

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 714 432**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6895 (2008.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.07.2012 PCT/US2012/048325**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.01.2013 WO13016527**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.07.2012 E 12817913 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2019 EP 2736321**

54 Título: **Evento de soja 9582.814.19.1 resistente a insectos y tolerante a herbicidas**

30 Prioridad:

26.07.2011 US 201161511664 P
10.08.2011 US 201161521798 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.05.2019

73 Titular/es:

DOW AGROSCIENCES LLC (100.0%)
9330 Zionsville Road
Indianapolis, IN 46268, US

72 Inventor/es:

BARD, NATHAN;
BRADFISCH, GREG;
CUI, YUNXING CORY;
DRIPPS, JAMES E.;
HOFFMAN, THOMAS;
PAREDDY, DAYAKAR;
PARKHURST, DAWN M.;
TOLEDO, SANDRA G.;
WIGGINS, BARRY y
ZHOU, NING

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 714 432 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 de soja 9582.814.19.1 resistente a insectos y tolerante a herbicidas

Antecedentes de la invención

5 Los genes que codifican Cry1F y Cry1Ac synpro (Cry1Ac) son capaces de conferir resistencia a los insectos, p. ej. resistencia a insectos lepidópteros, a las plantas transgénicas; y el gen que codifica PAT (fosfinotricina acetiltransferasa) es capaz de conferir tolerancia al herbicida fosfinotricina (glufosinato) a las plantas transgénicas. PAT se ha expresado satisfactoriamente en soja para utilizarla como un marcador seleccionable en la producción de cultivos transgénicos resistentes a insectos, y para conferir niveles comerciales de tolerancia al herbicida glufosinato en cultivos transgénicos.

10 Se sabe que la expresión de genes foráneos en las plantas está influenciada por su ubicación en el genoma de la planta, tal vez debido a la estructura de la cromatina (p. ej., la heterocromatina) o a la proximidad de elementos reguladores de la transcripción (p. ej., potenciadores) cerca del sitio de integración (Weising et al., Ann. Rev. Genet 22:421-477, 1988). Al mismo tiempo, la presencia del transgén en diferentes ubicaciones en el genoma influirá en el fenotipo general de la planta de diferentes maneras. Por esta razón, a menudo es necesario escrutar un gran
15 número de eventos para identificar un evento caracterizado por la expresión óptima de un gen de interés introducido. Por ejemplo, se ha observado en plantas y en otros organismos que puede haber una amplia variación en los niveles de expresión de un gen introducido entre eventos. También pueden existir diferencias en los patrones de expresión espaciales o temporales, por ejemplo, diferencias en la expresión relativa de un transgén en diversos tejidos vegetales, que pueden no corresponder a los patrones esperados de los elementos reguladores de la transcripción
20 presentes en la construcción génica introducida. Por esta razón, es común producir de cientos a miles de eventos diferentes y escrutar esos eventos para determinar un evento único que tenga los niveles y patrones de expresión transgénica deseados para fines comerciales. Un evento que tiene niveles o patrones deseados de expresión transgénica es útil para la introgresión del transgén en otros fondos genéticos mediante exocruzamiento sexual utilizando métodos de reproducción convencionales. La progenie de tales cruces mantiene las características de la
25 expresión transgénica del transformante original. Esta estrategia se utiliza para garantizar una expresión génica confiable en una serie de variedades que están bien adaptadas a las condiciones locales de crecimiento.

Es deseable poder detectar la presencia de un evento particular para determinar si la progenie de un cruzamiento sexual contiene un transgén o un grupo de transgenes de interés. Además, un método para detectar un evento en particular sería útil para cumplir con las regulaciones que requieren la aprobación y el etiquetado previos a la
30 comercialización de alimentos derivados de plantas de cultivos recombinantes, por ejemplo, o para su uso en el control ambiental, el control de rasgos en cultivos en el campo, o el control de los productos derivados de una cosecha de cultivos, así como para utilizarlos para asegurar el cumplimiento de las partes sujetas a términos reguladores o contractuales.

Es posible detectar la presencia de un evento transgénico mediante cualquier método de detección de ácido nucleico conocido en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o la hibridación de ADN utilizando sondas de ácido nucleico. Estos métodos de detección generalmente se centran en elementos genéticos utilizados frecuentemente, tales como promotores, terminadores, genes marcadores, etc., debido a que para muchas construcciones de ADN, la región codificante es intercambiable. Como resultado, tales métodos pueden no ser útiles para discriminar entre diferentes eventos, particularmente aquellos producidos utilizando la
35 misma construcción de ADN o construcciones muy similares, a menos que se conozca la secuencia de ADN del ADN flanqueante adyacente al ADN heterólogo insertado. Por ejemplo, un ensayo de PCR específico de evento se describe en la Solicitud de Patente de Estados Unidos 2006/0070139 para el evento de maíz DAS-59122-7. Sería deseable contar con un método simple y discriminativo para la identificación del evento de soja 9582.814.19.1.

Breve exposición de la invención

45 La presente invención se refiere a un nuevo evento de transformación de soja transgénica resistente a insectos y tolerante a herbicidas, denominado evento de soja 9582.814.19.1, que comprende *cry1F*, *cry1Ac* y *pat*, como se describe en la presente memoria, insertados en un sitio específico dentro del genoma de una célula de soja. La semilla de soja representativa se ha depositado en la Colección de Cultivos Tipo Americana (ATCC) con el Número de Acceso identificado en el párrafo [0021]. El ADN de las plantas de soja que contienen este evento incluye las secuencias de unión/flanqueantes descritas en la presente memoria que caracterizan la ubicación del ADN insertado dentro del genoma de la soja. SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 tienen carácter diagnóstico para el evento de soja
50 9582.814.19.1. Más concretamente, las secuencias que rodean las uniones en los pb 1400/1401, y los pb 1536/1537 de SEQ ID NO: 1, y los pb 152/153 de SEQ ID NO: 2 tienen carácter diagnóstico para el evento de soja 9582.814.19.1. El párrafo [00012] a continuación describe ejemplos de secuencias que comprenden estas uniones que son características del ADN de la soja que contiene el evento de soja 9582.814.19.1.

En una realización, la invención proporciona un método para controlar insectos que comprende exponer insectos a plantas de soja resistentes a insectos, comprendiendo dichas plantas de soja un segmento de polinucleótidos que tiene al menos una identidad de 95% con SEQ ID NO: 14, que comprende el evento de soja 9582.814.19.1, en

donde una semilla de soja representativa se ha depositado en la Colección de Cultivos Tipo Americana (ATCC) con el número de acceso PTA-12006. La presencia de los genes *cry1F v3 (cry1F)* y *cry1Ac synpro (cry1Ac)* en el evento de soja 9582.814.19.1 confiere resistencia, por ejemplo, a *Pseudoplusia includens* (gusano medidor de la soja), *Anticarsia gemmatalis* (oruga de las leguminosas), *Epinotia aporema*, *Omoides indicatus*, *Rachiplusia nu*, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera cosmoides*, *Spodoptera eridania*, *Heliiothis virescens*, *Heliocoverpa zea*, *Spilosoma virginica* y *Elasmopalpus lignosellus*.

En otra realización, la invención proporciona una secuencia de ADN aislada que comprende una o más secuencias seleccionadas del grupo que consiste en los pb 1350-1450 de SEQ ID NO: 1; los pb 1300-1500 de SEQ ID NO: 1; los pb 1200-1600 de SEQ ID NO: 1; los pb 137-168 de SEQ ID NO: 2; los pb 103-203 de SEQ ID NO: 2; y los pb 3-303 de SEQ ID NO: 2.

En una realización, la invención proporciona una planta de soja, o parte de la misma que comprende una secuencia de ADN que tiene al menos una identidad de secuencia de 95% con SEQ ID NO: 14, que comprende el evento de soja 9582.814.19.1, en donde una semilla de soja representativa se ha depositado en la Colección de Cultivos Tipo Americana (ATCC) con el número de acceso PTA-12006, que es resistente a *Pseudoplusia includens* (gusano medidor de la soja) y comprende ADN que tiene al menos una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en los pb 1385-1415 de SEQ ID NO: 1; los pb 1350-1450 de SEQ ID NO: 1; los pb 1300-1500 de SEQ ID NO: 1; los pb 1200-1600 de SEQ ID NO: 1; los pb 137-168 de SEQ ID NO: 2; los pb 103-203 de SEQ ID NO: 2; y los pb 3-303 de SEQ ID NO: 2, y sus complementos, en donde las partes de la planta de soja se seleccionan del grupo que consiste en polen, óvulo, flores, brotes, raíces, hojas, núcleos de células vegetativas, polen, células, semillas, y células huevo.

En otra realización, la invención proporciona una planta de soja que comprende una secuencia de ADN que tiene al menos una identidad de secuencia de 95% con SEQ ID NO: 14, preparada al cruzar una primera planta de soja que comprende una o más secuencias seleccionadas del grupo que consiste en 1385-1415 de SEQ ID NO: 1, los pb 1350-1450 de SEQ ID NO: 1, los pb 1300-1500 de SEQ ID NO: 1, los pb 1200-1600 de SEQ ID NO: 1, los pb 137-168 de SEQ ID NO: 2, los pb 103-203 de SEQ ID NO: 2, y los pb 3-303 de SEQ ID NO: 2, y sus complementos con una segunda planta de soja y el análisis de la planta de soja producida para determinar la presencia de ADN que comprende una o más secuencias seleccionadas de la grupo que consiste en los pb 1385-1415 de SEQ ID NO: 1, los pb 1350-1450 de SEQ ID NO: 1, los pb 1300-1500 de SEQ ID NO: 1, los pb 1200-1600 de SEQ ID NO: 1, los pb 137-168 de SEQ ID NO: 2, los pb 103-203 de SEQ ID NO: 2, los pb 3-303 de SEQ ID NO: 2, y sus complementos.

En otra realización, la invención proporciona como planta de soja, o parte de la misma, que comprende una secuencia de ADN que tiene al menos una identidad de secuencia de 95% con SEQ ID NO: 14, que comprende el evento de soja 9582.814.19.1, en donde las semillas representativas de dicha planta de soja se han depositado en la Colección de Cultivos Tipo Americana con el número de acceso PTA-12006.

En otra realización, la invención proporciona un método para controlar las plagas en grano, semilla, sémola o harina de soja que comprende incluir el evento de soja 9582.814.19.1, en donde una semilla de soja representativa se ha depositado en la Colección de Cultivos Tipo Americana (ATCC) con el número de acceso PTA-12006, que comprende una secuencia de ADN que tiene al menos una identidad de secuencia de 95% con SEQ ID NO: 14 en dicho grano, semilla, sémola o harina, como lo demuestran dichos grano, semilla, sémola o harina que comprenden una o más secuencias de ADN seleccionadas del grupo que consiste en los pb 1385-1415 de SEQ ID NO: 1, los pb 1350-1450 de SEQ ID NO: 1, los pb 1300-1500 de SEQ ID NO: 1, los pb 1200-1600 de SEQ ID NO: 1, los pb 137-168 de SEQ ID NO: 2, los pb 103-203 de SEQ ID NO: 2, los pb 3-303 de SEQ ID NO: 2, y sus complementos.

La invención también incluye células de plantas de soja y partes de plantas que incluyen, pero no se limitan a, polen, óvulos, flores, brotes, raíces y hojas, y núcleos de células vegetativas, células de polen, semilla y sémola de semilla y células huevo, que contienen el evento de soja 9582.814.19.1.

En algunas realizaciones, el evento de soja 9582.814.19.1 se puede combinar con otros rasgos, que incluyen, por ejemplo, otros genes de tolerancia a los herbicidas y/o proteínas inhibidoras de insectos y secuencias reguladoras de la transcripción (es decir, ARN de interferencia, ARNdh, factores de transcripción, etc.). Los rasgos adicionales se pueden agrupar en el genoma de la planta mediante el mejoramiento vegetal, la re-transformación de la planta transgénica que contiene el evento de soja 9582.814.19.1, o la adición de nuevos rasgos mediante la integración dirigida a través de la recombinación homóloga.

