg atccccgat ccgcgtttgt gttttctggg 15960
tttctcactt aagcgtctgc gttttacttt tgtattgggt ttggcgttta gtagtttgcg 16020
gtagcgttct tgttatgtgt aattacgctt tttcttcttg cttcagcagt ttcggttgaa 16080
atataaatcg aatcaagttt cactttatca gcgttgtttt aaattttggc attaaattgg 16140
tgaaaattgc ttcaattttg tatctaaata gaagagacaa catgaaattc gacttttgac 16200
ctcaaattct cgaacattta tttcctgatt tcacgatgga tgaggataac gaaagggcgg 16260
ttcctatgtc cgggaaagtt cccgtagaag acaatgagca aagctactga aacgcggaca 16320
cgacgtcgca ttggtacgga tatgagttaa accgactcaa ttcctttatt aagacataaa 16380
ccgattttgg ttaaagtgta acagtgagct gatataaaac cgaaacaaac cgggtacaagt 16440
ttgattgagc aacttgatga caaacttcag aattttggtt attgaatgaa aatcatagtc 16500
taatcgtaaa aatgttacag aagaaaagct agagcagaac aaagattcta tattctgggt 16560
ccaatttatc atcgctttaa cgtccctcag atttgatcgg gctgcaggaa ttaatgtggt 16620
tcatccgtct ttttgttaat gcggtcatca atacgtgcct caaagattgc caaatagatt 16680
aatgtggttc atctccctat atgttttgct tgttggtttt tgctatcaca tgtttattgc 16740
tccaaactaa ttataataaa atgactttca aatgattggt gttgacattc ttttcaaatt 16800
gttcgctgaa gaaaagataa tctcgaggcc ttgatttggt aatgctttca ttaataaata 16860
aataaaataa ctctttccaa atttcaattc atgcttttat attgtgtggt tcatcctcat 16920
cttatgtcac tattatcatt tcatgtttga gactttactt ggccatattt gagaagacct 16980
tcttcattat aggcaatttt atctccacaa taatataaga gaatatcttg aattaataat 17040
tattgaggat atattatagg gttctatgtg gaactaaaga catggttacc ccattaagag 17100
agagtataga ggaattactt ttatttgcca cgaggcgacg cgacttgat ttattttgga 17160
attgtacttt tgcgtgagca gtgtggctct atgttggggc ctccacttgt tgggtgtttta 17220
tatatgtgaa aggaggatga gggatgatgg tcatctcttt gcattatttt tgttattcgc 17280
gcgaatgata tatgccctgt ttttgaagat tgatagggaa gtccatatat aggaattgaa 17340
gtgtcaaaag ggtgtgagta tgtgctatga taatcaccca attaattgtac atctggtgtg 17400
gtgtttgaat ttgtaggatca ttaattaata ttcctcttgg tgaagtttgg agttcttttg 17460
caattacaat tctgttttgt aagtgattat gatggacttt tagatgtttc tcaaacagta 17520

ES 2 712 773 T3

ggtgtaaaga aaaatgggccc ctggtatgaa aatttgtttt cactctttct cattcatatc 17580
tttaaaaaaa gaatgataat tttgtaataa aaataaaaaa atattaaata ttttctcaaa 17640
tcaaacaacc tttatTTTTT atgccaacaa taattttggtt aaagatggag atttcaatta 17700
ttatataaga gttcattata gttgaaaatt gaatgaatgt atatgtttac gttttttgtc 17760
tcaagtgaaa ctaagatcaa atattcatat ctattgagct ggtcctt 17806