En un ejemplo, la invención describe semillas de tales plantas. En otro ejemplo, la invención describe un método para controlar las malas hierbas en un cultivo de soja que comprende aplicar herbicida glufosinato al cultivo de soja, comprendiendo dicho cultivo de soja plantas de soja que tienen un genoma que contiene una o más secuencias seleccionadas del grupo que consiste en los pb 1385 1415 de SEQ ID NO: 1; los pb 1350-1450 de SEQ ID NO: 1; los pb 1300-1500 de SEQ ID NO: 1; los pb 1200-1600 de SEQ ID NO: 1; los pb 137-168 de SEQ ID NO: 2; los pb 103-203 de SEQ ID NO: 2; y los pb 3-303 de SEQ ID NO: 2, y sus complementos, que tiene carácter diagnóstico de la presencia del evento de soja 9582.814.19.1. La presencia del gen *pat v6 (pat)* en el evento de soja 9582.814.19.1 confiere tolerancia al herbicida glufosinato.

En otro ejemplo, la invención describe un método para detectar un evento de soja 9582.814.19.1 en una muestra que comprende ADN de soja, comprendiendo dicho método:

- 5 (a) poner en contacto dicha muestra con un primer cebador de al menos 10 pb de longitud que se une selectivamente a una secuencia flanqueante dentro de los pb 1-1400 de SEQ ID NO: 1 o su complemento, y un segundo cebador de al menos 10 pb de longitud que se une selectivamente a una secuencia de inserción dentro de los pb 1401-1836 de SEQ ID NO: 1 o su complemento; y someter a ensayo para determinar un amplicón generado entre dichos cebadores; o
- 10 (b) poner en contacto dicha muestra con un primer cebador de al menos 10 pb de longitud que se une selectivamente a una secuencia del inserto dentro de los pb 1-152 de SEQ ID NO: 2 o su complemento, y un segundo cebador de al menos 10 pb de longitud que se une selectivamente a la secuencia flanqueante dentro de los pb 153-1550 de SEQ ID NO: 2 o su complemento; y
- (c) someter a ensayo para determinar un amplicón generado entre dichos cebadores.

En otro ejemplo, la invención describe un método para detectar el evento de soja 9582.814.19.1 que comprende:

- 15 (a) poner en contacto dicha muestra con un primer cebador que se une selectivamente a una secuencia flanqueante seleccionada del grupo que consiste en los pb 1-1400 de SEQ ID NO: 1 y los pb 153-1550 de SEQ ID NO: 2, y sus complementos; y un segundo cebador que se une selectivamente a SEQ ID NO: 3, o su complemento;
- (b) someter dicha muestra a reacción en cadena de la polimerasa; y
- (c) someter a ensayo para determinar un amplicón generado entre dichos cebadores.

20 En otro ejemplo, la invención describe un método para cultivar una planta de soja que comprende: cruzar una primera planta con una segunda planta de soja para producir una tercera planta de soja, comprendiendo dicha primera planta ADN que comprende una o más secuencias seleccionadas del grupo que consiste en los pb 1385-1415 de SEQ ID NO: 1; los pb 1350-1450 de SEQ ID NO: 1; los pb 1300-1500 de SEQ ID NO: 1; los pb 1200-1600 de SEQ ID NO: 1; los pb 137-168 de SEQ ID NO: 2; los pb 103-203 de SEQ ID NO: 2; y los pb 3-303 de SEQ ID NO: 2, y sus complementos; y someter a ensayo dicha tercera planta de soja para determinar la presencia de ADN que

25 comprende una o más secuencias seleccionadas del grupo que consiste en los pb 1385-1415 de SEQ ID NO: 1; los pb 1350-1450 de SEQ ID NO: 1; los pb 1300-1500 de SEQ ID NO: 1; los pb 1200-1600 de SEQ ID NO: 1; los pb 137-168 de SEQ ID NO: 2; los pb 103-203 de SEQ ID NO: 2; y los pb 3-303 de SEQ ID NO: 2, y sus complementos.

30 En otro ejemplo, la invención describe una molécula de ADN aislada que tiene carácter diagnóstico del evento de soja 9582.814.19.1. Dichas moléculas incluyen, además de SEQ ID NO: 1 y 2, moléculas de al menos 25 pb de longitud que comprenden los pb 1400-1401 de SEQ ID NO: 1 y al menos 10 pb de SEQ ID NO: 1 en cada dirección desde la unión de los pb 1400/1401; amplicones de al menos 25 pb de longitud que comprenden 152 - 153 de SEQ ID NO: 2 y al menos 10 pb de SEQ ID NO: 2 en cada dirección desde la unión de los pb 152/153. Los ejemplos son los pb 1385-1415 de SEQ ID NO: 1; los pb 1350-1450 de SEQ ID NO: 1; los pb 1300-1500 de SEQ ID NO: 1; los pb 1200-1600 de SEQ ID NO: 1; los pb 137-168 de SEQ ID NO: 2; los pb 103-203 de SEQ ID NO: 2; y los pb 3-303 de SEQ ID NO: 2, y sus complementos.

35

Otros ejemplos incluyen la escisión de secuencias de polinucleótidos que comprenden el evento de soja 9582.814.19.1, que incluyen, por ejemplo, el casete de expresión del gen *pat*. Tras la escisión de una secuencia de polinucleótidos, el evento modificado puede ser redirigido a un sitio cromosómico específico en donde las secuencias de polinucleótidos adicionales se agrupan con el evento de soja 9582.814.19.1. En un ejemplo, la presente invención describe un sitio diana cromosómico de soja ubicado en el cromosoma 02 entre las secuencias flanqueantes expuestas en SEQ ID NO: 1 y 2. En un ejemplo, la presente invención describe un método para preparar una planta de soja transgénica que comprende insertar un ácido nucleico heterólogo en una posición en el cromosoma 02 entre las secuencias genómicas expuestas en SEQ ID NO: 1 y 2, es decir, entre los pb 1-1400 de SEQ ID NO: 1 y los pb 153-1550 de SEQ ID NO: 2.

40

45

Además, la presente invención describe ensayos para detectar la presencia del evento en cuestión en una muestra (por ejemplo, de soja). Los ensayos se pueden basar en la secuencia de ADN de la construcción recombinante, insertada en el genoma de la soja, y en las secuencias genómicas que flanquean el sitio de inserción. También se describen los kits y las condiciones útiles para realizar los ensayos.

50 La presente invención se refiere en parte a la clonación y análisis de las secuencias de ADN de las regiones limítrofes resultantes de la inserción de ADN-T de pDAB9582 en líneas de soja transgénicas. Estas secuencias son únicas. Basándose en las secuencias de inserción y unión, se pueden generar y se han generado cebadores específicos de eventos. El análisis por PCR demostró que estos eventos se pueden identificar mediante el análisis de los amplicones de PCR generados con estos conjuntos de cebadores específicos de eventos. Por lo tanto, estos y otros procedimientos relacionados se pueden utilizar para identificar de forma única las líneas de soja que comprenden el evento de la presente invención.

55

Deposito de semillas

5 Como parte de esta descripción, al menos 2.500 semillas de una línea de soja que comprendía el evento de soja 9582.814.19.1 se depositaron en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA, 20110. El depósito, Denominación de Depósito de Patente ATCC, PTA -12006, fue recibido por la ATCC el 21 de julio de 2011. Este depósito se realizó y se mantendrá de acuerdo con y bajo los términos del Tratado de Budapest con respecto a los depósitos de semillas para los fines del procedimiento de patentes. Este depósito se realizó y se mantendrá de acuerdo con y bajo los términos del Tratado de Budapest con respecto a los depósitos de semillas para los fines del procedimiento de patentes.

Breve descripción de las secuencias

10 SEQ ID NO: 1 es la secuencia limítrofe que flanquea el ADN 5' para el evento de soja 9582.814.19.1. Los nucleótidos 1-1400 son la secuencia genómica. Los nucleótidos 1401-1535 son una secuencia reordenada de pDAB9582. Los nucleótidos 1536-1836 son secuencias de inserción.

SEQ ID NO: 2 es la secuencia limítrofe que flanquea el ADN 3' para el evento de soja 9582.814.19.1. Los nucleótidos 1-152 son secuencias de inserción. Los nucleótidos 153-1550 son la secuencia genómica.

15 SEQ ID NO: 3 es la secuencia de ADN de pDAB9582, que se anota a continuación en la Tabla 1.

SEQ ID NO: 4 es el cebador oligonucleotídico 81419_FW3 para la confirmación del ADN genómico limítrofe 5'.

SEQ ID NO: 5 es el cebador oligonucleotídico 81419_RV1 para la confirmación del ADN genómico limítrofe 3'.

SEQ ID NO: 6 es el cebador oligonucleotídico 81419_RV2 para la confirmación del ADN genómico limítrofe 3'.

SEQ ID NO: 7 es el cebador oligonucleotídico 81419_RV3 para la confirmación del ADN genómico limítrofe 3'.

20 SEQ ID NO: 8 es el cebador oligonucleotídico 5'IREnd-01 para la confirmación del ADN genómico limítrofe 5'.

SEQ ID NO: 9 es el cebador oligonucleotídico 5'IREnd-02 para la confirmación del ADN genómico limítrofe 5'.

SEQ ID NO: 10 es el cebador oligonucleotídico AtUbi10RV1 para la confirmación del ADN genómico limítrofe 5'.

SEQ ID NO: 11 es el cebador oligonucleotídico AtUbi10RV2 para la confirmación del ADN genómico limítrofe 5'.

SEQ ID NO: 12 es el cebador oligonucleotídico 3'PATEnd05 para la confirmación del ADN genómico limítrofe 3'.

25 SEQ ID NO: 13 es el cebador oligonucleotídico 3'PATEnd06 para la confirmación del ADN genómico limítrofe 3'.

SEQ ID NO: 14 Es la secuencia confirmada del evento de soja 9582.814.19.1. Incluyendo la secuencia flanqueante genómica 5', el inserto de la hebra T pDAB9582 y la secuencia flanqueante genómica 3'.

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 es un mapa de plásmido de pDAB9582 que contiene los casetes de expresión *cry1F*, *cry1Ac* y *pat*.

30 La Fig. 2 representa las ubicaciones de los cebadores para confirmar la secuencia limítrofe 5' y 3' del evento de soja pDAB9582.814.19.1.

La Fig. 3 representa la disposición de la secuencia genómica en el evento de soja pDAB9582.814.19.1

Descripción detallada de la invención

35 Ambos extremos de la inserción del evento de soja 9582.814.19.1 han sido secuenciados y caracterizados. Se desarrollaron ensayos específicos del evento. También se ha mapeado en el genoma de la soja (cromosoma de soja 02). El evento puede ser sometido a introgresión en líneas de élite adicionales.

40 Como se mencionó anteriormente en la sección Antecedentes, la introducción e integración de un transgén en el genoma de una planta implica algunos eventos aleatorios (de ahí el nombre de "evento" para una inserción dada que es expresada). Es decir, con muchas técnicas de transformación tales como la transformación con *Agrobacterium*, la transformación biolística (es decir, pistola génica) y la transformación mediada por carburo de silicio (es decir, WHISKERS), resulta impredecible en qué el lugar se insertará un transgén en el genoma. Por lo tanto, la identificación del ADN genómico de la planta flanqueante en ambos lados del inserto puede ser importante para identificar una planta que tenga un evento de inserción determinado. Por ejemplo, se pueden diseñar cebadores de PCR que generen un amplicón de PCR a través de la región de unión del inserto y el genoma del anfitrión. Este amplicón de PCR se puede utilizar para identificar un tipo único o distinto de evento de inserción.

45 Las definiciones y los ejemplos se proporcionan en la presente memoria para ayudar a describir la presente

invención y para guiar a los expertos en la técnica en la práctica de la invención. A menos que se indique lo contrario, los términos deben entenderse de acuerdo con el uso convencional por los expertos en la técnica relevante. Se utiliza la nomenclatura para las bases de ADN según lo establecido en 37 CFR §1.822.

5 Como se emplea en la presente memoria, el término "progenie" denota la descendencia de cualquier generación de una planta progenitora que comprenda el evento de soja 9582.814.19.1.

10 Un "evento" transgénico se produce por transformación de células vegetales con ADN heterólogo, es decir, una construcción de ácido nucleico que incluye los transgenes de interés, la regeneración de una población de plantas resultante de la inserción del transgén en el genoma de la planta y la selección de una planta particular caracterizada por la inserción en una ubicación particular del genoma. El término "evento" se refiere al transformante original y la
 15 progenie del transformante que incluyen el ADN heterólogo. El término "evento" también se refiere a la progenie producida por un exocruzamiento sexual entre el transformante y otra variedad que incluye el ADN genómico/transgénico. Incluso después de un retrocruzamiento repetido con un progenitor recurrente, el ADN transgénico insertado y el ADN genómico flanqueante (ADN genómico/transgénico) del progenitor transformado está presente en la progenie del cruce en la misma ubicación cromosómica. El término "evento" también se refiere al
 20 ADN del transformante original y de su progenie que comprende el ADN insertado y a la secuencia genómica flanqueante inmediatamente adyacente al ADN insertado que se esperaría que se transfiriera a una progenie que reciba el ADN insertado que incluya el transgén de interés como resultado del cruce sexual de una línea parental que incluye el ADN insertado (p. ej., el transformante original y la progenie resultante de la autofertilización) y una línea parental que no contiene el ADN insertado.

25 Una "secuencia de unión" o "secuencia limitrofe" abarca el punto en el que el ADN insertado en el genoma se une al ADN del genoma nativo de soja que flanquea el punto de inserción, la identificación o detección de una u otra secuencias de unión en el material genético de una planta que son suficientes para tener un carácter diagnóstico para el evento. Se incluyen las secuencias de ADN que abarcan las inserciones en eventos de soja descritos en la presente memoria y longitudes similares de ADN flanqueante. En la presente memoria se proporcionan ejemplos
 30 específicos de tales secuencias de diagnóstico; sin embargo, otras secuencias que se solapan con las uniones de las inserciones, o las uniones de las inserciones y la secuencia genómica, también tienen un carácter diagnóstico y podrían utilizarse de acuerdo con la presente invención.

35 La presente invención se refiere en parte a la identificación de eventos utilizando tales secuencias flanqueantes, de unión e inserción. Los cebadores de PCR relacionados y los amplicones se incluyen en la invención. De acuerdo con la presente invención, los métodos de análisis de PCR que utilizan amplicones que se extienden a través del ADN insertado y sus límites se pueden utilizar para detectar o identificar variedades o líneas de soja transgénicas comercializadas derivadas de las líneas de soja transgénicas patentadas.

40 Las secuencias flanqueantes/de unión tienen carácter diagnóstico para el evento de soja 9582.814.19.1. Basándose en estas secuencias, se generaron cebadores específicos del evento. El análisis de PCR demostró que estas líneas de soja se pueden identificar en diferentes genotipos de soja mediante el análisis de los amplicones de PCR generados con estos conjuntos de cebadores específicos del evento. Por lo tanto, estos y otros procedimientos relacionados se pueden utilizar para identificar de forma única estas líneas de soja. Las secuencias identificadas en la presente memoria son únicas.

45 Las técnicas de detección de la presente invención son especialmente útiles junto con el mejoramiento vegetal, para determinar qué plantas de la progenie comprenden un evento dado, después de que una planta parental que comprende un evento de interés se cruce con otra línea de plantas en un esfuerzo por conferir uno o más rasgos adicionales de interés a la progenie. Estos métodos de análisis de PCR benefician los programas de mejoramiento de la soja y el control de calidad, especialmente para las semillas de soja transgénicas comercializadas. También se pueden elaborar y utilizar kits de detección de PCR para estas líneas de soja transgénicas. Esto también puede beneficiar el registro del producto y la administración del producto.

Además, las secuencias de soja/genómicas flanqueantes se pueden utilizar para identificar específicamente la ubicación genómica de cada inserto. Esta información se puede utilizar para elaborar sistemas de marcadores moleculares específicos para cada evento. Estos se pueden utilizar para estrategias de reproducción acelerada y para establecer datos de vinculación.

50 Aún más, la información de la secuencia flanqueante se puede utilizar para estudiar y caracterizar los procedimientos de integración transgénica, las características del sitio de integración genómica, la clasificación de eventos, la estabilidad de los transgenes y sus secuencias flanqueantes y la expresión de genes (especialmente en relación con el silenciamiento de genes, los patrones de metilación del transgén, los efectos de la ubicación y los elementos potenciales relacionados con la expresión, tales como MARS [regiones de anclaje a la matriz], y
 55 similares).

A la luz de toda la presente descripción, debe quedar claro que la invención en cuestión incluye semillas disponibles bajo el número de depósito ATCC identificado en el párrafo [0021]. La presente invención también incluye una planta de soja tolerante a herbicida cultivada a partir de una semilla depositada con el número de depósito ATCC

identificado en el párrafo [0021]. El objeto de la invención incluye adicionalmente partes de dicha planta, tales como hojas, muestras de tejidos, semillas producidas por dicha planta, polen y similares (en donde comprenden *cry1F*, *cry1Ac*, *pat*, y SEQ ID NO: 1 y 2).

5 Aún más, la presente invención incluye plantas descendientes y/o de la progenie de plantas cultivadas a partir de la semilla depositada, preferiblemente una planta de soja resistente a herbicida en donde dicha planta tiene un genoma que comprende una secuencia de unión de tipo salvaje detectable como se describe en la presente memoria. Como se emplea en la presente memoria, el término "soja" significa *Glycine max* e incluye todas las variedades de la misma que puedan ser criadas con una planta de soja.

10 Esta invención incluye adicionalmente procedimientos para realizar cruces utilizando una planta de la presente invención como al menos un progenitor. Por ejemplo, la presente invención incluye una planta híbrida F₁ que tiene como uno o ambos progenitores cualesquiera de las plantas ilustradas en la presente memoria. También se encuentra dentro de la presente invención la semilla producida por tales híbridos F₁ de la presente invención. Esta invención incluye un método para producir una semilla híbrida F₁ cruzando una planta ilustrada con una planta diferente (p. ej., progenitor endogámico) y cosechando la semilla híbrida resultante. La presente invención incluye
15 una planta ilustrada que es un progenitor hembra o un progenitor macho. Las características de las plantas resultantes se pueden mejorar mediante una cuidadosa consideración de las plantas progenitoras.

Una planta de soja resistente a los insectos/tolerante al glufosinato de la presente invención se puede criar primero cruzando sexualmente una primera planta progenitora de soja que consiste en una planta de soja cultivada a partir de semillas de cualquiera de las líneas mencionadas en la presente memoria, y una segunda planta progenitora de
20 soja, produciendo así una pluralidad de plantas de primera progenie; seleccionando a continuación una planta de la primera progenie que sea resistente al glufosinato; autofertilizando la planta de la primera progenie, produciendo así una pluralidad de plantas de la segunda progenie; y seleccionando a continuación de las plantas de la segunda progenie una planta que sea resistente al glufosinato. Estas etapas pueden incluir adicionalmente el retrocruzamiento de la planta de la primera progenie o la planta de la segunda progenie con una segunda planta
25 progenitora de soja o una tercera planta progenitora de soja. Después se puede plantar un cultivo de soja que comprende semillas de soja de la presente invención, o su progenie.

También se debe entender que dos plantas transgénicas diferentes también se pueden aparear para producir descendientes que contengan dos genes exógenos, agregados que se segregan independientemente. La autofecundación de la progenie apropiada puede producir plantas homocigotas para ambos genes exógenos
30 agregados. También se contemplan el retrocruzamiento con una planta progenitora y el exocruzamiento con una planta no transgénica, al igual que la propagación vegetativa. Otros métodos de mejoramiento comúnmente utilizados para diferentes rasgos y cultivos son conocidos en la técnica. La reproducción por retrocruzamiento se ha utilizado para transferir genes para un rasgo hereditario simple y altamente heredable a un cultivar o línea endogámicos homocigóticos deseables, que es el progenitor recurrente. El origen del rasgo que se va a transferir se
35 denomina progenitor donador. Se espera que la planta resultante tenga los atributos del progenitor recurrente (p. ej., cultivar) y el rasgo deseable transferido desde el progenitor donador. Después del cruce inicial, los individuos que poseen el fenotipo del progenitor donador se seleccionan y se cruzan repetidamente (retrocruzamiento) con el progenitor recurrente. Se espera que el progenitor resultante tenga los atributos del progenitor recurrente (p. ej., cultivar) y el rasgo deseable transferido del progenitor donador.

40 Del mismo modo, una planta de soja resistente a insectos/tolerante al glufosinato de la presente invención se puede transformar con transgenes adicionales utilizando métodos conocidos en la técnica. Los mecanismos de transformación tales como la transformación con *Agrobacterium*, la transformación biolística (es decir, pistola génica), y la transformación mediada por carburo de silicio (es decir, WHISKERS), se pueden utilizar para introducir uno o varios transgenes adicionales en el genoma del evento de soja 9582.814.19.1. La selección y caracterización
45 de plantas transgénicas que contienen los transgenes recién insertados se pueden completar para identificar plantas que contienen un integrante estable del nuevo transgén además de los genes *cry1F*, *cry1Ac*, *pat* de la presente invención.

Las moléculas de ADN de la presente invención se pueden utilizar como marcadores moleculares en un método de reproducción asistida por marcadores (MAB). Las moléculas de ADN de la presente invención se pueden utilizar en
50 métodos (tales como, marcadores AFLP, marcadores RFLP, marcadores RAPD, SNP y SSR) que identifican rasgos agrónomicamente útiles genéticamente ligados, como se conoce en la técnica. Los rasgos de resistencia a los insectos y tolerancia a los herbicidas se pueden rastrear en la progenie de un cruce con una planta de soja de la presente invención (o su progenie y cualquier otro cultivar o variedad de soja) utilizando los métodos MAB. Las moléculas de ADN son marcadores para este rasgo, y los métodos MAB que son bien conocidos en la técnica se
55 pueden utilizar para rastrear uno o varios rasgos de resistencia a herbicidas en plantas de soja donde al menos una línea de soja de la presente invención, o su progenie, fue progenitora o predecesora. Los métodos de la presente invención se pueden utilizar para identificar cualquier variedad de soja que tenga el evento en cuestión.

Los métodos de la presente invención incluyen un método para producir una planta de soja resistente a los insectos/tolerante a los herbicidas, en donde dicho método comprende la reproducción con una planta de la presente
60 invención. Más específicamente, dichos métodos pueden comprender el cruzamiento de dos plantas de la presente

invención, o una planta de la presente invención y cualquier otra planta. Los métodos preferidos comprenden adicionalmente la selección de la progenie de dicho cruce analizando dicha progenie para detectar un evento detectable de acuerdo con la presente invención y un resultado varietal favorable (p. ej., rendimiento). Por ejemplo, la presente invención se puede utilizar para rastrear el evento en cuestión a través de ciclos de reproducción con plantas que comprenden otros rasgos deseables, tales como rasgos agronómicos, tolerancia o resistencia a una enfermedad, tolerancia o resistencia a los nematodos y fecha de madurez. Las plantas que comprenden el evento y el rasgo deseado en cuestión se pueden detectar, identificar, seleccionar y utilizar rápidamente en rondas adicionales de reproducción, por ejemplo. El evento/rasgo del sujeto también se puede combinar a través de la reproducción, y se puede rastrear de acuerdo con la presente invención, con uno o varios rasgos de resistencia a insectos adicionales y/o rasgos de tolerancia a herbicidas adicionales. Las realizaciones de este último son plantas que comprenden el evento en cuestión combinado con el gen *aad-12*, que confiere tolerancia a los herbicidas ácido 2,4-diclorofenoxiacético y piridiloxiacetato, o con un gen que codifica resistencia al herbicida dicamba.