5 <210> 12
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador SHA130

<400> 12
ctatattctg gttccaattt atc 23

10 <210> 13
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

15 <220>
<223> cebador SMP178

<400> 13
tgaggcacgt attgatgacc 20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una planta de soja, o células, partes, semillas o progenie de la misma, comprendiendo, cada una, en su genoma un evento élite, en donde dicho evento élite, tal como se encuentra en la semilla de referencia depositada en el NCIMB bajo el número de depósito NCIMB 41659, es un locus genético que comprende un ADN extraño que comprende un gen que codifica HPPD Pf W336 quimérico y un gen que codifica 2mEPSPS quimérico.
- 10 2. Una molécula de ácido nucleico que se puede obtener de una planta de soja de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha molécula de ácido nucleico comprende el ADN extraño del evento élite de la reivindicación 1, y las secuencias flanqueantes 5' y 3' de dicho evento élite, en donde dicha molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1441 al nucleótido 1462 que comprende parte de la secuencia flanqueante 5' y el ADN extraño contiguo a ella, y la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 230 al 251 que comprende parte de la secuencia flanqueante 3' y el ADN extraño contiguo a ella.
- 15 3. Una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1431 al nucleótido 1462, o el complemento de la misma.
4. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 3, que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2, o el complemento de la misma.
5. Una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 220 al 261, o el complemento de la misma.
6. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 5, que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3, o el complemento de la misma.
- 20 7. Una molécula de ADN, que comprende, en orden, las siguientes secuencias de nucleótidos:
 - a) la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1 al nucleótido 1451;
 - b) la secuencia de nucleótidos del complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 6760 al nucleótido 6958;
 - 25 c) la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 6874 al nucleótido 7298;
 - d) la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 7 al nucleótido 7291;
 - e) la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 12 al nucleótido 7265;
 - f) la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 217 al nucleótido 240; y
 - g) la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 241 al nucleótido 1408.
8. Una molécula de ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 11.
- 30 9. Una planta de soja que comprende la molécula de ADN de la reivindicación 7.
10. Una planta, célula, tejido o semilla de soja, que comprende cada uno la molécula de ADN de la reivindicación 8.
11. Un método para producir un producto de soja, en el que dicho producto de soja es o comprende sémola, semillas molidas, harina o copos de soja, que comprende obtener semillas de soja que comprenden el evento élite de la reivindicación 1, y producir dicho producto de soja a partir de ellas.
- 35 12. Un proceso para cultivar plantas de soja que contienen el evento élite de la reivindicación 1, que comprende sembrar un campo con semillas que contienen el evento élite de la reivindicación 1, tratar dicho campo con un herbicida inhibidor de HPPD, como el isoxaflutol, antes de que emerjan las plantas de soja pero después de sembrar las semillas, seguido opcionalmente por la aplicación de glifosato o una mezcla de inhibidor de HPPD-glifosato como herbicida postemergente sobre la parte superior de las plantas.
- 40 13. Un método para cultivar plantas de soja que contienen el evento élite de la reivindicación 1, que comprende tratar un campo a plantar con plantas de soja que comprenden el evento élite de la reivindicación 1 o a sembrar con semillas de soja que comprenden el evento élite de la reivindicación 1, con un herbicida inhibidor de HPPD, antes de plantar las plantas de soja o sembrar las semillas, seguido de la plantación o siembra de dichas plantas o semillas de soja en dicho campo pretratado, opcionalmente en donde se aplica glifosato, o una mezcla de inhibidor de HPPD-glifosato, como herbicida postemergente sobre la parte superior de las plantas.
- 45 14. Un método para cultivar plantas de soja que comprenden el evento élite de la reivindicación 1, que comprende sembrar semillas que contienen el evento élite de la reivindicación 1 y tratar las plantas de soja que han emergido de las semillas que se sembraron con un herbicida inhibidor de HPPD, como el isoxaflutol, sobre la parte superior de las

plantas de soja.

15. El método de la reivindicación 14, en donde el tratamiento con un herbicida inhibidor de HPPD se puede aplicar junto con, seguido por o precedido por un tratamiento con glifosato como herbicida postemergente en la parte superior de las plantas.

5 16. Una planta de soja tolerante a los herbicidas glifosato y/o isoxaflutol, que se puede obtener al introducir en el genoma el evento élite de la reivindicación 1.