Por lo tanto, la presente invención se puede combinar, por ejemplo, con rasgos que codifican la resistencia al glifosato (p. ej., planta resistente o *EPSPS*, *GOX*, *GAT* bacterianas), resistencia al glufosinato (p. ej., *pat*, *bar*), resistencia a los herbicidas inhibidores de la acetolactato sintasa (ALS) (p. ej., imidazolinonas [tales como imazetapir], sulfonilureas, triazolopirimidin sulfonilida, benzoatos de pirimidinilo, y otros compuestos químicos [*Csr1*, *SurA*, *et al.*]), resistencia al bromoxinilo (p. ej., *Bxn*), resistencia a los inhibidores de la enzima HPPD (4-hidroxifenil-piruvato-dioxigenasa), resistencia a los inhibidores de la fitoeno desaturasa (PDS), resistencia a los herbicidas inhibidores del fotosistema II (p. ej., *psbA*), resistencia a los herbicidas inhibidores del fotosistema I, resistencia a los herbicidas inhibidores de la protoporfirinógeno oxidasa IX (PPO) (p. ej., *PPO-1*), resistencia a los herbicidas de fenilurea (p. ej., *CYP76B1*), enzimas que degradan dicamba (véase, p. ej., el documento US 20030135879), y otros podrían agruparse solos o en múltiples combinaciones para proporcionar la capacidad de controlar o prevenir efectivamente los cambios poblaciones de malas hierbas y/o la resistencia a cualquier herbicida de las clases mencionadas anteriormente.

Adicionalmente, el evento de soja 9582.814.19.1 se puede combinar con uno o más rasgos de entrada adicionales (p. ej., resistencia a insectos, resistencia a patógenos o tolerancia al estrés, *et al.*) o salida (p. ej., mayor rendimiento, mejor perfil de aceite, mejor calidad de fibra, *et al.*). Por lo tanto, la presente invención se puede utilizar para proporcionar un paquete agronómico completo de calidad de cultivo mejorada con la capacidad de controlar de forma flexible y rentable cualquier número de plagas agronómicas.

Los métodos para integrar una secuencia de polinucleótidos dentro de un sitio cromosómico específico de una célula vegetal mediante recombinación homóloga se han descrito en la técnica. Por ejemplo, la integración específica del sitio como se describe en la Publicación de la Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 2009/0111188 A1, describe el uso de recombinasas o integrasas para mediar en la introducción de una secuencia de polinucleótidos donadora en una diana cromosómica. Además, la Solicitud de Patente Internacional núm. WO 2008/021207, describe la recombinación homóloga mediada por dedos de zinc para integrar una o más secuencias de polinucleótidos donadoras en ubicaciones específicas del genoma. El uso de recombinasas tales como FLP/FRT como se describe en la Patente de Estados Unidos Núm. 6720475, o CRE/LOX como se describe en la Patente de Estados Unidos Núm. 5658772, se puede utilizar para integrar una secuencia de polinucleótidos en un sitio cromosómico específico. Finalmente, el uso de meganucleasas para dirigir los polinucleótidos donadores a una ubicación cromosómica específica fue descrito por Puchta et al., PNAS USA 93 (1996) pág. 5055-5060.

Otros métodos para la integración específica del sitio dentro de las células vegetales son generalmente conocidos y aplicables (Kumar et al., Trends in Plant Sci. 6 (4) (2001) pág. 155-159). Además, los sistemas de recombinación específicos del sitio que se han identificado en varios organismos procarióticos y eucarióticos inferiores se pueden aplicar para su uso en plantas. Los ejemplos de tales sistemas incluyen, pero no están limitados a; el sistema de recombinasa R/RS del plásmido pSR1 de la levadura *Zygosaccharomyces rouxii* (Araki et al. (1985) J. Mol. Biol. 182: 191-203), y el sistema Gin/gix del fago Mu (Maeser y Kahlmann (1991) Mol. Gen. Genet. 230: 170-176).

En algunas realizaciones de la presente invención, puede ser deseable integrar o agrupar uno o varios nuevos transgenes en la proximidad de un evento transgénico existente. El evento transgénico se puede considerar como un locus genómico preferido que se seleccionó en función de características únicas tales como el sitio de inserción única, la segregación mendeliana normal y la expresión estable, y una combinación superior de eficacia, incluyendo la tolerancia a los herbicidas y el rendimiento agronómico en y a través de múltiples ubicaciones ambientales. Los transgenes recién integrados deben mantener las características de expresión transgénica de los transformantes existentes. Además, el desarrollo de ensayos para la detección y confirmación del evento recién integrado se superaría, ya que las secuencias flanqueantes genómicas y la ubicación cromosómica del evento recién integrado ya están identificadas. Finalmente, la integración de un nuevo transgén en una ubicación cromosómica específica que está vinculada a un transgén existente aceleraría la introgresión de los transgenes en otros fondos genéticos mediante el exocruzamiento sexual utilizando métodos de reproducción convencionales.

En algunas realizaciones de la presente invención, puede ser deseable escindir secuencias de polinucleótidos de un evento transgénico. Por ejemplo, la escisión del transgén como se describe en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Provisional Núm. 61/297.628, describe el uso de nucleasas de dedos de zinc para eliminar una secuencia de polinucleótidos, que consiste en un casete de expresión génica, de un evento transgénico cromosómicamente

integrado. La secuencia de polinucleótidos que se elimina puede ser un marcador seleccionable. Tras la escisión y eliminación de una secuencia de polinucleótidos, el evento transgénico modificado se puede redireccionar mediante la inserción de una secuencia de polinucleótidos. La escisión de una secuencia de polinucleótidos y el posterior redireccionamiento del evento transgénico modificado proporcionan ventajas tales como la reutilización de un marcador seleccionable o la capacidad de superar cambios no intencionados en el transcriptoma de la planta que resultan de la expresión de genes específicos.

La presente invención describe en la presente memoria un sitio específico en el cromosoma 02 en el genoma de la soja que es excelente para la inserción de ácidos nucleicos heterólogos. Por lo tanto, la presente invención proporciona métodos para introducir ácidos nucleicos heterólogos de interés en este sitio diana preestablecido o en las proximidades de este sitio diana. La presente invención también abarca una semilla de soja y/o una planta de soja que comprenden cualquier secuencia de nucleótidos heteróloga insertada en el sitio diana descrito o en las proximidades de dicho sitio. Una opción para lograr tal integración específica consiste en escindir y/o sustituir un inserto diferente en lugar del casete de expresión de *pat* ilustrado en la presente memoria. En este aspecto general, se puede utilizar la recombinación homóloga dirigida, por ejemplo y sin limitación, de acuerdo con la presente invención.

Como se emplea en la presente memoria, el "agrupamiento" de genes, eventos o rasgos es la combinación de rasgos deseados en una línea transgénica. Los expertos en mejoramiento vegetal agrupan rasgos transgénicos realizando cruzamientos entre los progenitores que tienen cada uno con un rasgo deseado e identificando después la descendencia que tiene ambos rasgos deseados. Otra forma de agrupar genes es mediante la transferencia de dos o más genes al núcleo celular de una planta al mismo tiempo durante la transformación. Otra forma de agrupar genes es mediante la re-transformación de una planta transgénica con otro gen de interés. Por ejemplo, el agrupamiento de genes se puede utilizar para combinar dos o más rasgos diferentes, incluyendo, por ejemplo, dos o más rasgos de insectos diferentes, rasgos de resistencia a insectos y rasgos de resistencia a enfermedades, dos o más rasgos de resistencia a herbicidas, y/o rasgos de resistencia a insectos y rasgos de resistencia a herbicidas. El uso de un marcador seleccionable además de un gen de interés también se puede considerar agrupamiento de genes.

"Recombinación homóloga" se refiere a una reacción entre cualquier par de secuencias de nucleótidos que tienen sitios correspondientes que contienen una secuencia de nucleótidos similar a través de la cual las dos secuencias de nucleótidos pueden interactuar (recombinarse) para formar una nueva secuencia de ADN recombinante. Los sitios de secuencias de nucleótidos similares se denominan en la presente memoria "secuencia de homología". En general, la frecuencia de recombinación homóloga aumenta a medida que aumenta la longitud de la secuencia de homología. Así, mientras que la recombinación homóloga puede ocurrir entre dos secuencias de nucleótidos que son menos que idénticas, la frecuencia (o eficacia) de la recombinación disminuye a medida que aumenta la divergencia entre las dos secuencias. La recombinación se puede lograr utilizando una secuencia de homología en cada una de las moléculas donadora y diana, generando de ese modo un producto de recombinación de "entrecruzamiento único". Alternativamente, se pueden colocar dos secuencias de homología en cada una de las secuencias de nucleótidos diana y donadora. La recombinación entre dos secuencias de homología en el donador con dos secuencias de homología en la diana genera un producto de recombinación de "doble entrecruzamiento". Si las secuencias de homología en la molécula donadora flanquean una secuencia que se va a manipular (p. ej., una secuencia de interés), la recombinación de doble entrecruzamiento con la molécula diana dará como resultado un producto de recombinación en donde la secuencia de interés reemplaza una secuencia de ADN que originalmente estaba entre las secuencias de homología en la molécula diana. El intercambio de secuencia de ADN entre la diana y el donador a través de un evento de recombinación de doble entrecruzamiento se denomina "reemplazo de secuencia".

Una planta preferida, o una semilla, de la presente invención comprende en su genoma secuencias de nucleótidos de *cry1F v3*, *cry1Ac synpro* y *pat V6* operativas, como se identifica en la presente memoria, junto con al menos 20-500 o más nucleótidos flanqueantes contiguos a ambos lados del inserto, como se identifica en la presente memoria. A menos que se indique lo contrario, la referencia a las secuencias flanqueantes se refiere a aquellas identificadas con respecto a SEQ ID NO: 1 y 2. Se podría esperar que todas o parte de estas secuencias flanqueantes se transfirieran a la progenie que recibe el ADN insertado como resultado de un cruzamiento sexual de una línea parental que incluya el evento.

La presente invención incluye cultivos de tejidos de células regenerables de una planta de la presente invención. También se incluye una planta regenerada a partir de dicho cultivo de tejidos, particularmente cuando dicha planta es capaz de expresar todas las propiedades morfológicas y fisiológicas de una variedad ilustrada. Las plantas preferidas de la presente invención tienen todas las características fisiológicas y morfológicas de una planta cultivada a partir de la semilla depositada. Esta invención comprende adicionalmente la progenie de tales semillas y las semillas que poseen los rasgos de calidad de interés.

Como se emplea en la presente memoria, una "línea" es un grupo de plantas que muestra poca o ninguna variación genética entre individuos para al menos un rasgo. Tales líneas pueden ser creadas por varias generaciones de autopolinización y selección, o propagación vegetativa de un solo progenitor utilizando técnicas de cultivo de tejidos o células.

Como se emplean en la presente memoria, los términos "cultivar" y "variedad" son sinónimos y se refieren a una línea que se utiliza para la producción comercial.

"Estabilidad" o "estable" significa que con respecto al componente dado, el componente se mantiene de generación en generación y, preferiblemente, al menos tres generaciones.

5 "Utilidad comercial" se define por tener un buen vigor de la planta y una alta fertilidad, de manera que el cultivo puede ser producido por los agricultores que utilizan equipos de cultivo convencionales, y el aceite con los componentes descritos se puede extraer de la semilla utilizando equipos convencionales de trituración y extracción.

10 "Elite agronómica" significa que una línea tiene características agronómicas deseables, tales como rendimiento, madurez, resistencia a enfermedades y similares, además de la resistencia a insectos y la tolerancia a herbicidas debidas a uno o varios eventos en cuestión. Cualquiera y todas estas características agronómicas y puntos de datos se pueden utilizar para identificar tales plantas, ya sea como un punto o en un extremo o en ambos extremos de un intervalo de características utilizadas para definir tales plantas.

15 Como reconocerá un experto en la técnica a la luz de esta descripción, las realizaciones preferidas de los kits de detección, por ejemplo, pueden incluir sondas y/o cebadores dirigidos a y/o que comprenden "secuencias de unión" o "secuencias de transición" (donde la secuencia flanqueante genómica de soja satisface la secuencia de inserción). Por ejemplo, esto incluye sondas polinucleotídicas, cebadores y/o amplicones diseñados para identificar una o ambas secuencias de unión (donde el inserto satisface la secuencia flanqueante), como se indica en la Tabla anterior. Un diseño común consiste en la posesión de un cebador que hibride en la región flanqueante y un cebador que hibride en el inserto. Tales cebadores suelen tener cada uno una longitud de aproximadamente al menos ~15
20 residuos. Con esta disposición, los cebadores se pueden utilizar para generar/amplificar un amplicón detectable que indica la presencia de un evento de la presente invención. Estos cebadores se pueden utilizar para generar un amplicón que abarca (e incluye) una secuencia de unión como se indicó anteriormente.

25 El cebador o los cebadores que "se tocan" en la secuencia flanqueante no están diseñados para hibridar más allá de aproximadamente 1.200 bases o más allá de la unión. Por lo tanto, los cebadores flanqueantes típicos se diseñarán para que comprendan al menos 15 residuos de cada hebra dentro de 1.200 bases en las secuencias flanqueantes desde el comienzo del inserto. Es decir, los cebadores que comprenden una secuencia de un tamaño apropiado (o hibridan con) los pares de bases 800 a 1.400 de SEQ ID NO: 14 y/o los pares de bases 13.897 a 14.497 de SEQ ID NO: 14 están dentro del alcance de la presente invención. Los cebadores de inserción también se pueden diseñar en cualquier parte, salvo los pares de bases 1.400 a 2.000 de SEQ ID NO: 14 y/o los pares de bases 13.297 a 13.896
30 de SEQ ID NO: 14, y se pueden utilizar, por ejemplo, no exclusivamente para tal diseño de cebadores.

35 Un experto en la técnica también reconocerá que los cebadores y las sondas se pueden diseñar para hibridar, en un intervalo de condiciones de hibridación y/o PCR convencionales en donde el cebador o la sonda no son perfectamente complementarios a la secuencia ilustrada. Es decir, se puede tolerar cierto grado de emparejamientos erróneos. Para un cebador de aproximadamente 20 nucleótidos, por ejemplo, típicamente no es necesario que uno o dos o más nucleótidos se unan con la hebra opuesta si la base emparejada erróneamente es interna o está en el extremo del cebador que es opuesto al amplicón. A continuación se proporcionan varias condiciones de hibridación apropiadas. Los análogos de nucleótidos sintéticos, tales como la inosina, también se pueden utilizar en las sondas. También se pueden utilizar sondas de ácido péptido nucleico (PNA), así como sondas de ADN y ARN. Lo importante es que tales sondas y cebadores tengan carácter diagnóstico (sean capaces de identificar y distinguir de manera
40 única) para determinar la presencia de un evento de la presente invención.

45 Se debe tener en cuenta que, por ejemplo, se pueden producir errores en la amplificación por PCR, lo que podría dar lugar a errores menores de secuenciación. Es decir, a menos que se indique lo contrario, las secuencias enumeradas en la presente memoria se determinaron mediante la generación de amplicones largos a partir de ADN genómicos de soja, y después clonación y secuenciación de los amplicones. No es inusual encontrar ligeras diferencias y pequeñas discrepancias en las secuencias generadas y determinadas de esta manera, debido a las numerosas rondas de amplificación que son necesarias para generar suficiente amplicón para la secuenciación a partir de ADN genómicos. Un experto en la técnica debe reconocer y advertir que cualquier ajuste necesario debido a estos tipos de errores o discrepancias comunes de secuenciación está dentro del alcance de la presente invención.

50 También se debe tener en cuenta que no es raro que alguna secuencia genómica se elimine, por ejemplo, cuando se inserta una secuencia durante la creación de un evento. Por lo tanto, también pueden aparecer algunas diferencias entre las secuencias flanqueantes en cuestión y las secuencias genómicas enumeradas en GENBANK, por ejemplo.

55 Los componentes del "inserto" de la secuencia de ADN se ilustran en las Figuras y se explican con más detalle a continuación en los Ejemplos. Las secuencias de polinucleótidos de ADN de estos componentes, o fragmentos de los mismos, se pueden utilizar como cebadores o sondas de ADN en los métodos de la presente invención.

En algunas realizaciones de la invención, se proporcionan composiciones y métodos para detectar la presencia de la región de inserción transgénica/genómica, en plantas y semillas y similares, de una planta de soja. Se proporcionan

secuencias de ADN que comprenden la secuencia de unión de la región de inserción transgénica/genómica 5' en cuestión proporcionada en la presente memoria (entre los pares de bases 800 a 1.400 de SEQ ID NO: 14), segmentos de la misma, y complementos de las secuencias ilustradas y cualquiera de sus segmentos. Se proporcionan secuencias de ADN que comprenden la secuencia de unión de la región de inserción transgénica/genómica 3' en cuestión proporcionada en la presente memoria (entre los pares de bases 13.897 a 14.497 de SEQ ID NO: 14), segmentos de la misma, y complementos de las secuencias ilustradas y cualquiera de sus segmentos. La secuencia de unión de la región de inserción abarca la unión entre el ADN heterólogo insertado en el genoma y el ADN de la célula de soja que flanquea el sitio de inserción. Tales secuencias pueden tener carácter diagnóstico para el evento dado.

Basándose en estas secuencias de inserción y límites, se pueden generar cebadores específicos del evento. El análisis por PCR demostró que las líneas de soja de la presente invención se pueden identificar en diferentes genotipos de soja mediante el análisis de los amplicones de PCR generados con estos conjuntos de cebadores específicos de eventos. Estos y otros procedimientos relacionados se pueden utilizar para identificar de forma única estas líneas de soja. Por lo tanto, los amplicones de PCR derivados de tales pares de cebadores son únicos y se pueden utilizar para identificar estas líneas de soja.

En algunas realizaciones, las secuencias de ADN que comprenden un fragmento contiguo de la nueva región de inserción transgénica/genómica son un aspecto de esta invención. Se incluyen las secuencias de ADN que comprenden una longitud suficiente de polinucleótidos de la secuencia del inserto transgénico y una longitud suficiente de polinucleótidos de secuencia genómica de soja de una o más de las tres plantas de soja mencionadas anteriormente y/o secuencias que son útiles como secuencias de cebador para la producción de un diagnóstico de producto de amplicón para una o más de estas plantas de soja.

Las realizaciones relacionadas se refieren a secuencias de ADN que comprenden al menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más nucleótidos contiguos de una porción transgénica de una secuencia de ADN identificada en la presente memoria (tal como SEQ ID NO: 1 y sus segmentos), o sus complementos, y una longitud similar de la secuencia de ADN de soja flanqueante de estas secuencias, o sus complementos. Tales secuencias son útiles como cebadores de ADN en los métodos de amplificación de ADN. Los amplicones producidos utilizando estos cebadores tienen carácter diagnóstico para cualquiera de los eventos de soja mencionados en la presente memoria. Por lo tanto, la invención también incluye los amplicones producidos por tales cebadores de ADN y cebadores homólogos.

Esta invención también incluye métodos para detectar la presencia de ADN, en una muestra, que corresponde al evento de soja al que se hace referencia en la presente memoria. Tales métodos pueden comprender: (a) poner en contacto la muestra que comprende ADN con un conjunto de cebadores que, cuando se utiliza en una reacción de amplificación de ácido nucleico con ADN de al menos uno de estos eventos de soja, produce un amplicón que tiene carácter diagnóstico para dichos uno o más eventos; (b) realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico, produciendo de ese modo el amplicón; y (c) detectar el amplicón.

Otros métodos de detección de la presente invención incluyen un método para detectar la presencia de un ADN, en una muestra, correspondiente a dicho evento, en donde dicho método comprende: (a) poner en contacto la muestra que comprende ADN con una sonda que hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con ADN de al menos uno de dichos eventos de soja y que no hibrida en las condiciones de hibridación rigurosas con una planta de soja de control (ADN sin evento de interés); (b) someter la muestra y la sonda a condiciones de hibridación rigurosas; y (c) detectar la hibridación de la sonda con el ADN.

En otras realizaciones adicionales, la presente invención incluye métodos para producir una planta de soja que comprende el evento de soja 9582.814.19.1 de la presente invención, en donde dicho método comprende las etapas de: (a) cruzar sexualmente una primera línea progenitora de soja (que comprende un casete de expresión de la presente invención, que confiere tolerancia al glufosinato a las plantas de dicha línea) y una segunda línea progenitora de soja (que carece de este rasgo de tolerancia al herbicida) produciendo de ese modo una pluralidad de plantas de progenie; y (b) seleccionar una planta de la progenie mediante el uso de marcadores moleculares. Tales métodos pueden comprender opcionalmente la etapa adicional de retro-cruzar la planta de la progenie con la segunda línea progenitora de soja para producir una planta de soja de línea genéticamente pura que comprenda el rasgo de resistencia a insectos y de tolerancia a glufosinato.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporcionan métodos para determinar la cigosidad de la progenie de un cruce con dicho evento. Dichos métodos pueden comprender poner en contacto una muestra, que comprende ADN de soja, con un conjunto de cebadores de la presente invención. Dichos cebadores, cuando se utilizan en una reacción de amplificación de ácido nucleico con ADN genómico de al menos uno de dichos eventos de soja, producen un primer amplicón que tiene carácter diagnóstico para al menos uno de dichos eventos de soja. Tales métodos comprenden adicionalmente llevar a cabo una reacción de amplificación de ácido nucleico, produciendo de ese modo el primer amplicón; detectar el primer amplicón; y poner en contacto la muestra que comprende ADN de soja con un segundo conjunto de cebadores (dicho segundo conjunto de cebadores, cuando se utiliza en una reacción de amplificación de ácido nucleico con ADN genómico de plantas de soja, produce un segundo amplicón que comprende el ADN genómico de soja nativo homólogo a la región genómica de soja); y llevar a cabo una

reacción de amplificación de ácido nucleico, produciendo de ese modo el segundo amplicón. Los métodos comprenden adicionalmente la detección del segundo amplicón y la comparación del primer y segundo amplicones en una muestra, en donde la presencia de ambos amplicones indica que la muestra es heterocigótica para la inserción del transgén.

5 Se pueden desarrollar kits de detección de ADN utilizando las composiciones descritas en la presente memoria y métodos bien conocidos en la técnica de detección de ADN. Los kits son útiles para la identificación del ADN del evento de soja en cuestión en una muestra y se pueden aplicar a métodos para la cría de plantas de soja que contienen este ADN. Los kits contienen secuencias de ADN homólogas o complementarias a los amplicones, por ejemplo, descritas en la presente memoria, o a secuencias de ADN homólogas o complementarias al ADN contenido
10 en los elementos genéticos transgénicos de los eventos en cuestión. Estas secuencias de ADN se pueden utilizar en reacciones de amplificación de ADN o como sondas en un método de hibridación de ADN. Los kits también pueden contener los reactivos y materiales necesarios para la ejecución del método de detección.

15 Una "sonda" es una molécula de ácido nucleico aislada a la que se une una marca detectable convencional o una molécula informadora (tal como un isótopo radiactivo, un ligando, un agente quimioluminiscente o una enzima). Tal sonda es complementaria a una hebra de un ácido nucleico diana, en el caso de la presente invención, a una hebra de ADN genómico de uno de dichos eventos de soja, ya sea de una planta de soja o de una muestra que incluye ADN del evento. Las sondas de acuerdo con la presente invención incluyen no solo ácidos desoxirribonucleicos o ribonucleicos, sino también poliamidas y otros materiales de sondas que se unen específicamente a una secuencia de ADN diana y se pueden utilizar para detectar la presencia de esa secuencia de ADN diana.

20 Los "cebadores" son ácidos nucleicos aislados/sintetizados que son reasociados a una hebra de ADN diana complementaria por hibridación de ácido nucleico para formar un híbrido entre el cebador y la hebra de ADN diana, a continuación se extienden a lo largo de la hebra de ADN diana por medio de una polimerasa, por ejemplo, una ADN polimerasa. Los pares de cebadores de la presente invención se refieren a su uso para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico diana, p. ej., mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otros métodos
25 convencionales de amplificación de ácido nucleico.

Las sondas y los cebadores tienen generalmente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 283, 283, 284, 286, 287, 288, 289, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 383, 383, 384, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500 o 1.000, o 2.000, o 5.000 polinucleótidos o más de longitud. Tales sondas y cebadores hibridan específicamente con una secuencia diana en condiciones de hibridación de alta rigurosidad. Preferiblemente, las sondas y los cebadores de acuerdo con la presente invención tienen una similitud de secuencia completa con la secuencia diana, aunque las sondas que difieren de la secuencia diana y que conservan la capacidad de hibridar con secuencias diana se pueden diseñar mediante métodos convencionales.
50

Los métodos para preparar y utilizar sondas y cebadores se describen, por ejemplo, en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., Vol. 1-3, ed. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989. Los pares de cebadores de PCR se pueden obtener de una secuencia conocida, por ejemplo, mediante el uso de programas informáticos destinados a tal fin.
55

Los cebadores y las sondas basados en el ADN flanqueante y las secuencias de inserción descritas en la presente memoria se pueden utilizar para confirmar (y, si es necesario, para corregir) las secuencias descritas por métodos convencionales, p. ej., mediante re-clonación y secuenciación de tales secuencias.