10 17. Un método para identificar el evento élite de la reivindicación 1 en muestras biológicas, comprendiendo el método, la detección de una región específica de dicho evento élite con dos cebadores específicos, uno de los cuales reconoce específicamente una secuencia dentro de la región flanqueante 5' o 3' del ADN extraño que comprende genes de tolerancia a herbicidas en dicho evento élite, comprendiendo dicha región flanqueante 5', la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1 al nucleótido 1451, y comprendiendo dicha región flanqueante 3', la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 241 al nucleótido 1408, y el otro cebador que reconoce específicamente una secuencia dentro del ADN extraño contiguo a dicha región flanqueante 5' o 3', comprendiendo dicho ADN extraño, la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1452 al nucleótido 1843 o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 1 al nucleótido 240, o comprendiendo la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 11 desde la posición del nucleótido 1452 hasta la posición del nucleótido 16638 o su complemento, o con una sonda específica que reconoce específicamente la región flanqueante 5' o 3' de dicho evento élite, y parte del ADN extraño contiguo a ella.

20 18. El método de la reivindicación 17, comprendiendo dicho método amplificar un fragmento de ADN de entre 50 y 1000 pb de un ácido nucleico presente en dichas muestras biológicas utilizando una reacción en cadena de la polimerasa con al menos dichos dos cebadores específicos.

25 19. El método de la reivindicación 18, en donde dicho cebador que reconoce la región flanqueante 5' comprende en su extremo 3' final una secuencia de nucleótidos de al menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1 al nucleótido 1451 o dicho cebador, que reconoce la región flanqueante 3' de dicho evento élite, comprende en su extremo 3' final una secuencia de nucleótidos de al menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 241 al nucleótido 1408, y dicho cebador que reconoce una secuencia dentro del ADN extraño comprende en su extremo 3' final al menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1452 al nucleótido 1843 o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 1 al nucleótido 240 o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 188 al nucleótido 7252 o su complemento, o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 11 desde la posición del nucleótido 1452 hasta la posición del nucleótido 16638 o su complemento, o en donde dichos cebadores comprenden la secuencia de la SEQ ID NO: 5 y la SEQ ID NO: 4, respectivamente, o la secuencia de la SEQ ID NO: 7 y la SEQ ID NO: 5, respectivamente.

35 20. Un par de cebadores adecuado para su uso en una detección específica para el evento élite de la reivindicación 1, que comprende un primer cebador que reconoce una secuencia dentro de la región flanqueante 5' de un ADN extraño que comprende genes de tolerancia a herbicidas en dicho evento élite, comprendiendo dicha región flanqueante 5' la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1 al nucleótido 1451 y un segundo cebador que reconoce una secuencia dentro del ADN extraño insertado contiguo a dicha región flanqueante 5', comprendiendo dicho ADN extraño insertado contiguo a dicha región flanqueante 5', la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1452 al nucleótido 1843; o que comprende un primer cebador que reconoce una secuencia dentro de la región flanqueante 3' del ADN extraño que comprende genes de tolerancia a herbicidas de dicho evento élite, y un segundo cebador que reconoce una secuencia dentro del ADN extraño insertado contiguo a dicha región flanqueante 3', en donde dicha región flanqueante 3' comprende la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 241 al nucleótido 1408, y comprendiendo dicho ADN extraño insertado contiguo a dicha región flanqueante 3', la secuencia de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 1 hasta nucleótido 240.

50 21. El par de cebadores de la reivindicación 20, en donde uno de dichos cebadores comprende, preferentemente en su extremo 3', una secuencia de nucleótidos de 17 a 200 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1 al nucleótido 1451 o una secuencia de nucleótidos de 17 a 200 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 241 al nucleótido 1408.

55 22. El par de cebadores de la reivindicación 21, que comprende un primer cebador que comprende en su extremo 3' final la secuencia de la SEQ ID NO: 5 y un segundo cebador que comprende en su extremo 3' final la secuencia de la SEQ ID NO: 4.

23. El método de la reivindicación 17, cuyo método comprende hibridar un ácido nucleico de muestras biológicas con una sonda específica para dicho evento élite, en donde la secuencia de dicha sonda específica tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con una secuencia que comprende parte de la secuencia flanqueante 5' o de la secuencia flanqueante 3' en dicho evento élite y la secuencia del ADN extraño contiguo a la misma, o el complemento de la misma, en donde dicha secuencia flanqueante 5' comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1 al nucleótido 1451, y el ADN extraño contiguo a ella comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1452 al nucleótido 1843, y en donde dicha secuencia flanqueante 3' comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 241 al nucleótido 1408, y el ADN extraño contiguo a ella comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 1 al nucleótido 240, como en donde la secuencia de dicha sonda específica tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1431 al 1472 o la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 220 al 261, o el complemento de dichas secuencias.