Las sondas de ácido nucleico y los cebadores de la presente invención hibridan en condiciones rigurosas con una secuencia de ADN diana. Se puede utilizar cualquier método convencional de hibridación o amplificación de ácidos
60

nucleicos para identificar la presencia de ADN de un evento transgénico en una muestra. Las moléculas de ácido nucleico o sus fragmentos pueden hibridar específicamente con otras moléculas de ácido nucleico bajo ciertas circunstancias. Como se emplea en la presente memoria, se dice que dos moléculas de ácido nucleico son capaces de hibridar específicamente entre sí si las dos moléculas son capaces de formar una estructura de ácido nucleico de doble hebra antiparalela. Se dice que una molécula de ácido nucleico es el "complemento" de otra molécula de ácido nucleico si presentan una complementariedad completa. Como se emplea en la presente memoria, se dice que las moléculas muestran una "complementariedad completa" cuando cada nucleótido de una de las moléculas es complementario a un nucleótido de la otra. Se dice que dos moléculas son "mínimamente complementarias" si se pueden hibridar entre sí con suficiente estabilidad para permitir que permanezcan reasociadas entre sí en al menos condiciones convencionales de "baja rigurosidad". De manera similar, se dice que las moléculas son "complementarias" si pueden hibridar entre sí con suficiente estabilidad para permitir que permanezcan reasociadas entre sí en condiciones convencionales de "alta rigurosidad". Las condiciones de rigurosidad convencionales están descritas por Sambrook. *et al.* 1989. Por lo tanto, se permiten desviaciones de la complementariedad completa, siempre que tales desviaciones no impidan completamente la capacidad de las moléculas para formar una estructura de doble hebra. Para que una molécula de ácido nucleico sirva como cebador o sonda, solo es necesario que tenga una secuencia lo suficientemente complementaria como para poder formar una estructura estable de doble hebra en el disolvente concreto y las concentraciones de sal empleados.

Como se emplea en la presente memoria, una secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia de ácido nucleico que hibridará específicamente con el complemento de la secuencia de ácido nucleico con la que se está comparando en condiciones de alta rigurosidad. El término "condiciones rigurosas" se define funcionalmente con respecto a la hibridación de una sonda de ácido nucleico con un ácido nucleico diana (es decir, con una secuencia de ácido nucleico de interés concreta) mediante el procedimiento de hibridación específico discutido por Sambrook *et al.* 1989, en 9.52-9.55. Véase también, Sambrook *et al.* 1989 en 9.47-9.52 y 9.56-9.58. Por consiguiente, las secuencias de nucleótidos de la invención se pueden utilizar por su capacidad para formar selectivamente moléculas dúplex con tramos complementarios de fragmentos de ADN.

Dependiendo de la aplicación prevista, se pueden utilizar condiciones variables de hibridación para lograr grados variables de selectividad de la sonda hacia la secuencia diana. Para aplicaciones que requieren una alta selectividad, se emplearán típicamente condiciones relativamente rigurosas para formar los híbridos, p. ej., se seleccionarán condiciones de concentración de sal relativamente bajas y/o alta temperatura, tales como las proporcionadas por NaCl de aproximadamente 0,02 M a aproximadamente 0,15 M a temperaturas de aproximadamente 50°C a aproximadamente 70°C. Las condiciones rigurosas, por ejemplo, podrían implicar el lavado del filtro de hibridación al menos dos veces con un tampón de lavado de alta rigurosidad (0,2X SSC, SDS al 0,1%, 65°C). Las condiciones de rigurosidad apropiadas que promueven la hibridación de ADN, por ejemplo, 6,0X cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45°C, seguido de un lavado con 2,0X SSC a 50°C son conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la concentración de sal en la etapa de lavado se puede seleccionar desde una rigurosidad baja de aproximadamente 2,0X SSC a 50°C hasta una rigurosidad alta de aproximadamente 0,2X SSC a 50°C. Además, la temperatura en la etapa de lavado se puede incrementar desde condiciones de baja rigurosidad a temperatura ambiente, aproximadamente 22°C, hasta condiciones de alta rigurosidad a aproximadamente 65°C. Tanto la temperatura como la concentración de sal pueden variar, o bien la temperatura o la concentración de sal se pueden mantener constantes mientras que la otra variable se cambia. Tales condiciones selectivas toleran pocos o ningún emparejamiento erróneo entre la sonda y el molde o la hebra diana. La detección de secuencias de ADN mediante hibridación es bien conocida por los expertos en la técnica, y las enseñanzas de las Patentes de estados Unidos Núm. 4.965.188 y 5.176.995 son ilustrativas de los métodos de análisis de hibridación.

En una realización particularmente preferida, un ácido nucleico de la presente invención hibridará específicamente con uno o más de los cebadores (o amplicones u otras secuencias) ilustrados o sugeridos en la presente memoria, incluyendo los complementos y fragmentos de los mismos, en condiciones de alta rigurosidad. En un aspecto de la presente invención, una molécula de ácido nucleico marcadora de la presente invención tiene la secuencia de ácido nucleico que se expone en la presente memoria en una de las secuencias ilustradas, o complementos y/o fragmentos de las mismas.

En otro aspecto de la presente invención, una molécula de ácido nucleico marcadora de la presente invención comparte entre 80% y 100% o 90% y 100% de identidad de secuencia con tales secuencias de ácido nucleico. En un aspecto adicional de la presente invención, una molécula de ácido nucleico marcadora de la presente invención comparte entre 95% y 100% de identidad de secuencia con semejante secuencia. Tales secuencias se pueden utilizar como marcadores en los métodos de mejoramiento vegetal para identificar la progenie de los cruces genéticos. La hibridación de la sonda con la molécula de ADN diana se puede detectar mediante cualquiera de los numerosos métodos conocidos por los expertos en la técnica, que pueden incluir, pero no se limitan a, etiquetas fluorescentes, etiquetas radiactivas, etiquetas basadas en anticuerpos y etiquetas quimioluminiscentes.

Respecto a la amplificación de una secuencia de ácido nucleico diana (p.ej., por PCR) utilizando un par de cebadores de amplificación concreto, las "condiciones rigurosas" son condiciones que permiten que el par de cebadores hibride solo con la secuencia de ácido nucleico diana a la que se uniría un cebador que tenga la secuencia de tipo salvaje correspondiente (o su complemento) y preferiblemente de lugar a un producto de

amplificación único, el amplicón.

El término "específico para (una secuencia diana)" indica que una sonda o cebador hibridan en condiciones de hibridación rigurosas solo con la secuencia diana en una muestra que comprende la secuencia diana.

5 Como se emplea en la presente memoria, "ADN amplificado" o "amplicón" se refiere al producto de la amplificación de ácido nucleico de una secuencia de ácido nucleico diana que forma parte de un molde de ácido nucleico. Por ejemplo, para determinar si la planta de soja resultante de un cruce sexual contiene ADN genómico de un evento transgénico de la planta de soja de la presente invención, el ADN extraído de una muestra de tejido de planta de soja se puede someter a un método de amplificación de ácido nucleico utilizando un par de cebadores que incluye un cebador derivado de la secuencia flanqueante en el genoma de la planta adyacente al sitio de inserción del ADN heterólogo insertado, y un segundo cebador derivado del ADN heterólogo insertado para producir un amplicón que tiene carácter diagnóstico para la presencia de ADN del evento. El amplicón tiene una longitud y una secuencia que también tienen carácter diagnóstico para el evento. La longitud del amplicón puede variar desde la longitud combinada de los pares de cebadores más un par de bases de nucleótidos, y/o la longitud combinada de los pares de cebadores más aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 377, 378, 379, 380, 381, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 477, 477, 479, 479, 480, 481, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499 o 500, 750, 1.000, 1.250, 1.500, 1.750, 35 2.000 o más pares de bases de nucleótidos (más o menos cualquiera de los incrementos mencionados anteriormente). Alternativamente, un par de cebadores puede derivar de la secuencia flanqueante en ambos lados del ADN insertado para producir un amplicón que incluya la secuencia de nucleótidos del inserto completa. Un miembro de un par de cebadores derivado de la secuencia genómica de la planta se puede ubicar a una distancia de la secuencia de ADN insertada. Esta distancia puede variar desde un par de bases de nucleótidos hasta 40 aproximadamente veinte mil pares de bases de nucleótidos. El uso del término "amplicón" excluye específicamente los dímeros de cebadores que se pueden formar en la reacción de amplificación térmica del ADN.

La amplificación de ácidos nucleicos se puede lograr mediante cualquiera de los diversos métodos de amplificación de ácidos nucleicos conocidos en la técnica, incluyendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se conoce en la técnica una variedad de métodos de amplificación y se describen, entre otros, en la Patente de Estados Unidos Núm. 4.683.195 y la Patente de Estados Unidos Núm. 4.683.202. Se han desarrollado métodos de amplificación por PCR para amplificar hasta 22 kb de ADN genómico. Estos métodos, así como otros métodos conocidos en la técnica de amplificación de ADN, se pueden utilizar en la práctica de la presente invención. La secuencia del inserto de ADN transgénico heterogéneo o la secuencia genómica flanqueante de un evento de soja en cuestión se pueden verificar (y corregir si fuera necesario) amplificando tales secuencias del evento utilizando cebadores derivados de las 50 secuencias proporcionadas en la presente memoria seguido de la secuenciación de ADN convencional del amplicón de PCR o del ADN clonado.

El amplicón producido por estos métodos puede ser detectado por una pluralidad de técnicas. La electroforesis en gel de agarosa y la tinción con bromuro de etidio son métodos comunes bien conocidos para detectar amplicones de ADN. Otro de tales métodos es el Genetic Bit Analysis, en el que se diseña un oligonucleótido de ADN que se solapa 55 tanto con la secuencia de ADN genómico flanqueante adyacente como con la secuencia de ADN insertada. El oligonucleótido se inmoviliza en pocillos de una placa de micropocillos. Tras la PCR de la región de interés (utilizando un cebador en la secuencia insertada y uno en la secuencia genómica flanqueante adyacente), se puede hibridar un producto de PCR de hebra sencilla con el oligonucleótido inmovilizado y servir como molde para una reacción de extensión de una sola base utilizando una ADN polimerasa y ddNTP marcados específicos para la siguiente base esperada. La lectura puede ser fluorescente o basada en ELISA. Una señal indica la presencia del inserto/secuencia flanqueante debido a una amplificación, hibridación y extensión de una sola base satisfactorias. 60

Otro método es la técnica de Pirosecuenciación como describe Winge (Innov. Pharma. Tech. 00:18-24, 2000). En

este método, se diseña un oligonucleótido que se solapa con la unión del ADN genómico adyacente y el ADN del inserto. El oligonucleótido hibrida con un producto de PCR de hebra sencilla de la región de interés (un cebador en la secuencia insertada y otro en la secuencia genómica flanqueante) y se incuba en presencia de una ADN polimerasa, ATP, sulfurilasa, luciferasa, apirasa, adenosina 5' fosfosulfato y luciferina. Los DNTP se agregan individualmente y la incorporación da como resultado una señal luminosa que se mide. La señal luminosa indica la presencia del inserto del transgén/secuencia flanqueante debido a una amplificación, hibridación y extensión de una o varias bases satisfactorias.

La polarización de fluorescencia es otro método que se puede utilizar para detectar un amplicón de la presente invención. Siguiendo este método, se diseña un oligonucleótido que solapa con la unión del ADN flanqueante genómico y el insertado. El oligonucleótido se hibrida con un producto de PCR de hebra sencilla de la región de interés (un cebador en el ADN insertado y otro en la secuencia de ADN genómico flanqueante) y se incuba en presencia de una ADN polimerasa y un ddNTP marcado con fluorescencia. La extensión de una sola base da como resultado la incorporación del ddNTP. La incorporación se puede medir como un cambio en la polarización utilizando un fluorómetro. Un cambio en la polarización indica la presencia del inserto del transgén/secuencia flanqueante debido a una amplificación, hibridación y extensión de una sola base satisfactorias.