24. Una sonda específica para la identificación del evento élite de la reivindicación 1 en muestras biológicas, que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con una secuencia que comprende parte de la secuencia flanqueante 5' o la secuencia flanqueante 3' del ADN extraño que comprende genes de tolerancia a herbicidas en dicho evento élite y la secuencia del ADN extraño contiguo a ella, o el complemento de la misma, en donde dicha secuencia flanqueante 5' comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1 al nucleótido 1451, y el ADN extraño contiguo a ella comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1452 al nucleótido 1843, y en donde dicha secuencia flanqueante 3' comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 241 al nucleótido 1408, y el ADN extraño contiguo a ella comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 1 al nucleótido 240, tal como una sonda que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1441 al 1462 o la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 230 al 251, o el complemento de dichas secuencias.

25. Un kit que comprende un par de cebadores o una sonda que reconocen específicamente el evento élite de la reivindicación 1, en donde dicho par de cebadores es el par de una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, y en donde dicha sonda es la sonda de la reivindicación 24.

26. El método de la reivindicación 17 para confirmar la pureza de la semilla, o para seleccionar semillas para detectar la presencia del evento élite de la reivindicación 1, cuyo método comprende la detección, en muestras de semillas, de una región específica para dicho evento élite con dos cebadores específicos, uno de los cuales reconoce específicamente la región flanqueante 5' o 3' del ADN extraño que comprende genes de tolerancia a herbicidas en dicho evento élite, y el otro reconoce específicamente una secuencia dentro de dicho ADN extraño, o con una sonda específica que reconoce específicamente la región flanqueante 5' o 3' de dicho evento élite, y parte del ADN extraño contiguo a ella, en donde dicha región flanqueante 5' comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1 al nucleótido 1451, y el ADN extraño contiguo a ella comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1452 al nucleótido 1843, y en donde dicha región flanqueante 3' comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 241 al nucleótido 1408, y el ADN extraño contiguo a ella comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 1 al nucleótido 240.

27. Un método para detectar la presencia del evento élite de la reivindicación 1 en muestras biológicas mediante hibridación con una sonda de ácido nucleico marcada sustancialmente complementaria en el que la relación sonda: ácido nucleico diana se amplifica mediante el reciclaje de la secuencia del ácido nucleico diana, comprendiendo dicho método:

- a) hibridar dicha secuencia de ácido nucleico diana a un primer oligonucleótido de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1452 al nucleótido 1469 o su complemento o dicho primer oligonucleótido de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 del nucleótido 223 al nucleótido 240 o su complemento;
- b) hibridar dicha secuencia de ácido nucleico diana con un segundo oligonucleótido de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1434 al nucleótido 1451 o su complemento o dicho segundo oligonucleótido de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 desde nucleótido 241 al nucleótido 258 o su complemento, en donde dichos primer y segundo oligonucleótido se solapan con al menos un nucleótido y en donde dichos primer o dicho segundo oligonucleótido se marcan para ser dicha sonda de ácido nucleico marcada;
- c) escindir solamente la sonda marcada dentro del dúplex sonda:secuencia de ácido nucleico diana con una enzima que causa la escisión selectiva de la sonda que da como resultado la disociación del dúplex, dejando la secuencia diana intacta;
- d) reciclar la secuencia de ácido nucleico diana repitiendo las etapas (a) a (c); y
- e) detectar la sonda marcada escindida, determinando, de este modo, la presencia de dicha secuencia de ácido nucleico diana.