TAQMAN® (PE Applied Biosystems, Foster City, California) es un método para detectar y cuantificar la presencia de una secuencia de ADN. Brevemente, se diseña una sonda oligonucleotídica FRET que se solapa con la unión del ADN flanqueante genómico y el insertado. La sonda FRET y los cebadores de PCR (un cebador en la secuencia de ADN del inserto y otro en la secuencia genómica flanqueante) se ciclan en presencia de una polimerasa termoestable y dNTP. Durante la amplificación específica, la ADN polimerasa Taq limpia y libera el radical fluorescente del radical de extinción en la sonda FRET. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia flanqueante/inserto transgénico debido a una amplificación e hibridación satisfactorias.

Las Balizas Moleculares se han descrito para su uso en la detección de secuencias. Brevemente, se diseña una sonda oligonucleotídica FRET que se solapa con la unión del ADN flanqueante genómico y el insertado. La estructura única de la sonda FRET hace que contenga una estructura secundaria que mantiene los radicales fluorescentes y de extinción muy cerca. La sonda FRET y los cebadores de PCR (un cebador en la secuencia de ADN del inserto y otro en la secuencia genómica flanqueante) se ciclan en presencia de una polimerasa termoestable y dNTP. Tras la amplificación por PCR satisfactoria, la hibridación de la sonda FRET con la secuencia diana da como resultado la eliminación de la estructura secundaria de la sonda y la separación espacial de los radicales fluorescentes y de extinción. Se produce una señal fluorescente. La señal fluorescente indica la presencia de la secuencia genómica flanqueante/inserto del transgén debido a una amplificación e hibridación satisfactorias.

Habiendo descrito una ubicación en el genoma de la soja que es excelente para una inserción, la presente invención también comprende una semilla de soja y/o una planta de soja que comprenden al menos un inserto del evento 9582.814.19.1 no de soja en las proximidades de esta ubicación genómica. Una opción consiste en sustituir un inserto diferente en lugar del evento de soja pDAB9582.814.19.1 ilustrado en la presente memoria. En estos aspectos generales, se puede utilizar la recombinación homóloga dirigida, por ejemplo, de acuerdo con la presente invención. Este tipo de tecnología es objeto, por ejemplo, del documento WO 03/080809 A2 y la correspondiente solicitud de Estados Unidos publicada (US 20030232410). Por lo tanto, la presente invención incluye plantas y células vegetales que comprenden un inserto heterólogo (en lugar de o con copias múltiples de los genes *cry1F*, *cry1Ac*, o *pat*), flanqueado por todas o una parte reconocible de las secuencias flanqueantes identificadas en la presente memoria (pb 1-1.400 de SEQ ID NO: 1 y pb 153-1.550 de SEQ ID NO: 2). También se podría elegir como diana una copia adicional (o copias adicionales) de *cry1F*, *cry1Ac*, o *pat* para la inserción de esta manera.

Los siguientes ejemplos se incluyen para ilustrar los procedimientos para poner en práctica la invención y para demostrar ciertas realizaciones preferidas de la invención. Estos ejemplos no se deben considerar limitantes. Los expertos en la técnica deberían apreciar que las técnicas descritas en los siguientes ejemplos representan enfoques específicos utilizados para ilustrar las realizaciones preferidas para su puesta en práctica. Sin embargo, los expertos en la técnica deberían, a la luz de la presente descripción, apreciar que se pueden realizar muchos cambios en estas realizaciones específicas a la vez que se obtienen resultados parecidos o similares sin apartarse del alcance de la invención. A menos que se indique lo contrario, todos los porcentajes son en peso y todas las proporciones de las mezclas de disolventes son en volumen, a menos que se indique lo contrario.

A menos que se indique lo contrario, se utilizan las siguientes abreviaturas.

pb par de bases

°C grados centígrados

ADN ácido desoxirribonucleico

EDTA ácido etilendiaminotetraacético

kb kilobase

µg microgramo

µL microlitro

mL mililitro

M masa molar

5 PCR reacción en cadena de la polimerasa

PTU unidad de transcripción de plantas

SDS dodecil sulfato de sodio

SSC una solución tampón que contiene una mezcla de cloruro de sodio y citrato de sodio, pH 7,0

TBE una solución tampón que contiene una mezcla de base Tris, ácido bórico y EDTA, pH 8,3

10 Las realizaciones de la presente invención se definen adicionalmente en los siguientes ejemplos. Se debe entender que estos Ejemplos se proporcionan solamente a modo de ilustración. A partir de la discusión anterior y de estos Ejemplos, un experto en la técnica puede determinar las características esenciales de esta invención, y sin apartarse del alcance de la misma, puede realizar varios cambios y modificaciones de las realizaciones de la invención para adaptarla a diversos usos y condiciones. Por lo tanto, diversas modificaciones de las realizaciones de la invención, además de las mostradas y descritas en la presente memoria, serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior. También se pretende que tales modificaciones entren dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Transformación y selección del evento de soja Cry1F y Cry1Ac pDAB9582.814.19.1

20 Se generó soja transgénica (*Glycine max*) que contenía el evento de soja pDAB9582.814.19.1 a través de transformación mediada por *Agrobacterium* de explantes de nódulos de cotiledones de soja. La cepa de *Agrobacterium* desarmada EHA101 (Hood et al., 1993), que porta el vector binario pDAB9582 (**Fig. 1**) que contiene el marcador seleccionable, *pat v6*, y los genes de interés, *cry1F v3* y *cry1Ac synpro*, dentro de la región del ADN de la hebra en T, se utilizó para iniciar la transformación. La secuencia de ADN para pDAB9582 se proporciona en SEQ ID NO: 3, que se anota a continuación en **Tabla 1**.

Tabla 1. Elementos genéticos ubicados en pDAB9582.

pb (SEQ ID NO: 3)	Elemento de construcción	Referencia
272 - 1593	Promotor de AtUbi10	Callis, et al., (1990) J. Biol Chem., 265: 12486-12493
1602 - 5048	Cry1F	Referido anteriormente
5151 - 5607	ORF23 UTR 3'	Patente de Estados Unidos Núm. 5.428147
5671 - 6187	Promotor de CsVMV	Verdaguer et al., (1996) Plant Mol. Biol., 31: 1129-1139
6197 - 9667	Cry 1AC	Referido anteriormente
9701 - 10157	ORF23 UTR 3'	Patente de Estados Unidos Núm. 5.428.147
10272 - 10788	Promotor de CsVMV	Verdaguer et al., (1996) Plant Mol. Biol., 31: 1129-1139
10796 - 11347	PAT	Wohlleben et al., (1988) Gene 70: 25-37
11450 - 12153	ORF1 UTR 3'	Huang et al., (1990) J. Bacteriol. 172: 1814-1822

30 La transformación mediada por *Agrobacterium* se llevó a cabo utilizando un procedimiento modificado de Zeng et al. (2004). Brevemente, se hicieron germinar semillas de soja (cv Maverick) en medios basales y los nódulos de los cotiledones se aislaron e infectaron con *Agrobacterium*. El inicio de los brotes, el alargamiento de los brotes y los medios de enraizamiento se complementaron con cefotaxima, timentina y vancomicina para la eliminación de *Agrobacterium*. La selección de glufosinato se empleó para inhibir el crecimiento de los brotes no transformados. Los

brotos seleccionados se transfirieron a un medio de enraizamiento para el desarrollo de la raíz y después se transfirieron a una mezcla de suelo para la aclimatación de las plántulas.

5 Los foliolos terminales de las plántulas seleccionadas fueron pintados con glufosinato para escrutar los posibles transformantes. Las plántulas escrutadas se transfirieron al invernadero, se dejó que se aclimataran y después se pintaron las hojas con glufosinato para reconfirmar la tolerancia y se consideraron posibles transformantes. Se tomaron muestras de las plantas escrutadas y se llevaron a cabo análisis moleculares para confirmar el gen marcador seleccionable y/o el gen de interés. Se permitió que las plantas de la T₀ se autofecundaran en el invernadero para dar lugar a semillas T₁.

10 Este evento, el evento de soja pDAB9582.814.19.1, se generó a partir de un producto aislado transformado independiente. Las plantas de la T₁ se retrocruzaron y se sometieron a introgresión en variedades de élite durante las generaciones posteriores. El evento se seleccionó en función de sus características únicas, tales como el sitio de inserción único, la segregación mendeliana normal, la expresión estable y una combinación superior de eficacia, incluyendo la tolerancia a los herbicidas y el rendimiento agronómico. Los siguientes ejemplos contienen los datos que se utilizaron para caracterizar el evento de soja pDAB9582.814.19.1.

15 *Ejemplo 2: Caracterización de la expresión de proteínas en el evento de soja pDAB9582.814.19.1*

Se caracterizaron las propiedades bioquímicas de las proteínas recombinantes Cry1F, Cry1Ac y PAT expresadas en el evento de soja 9582.814.19.1. El ensayo de inmunoabsorbente con enzima ligada cuantitativo (ELISA) es un ensayo bioquímico conocido en la técnica que se puede utilizar para caracterizar las propiedades bioquímicas de las proteínas y confirmar la expresión de estas proteínas en el evento de soja 9582.814.19.1.

20 *Ejemplo 2.1: Expresión de las proteínas PAT, Cry1F y Cry1Ac en tejidos vegetales*

25 Se aislaron muestras de tejidos de soja de las plantas de prueba y se prepararon para el análisis de expresión. La proteína PAT se extrajo de tejidos de plantas de soja con solución salina tamponada con fosfato que contenía el detergente Tween-20 (PBST) que contenía albúmina de suero bovino (BSA) al 0,5%. El tejido de las plantas se centrifugó; el sobrenadante acuoso se recogió, se diluyó con el tampón apropiado según fue necesario y se analizó con un kit ELISA para PAT en un formato sándwich. El kit se utilizó siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante (Envirologix, Portland, ME). Este ensayo mide la proteína PAT expresada.

30 La proteína Cry1F se extrajo de tejidos de las plantas de soja con solución salina tamponada con fosfato que contenía el detergente Tween-20 (PBST). El tejido de las plantas se centrifugó; el sobrenadante acuoso se recogió, se diluyó con el tampón apropiado según fue necesario y se analizó utilizando un kit ELISA para Cry1F en un formato sándwich. El kit se utilizó siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante (Strategic Diagnostics Inc., Newark, DE). Este ensayo mide la proteína Cry1F expresada.

35 La proteína Cry1Ac se extrajo de tejidos de las plantas de soja con solución salina tamponada con fosfato que contenía el detergente Tween-20 (PBST) que contenía albúmina de suero bovino (BSA) al 0,5%. El tejido de las plantas se centrifugó; el sobrenadante acuoso se recogió, se diluyó con el tampón apropiado según fue necesario y se analizó utilizando un kit ELISA para Cry1Ac en un formato sándwich. El kit se utilizó siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante (Strategic Diagnostics Inc., Newark, DE). Este ensayo mide la proteína Cry1Ac.

Se realizó un análisis de detección para investigar la estabilidad de la expresión y la heredabilidad tanto vertical (entre generaciones) como horizontal (entre linajes dentro de una generación) en el evento de soja pDAB9582.814.19.1.

40 *Ejemplo 2.2: Expresión de las proteínas PAT, Cry1F y Cry1Ac en tejidos vegetales*

45 Se determinaron los niveles de las proteínas Cry1F, Cry1Ac y PAT en el evento de soja 9582.814.19.1. Las proteínas solubles extraíbles se midieron utilizando un método de ensayo de inmunoabsorción cuantitativo con enzima ligada (ELISA) a partir de tejido de hoja de soja. A partir de las generaciones T₂ a T₆ en los Eventos de Soja 9582.814.19.1, la expresión era estable (no se segregaba) y uniforme en todos los linajes. La **Tabla 2** enumera el nivel medio de expresión de las proteínas transgénicas en el evento de soja 9582.814.19.1.

Tabla 2. Nivel medio de expresión de diferentes proteínas transgénicas en el evento de soja pDAB9582.814.19.1.