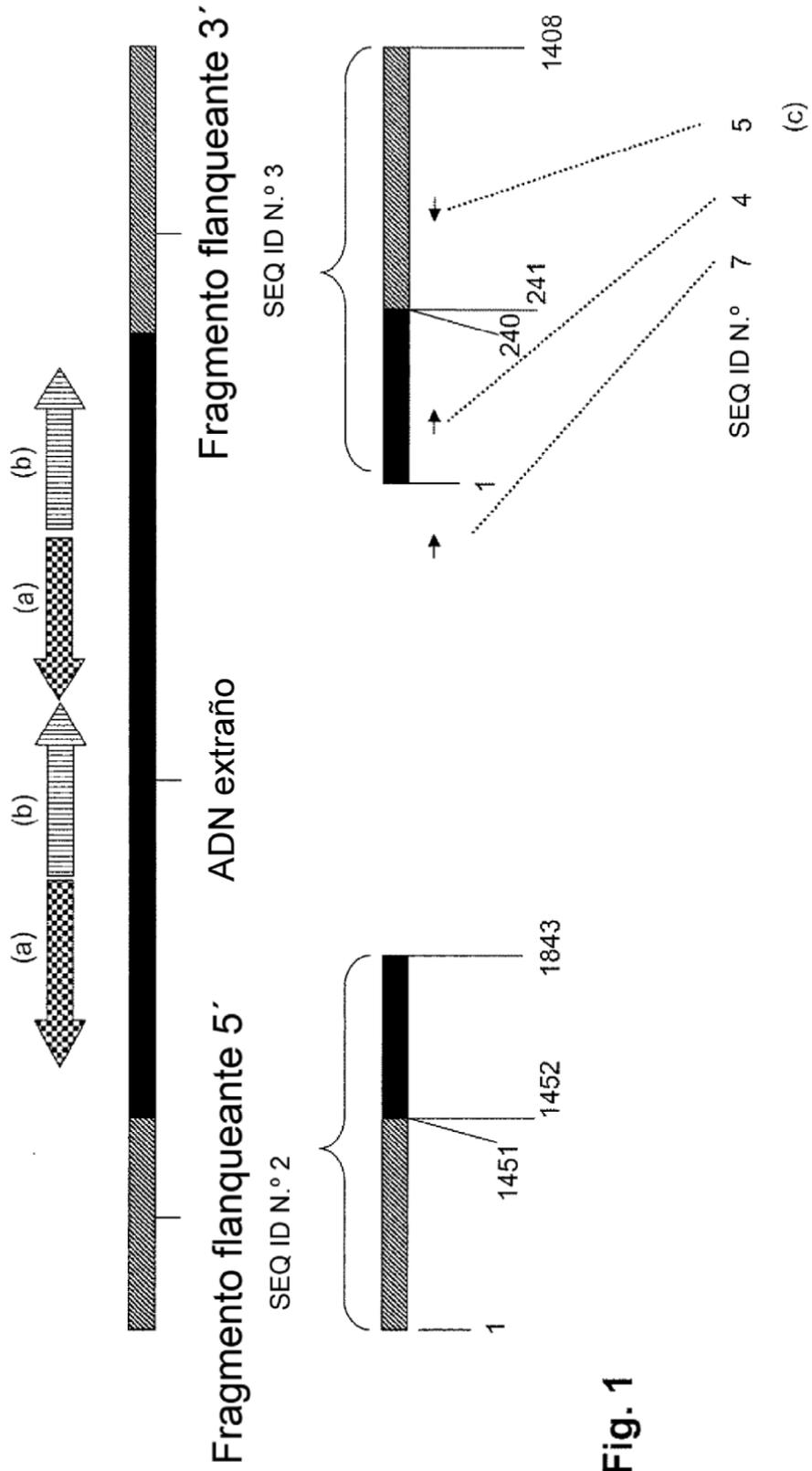


Fig. 1

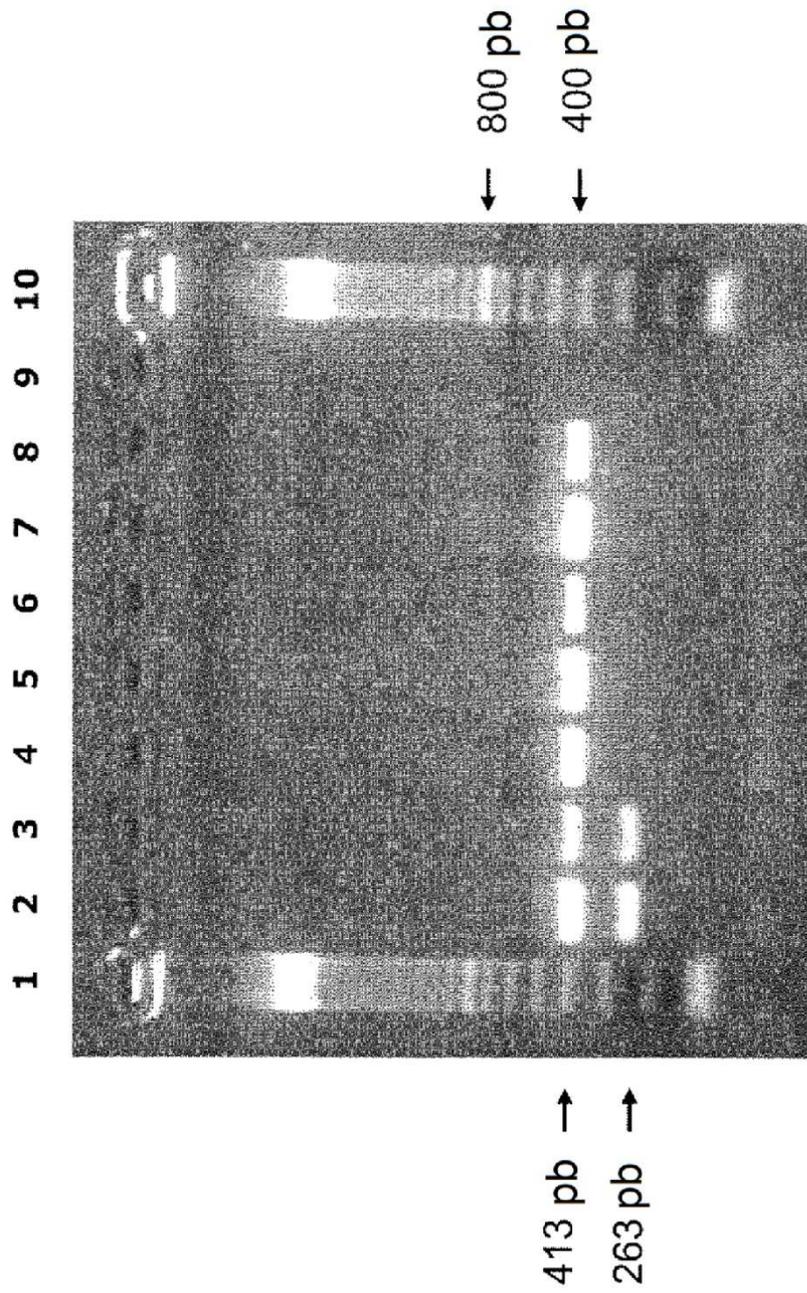


Fig. 2

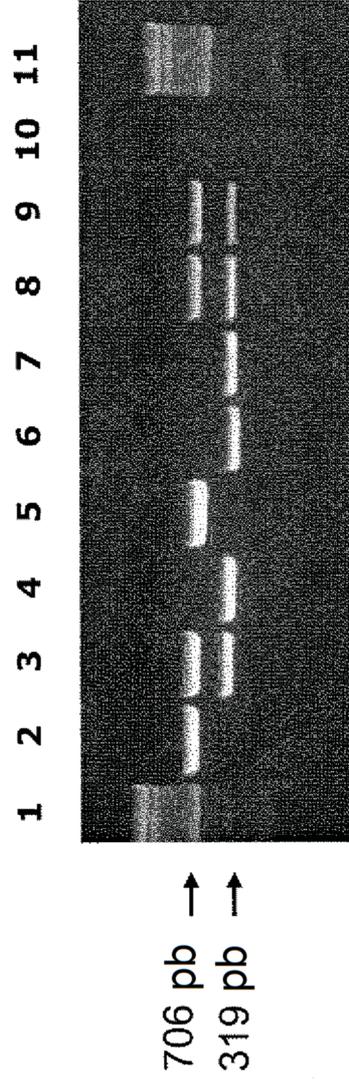


Fig. 3