Nivel de expresión de diferentes proteínas (ng/cm ²)			
Evento	Cry1F	Cry1 Ac	PAT
Evento de soja pDAB9582.814.19.1	133	17,4	12

Ejemplo 3: Clonación y caracterización de la secuencia de ADN en el inserto y las regiones limítrofes flanqueantes del evento de soja pDAB9582.814.19.1

5 Para caracterizar y describir el sitio de inserción genómica, se determinó la secuencia de las regiones limítrofes de ADN-T genómicas flanqueantes del evento de soja pDAB9582.814.19.1. Se confirmó la secuencia genómica del evento de soja pDAB9582.814.19.1, que comprendía 1.400 pb de la secuencia limítrofe flanqueante 5' (SEQ ID NO: 1) y 1.398 pb de la secuencia limítrofe flanqueante 3' (SEQ ID NO: 2). La amplificación por PCR basada en las secuencias limítrofes del evento de soja pDAB9582.814.19.1 validó que las regiones limítrofes tenían su origen en la soja y que las regiones de unión eran secuencias únicas para el evento de soja pDAB9582.814.19.1. Las regiones de unión se podrían utilizar para la identificación específica del evento del evento de soja pDAB9582.814.19.1. Además, el sitio de inserción de la hebra T se caracterizó por la amplificación de un fragmento genómico correspondiente a la región de las secuencias limítrofes flanqueantes identificadas del genoma de la soja sin transformar. La comparación del evento de soja pDAB9582.814.19.1 con la secuencia genómica no transformada reveló que se había producido una deleción de aproximadamente 57 pb del locus original durante la integración de la hebra T. En general, la caracterización del inserto y la secuencia limítrofe del evento de soja pDAB9582.814.19.1 indicó que una copia intacta de la hebra T de pDAB9582 estaba presente en el genoma de la soja.

Tabla 3. Lista de cebadores y sus secuencias utilizados en la confirmación del ADN genómico de la soja en el evento de soja pDAB9582.814.19.1

SEQ ID NO:	Nombre del cebador	Tamaño (pb)	Secuencia (5' a 3')	Propósito
SEQ ID NO: 4	81419_FW3	30	TTTCTCCTATCCGTC AAATAAATCTGCTCC	confirmación del ADN genómico límite 5', utilizado con AtUbi10RV1 o RV2; con 5'IREnd-01 o 5'IREnd-02
SEQ ID NO: 5	81419_RV1	27	GGGTGATTTGGTGCC AAAAGTTATGTT	confirmación del ADN genómico límite 3', utilizado con 3'PATEnd05 o 3'PATEnd06
SEQ ID NO: 6	81419_RV2	24	TGGAGGGTCATATCG CAAAGACT	confirmación del ADN genómico límite 3', utilizado con 3'PATEnd05 o 3'PATEnd06
SEQ ID NO: 7	81419_RV3	24	GTTCTGCGTCGTGGA GGGTCATAT	confirmación del ADN genómico límite 3', utilizado con 3'PATEnd05 o 3'PATEnd06
SEQ ID NO: 8	5'IREnd-01	29	CGAGCTTTCTAATTT CAAACATTCGGGC	confirmación del ADN genómico límite 5', utilizado con 81419_FW3
SEQ ID NO: 9	5'IREnd-02	30	TCCTAGATCATCAGT TCATACAAACCTCCA	confirmación del ADN genómico límite 5', utilizado con 81419_FW3
SEQ ID NO: 10	AtUbi10RV1	29	CGGTCCTAGATCATC AGTTCATACAAACC	confirmación del ADN genómico límite 5', utilizado con 81419_FW3
SEQ ID NO: 11	AtUbi10RV2	28	CACTCGTGTTTCAGTC CAATGACCAATAA	confirmación del ADN genómico límite 5', utilizado con 81419_FW3
SEQ ID NO: 12	3'PATEnd05	20	GCTCCTCCAAGGCCA GTTAG	confirmación de ADN genómico límite 3', utilizado con 81419_RV1, RV2 o RV3
SEQ ID NO: 13	3'PATEnd06	20	CCAGTTAGGCCAGTT ACCCA	confirmación de ADN genómico límite 3', utilizado con 81419_RV1, RV2 o RV3

ES 2 714 432 T3

Tabla 4. Condiciones para la amplificación por PCR convencional de las regiones limítrofes y secuencias específicas del evento en el evento de soja pDAB9582.814.19.1.

Secuencia Diana	Conjunto de Cebadores	Mezcla de PCR	Pre-desnaturalización (°C/min)	Desnaturalización (°C/seg.)	Extensión (°C/min: seg)	Extensión final (°C/min)
límite 5'	81419_FW3/AtUbi10RV1	D	95/3	98/10	68/4:00	72/10
				32 ciclos		
límite 5'	81419_FW3/5'IREn d-01	D	95/3	98/10	68/4:00	72/10
				32 ciclos		
límite 3'	3'PATEnd05/81419_RV2	D	95/3	98/10	68/4:00	72/10
				35 ciclos		
límite 3'	3'PATEnd05/81419_RV3	D	95/3	98/10	68/4:00	72/10
				35 ciclos		
límite 3'	3'PATEnd06/81419_RV2	D	95/3	98/10	68/4:00	72/10
				35 ciclos		
límite 3'	3'PATEnd06/81419_RV3	D	95/3	98/10	68/4:00	72/10
				32 ciclos		
A través del locus de inserción	81419_FW3/81419_RV3	D	95/3	98/10	68/4:00	72/10
				32 ciclos		

5

Tabla 5 Mezcla de PCR para la amplificación por PCR convencional de las regiones limítrofes y secuencias específicas del evento en el evento de soja pDAB9582.814.19.1.

Mezcla de PCR A		Mezcla de PCR B	
Reactivo	1 x reacción (µL)	Reactivo	1 x reacción (µL)
H2O	0,8	H2O	14,6
ACCPRIME PFX SUPERMIX	20	10X TAMPÓN LA TAQ	2
---	---	MgCl2 (25 mM)	0,6
---	---	dNTP (2,5 µM)	1,6
Cebador 10 µM	0,2	Cebador 10 µM	0,1
Digestión de ADNg	1	Digestión ADNg	1
---	---	LA TAQ (5U/ul)	0,1
rxn vol:	22	rxn vol:	20
Mezcla de PCR C		Mezcla de PCR D	

Reactivo	1 x reacción (µL)	Reactivo	1 x reacción (µL)
H2O	28	H2O	11,6
10X tampón II PCR (Mg-plus)	5	10X tampón II PCR (Mg-plus)	2
MgCl ₂ [25 mM]	1,5	MgCl ₂ [25 mM]	0,6
dNTP [2,5 mM]	8	dNTP [2,5 mM]	3,2
Cebador adaptador PCR (10 µM)	1	Cebador 1 (10 µM)	0,4
Cebador anidado GOI (10 µM)	1	Cebador 2 (10 µM)	0,4
Esferas de ADN unidas	5	Molde de ADN	0,2
LA TAQ (5 U/ul)	0,5	LA TAQ (5 U/ul)	1,6
rxn vol:	50	rxn vol:	20

Ejemplo 3.1: Confirmación de secuencias genómicas de soja

Los límites flanqueantes 5' y 3' se alinearon con una secuencia de pistola génica del genoma completo del cromosoma 02 de *Glycine max*, que indicaba que el transgén del evento pDAB9582.814.19.1 de la soja se había insertado en el cromosoma 02 del genoma de la soja. Para confirmar el sitio de inserción del evento de soja pDAB9582.814.19.1 del genoma de soja, se llevó a cabo la PCR con diferentes pares de cebadores (**Fig. 2, Tabla 3, Tabla 4, y Tabla 5**). El ADN genómico del evento de soja pDAB9582.814.19.1 y otras líneas de soja transgénicas o no transgénicas se utilizaron como molde.

Para confirmar que las secuencias limítrofes 5' son correctas, se utilizaron un cebador diseñado para unirse al elemento del gen promotor At Ubi10, por ejemplo, AtUbi10RV1, y un cebador diseñado para unirse al límite del extremo 5' clonado en el cromosoma 02 del genoma de soja, cebador denominado 81419_FW3, para amplificar el segmento de ADN que abarca el elemento del gen promotor At Ubi10 hasta la secuencia limítrofe del extremo 5'. Del mismo modo, para la confirmación de la secuencia limítrofe 3' clonada se utilizaron un cebador específico de *pat*, por ejemplo 3'PATEnd05, y tres cebadores diseñados de acuerdo con la secuencia limítrofe del extremo 3' clonada, denominados 81419_RV1, 81419_RV2 y 81419_RV3, para amplificar segmentos de ADN que abarcan el gen *pat* hasta la secuencia limítrofe 3'. Los fragmentos de ADN con los tamaños esperados se amplificaron solo a partir del ADN genómico del evento de soja pDAB9582.814.19.1 con cada par de cebadores, pero no a partir de las muestras de ADN de otras líneas de soja transgénicas o del control no transgénico. Los resultados indican que las secuencias limítrofes 5' y 3' clonadas son las secuencias limítrofes flanqueantes del inserto de la hebra T para el evento de soja pDAB9582.814.19.1.

Para confirmar adicionalmente la inserción de ADN en el genoma de soja, se completó una amplificación por PCR que abarcaba las secuencias limítrofes de la soja en el ADN genómico que no contenía el inserto de la hebra T para el evento de soja pDAB9582.814.19.1. El cebador 81419_FW3, diseñado de acuerdo con la secuencia limítrofe del extremo 5', y un cebador 81419-RV3, diseñado para la secuencia limítrofe del extremo 3', se utilizaron para amplificar segmentos de ADN que contenían el locus donde se integró la hebra T pDAB9582. Como se esperaba, la amplificación por PCR completada con el par de cebadores 81419_FW3 y 81419_RV3 produjo un fragmento de ADN de aproximadamente 1,5 kb de todas las demás líneas de control de soja, pero no de pDAB9582.814.19.1. El alineamiento de las secuencias limítrofes 5' y 3' identificadas del evento de soja pDAB9582.814.19.1 con una secuencia de pistola génica del genoma completo del cromosoma 02 de *Glycine max* cromosoma reveló una delección de aproximadamente 57 pb del locus original. (**Fig. 3**). Estos resultados demostraron que el transgén del evento de soja pDAB8294 se había insertado en el sitio del cromosoma 02 del genoma de soja.

Ejemplo 4: Caracterización del evento de soja pDAB9582.814.19.1 a través de Transferencia Southern

Se utilizó el análisis de transferencia Southern para establecer el patrón de integración del evento de soja pDAB9582.814.19.1. Estos experimentos generaron datos que demostraron la integración y la integridad de los transgenes *cry1Ac* y *cry1F* dentro del genoma de la soja. El evento de soja pDAB9582.814.19.1 se caracterizó como un evento de integración simple de longitud completa que contiene una sola copia de la unidad de transcripción de la planta (PTU) *cry1Ac* y *cry1F* del plásmido pDAB9582.

Los datos de la transferencia de Southern sugirieron que un fragmento de la hebra T se insertaba en el genoma del

evento de soja pDAB9582.814.19.1. Se llevó a cabo un análisis de transferencia Southern detallado utilizando sondas específicas para el gen *cry1Ac* y *cry1F*, contenido en la región de integración de la hebra T de pDAB9582.814.19.1, y enzimas de restricción descriptivas que tienen sitios de escisión localizados dentro del plásmido y producen fragmentos de hibridación internos al plásmido o fragmentos que abarcan la unión del plásmido con el ADN genómico de la soja (fragmentos límite). Los pesos moleculares indicados a partir de la hibridación de Southern para la combinación de la enzima de restricción y la sonda fueron únicos para el evento y establecieron sus patrones de identificación. Estos análisis también mostraron que el fragmento del plásmido se había insertado en el ADN genómico de la soja sin reordenamientos de la PTU de *cry1Ac* y *cry1F*.

Ejemplo 4.1: Recogida de muestras de hoja de soja y aislamiento de ADN genómico (ADNg)

El ADN genómico se extrajo del tejido de las hojas extraído de plantas de soja individuales que contenían el evento de soja pDAB9582.814.19.1. Además, se aisló el ADNg de una planta de soja convencional, Maverick, que contiene el fondo genético que es representativo de la línea de sustancia, a falta de los genes *cry1Ac* y *cry1F*. Se extrajo ADN genómico individual de tejido de hoja liofilizado siguiendo el método CTAB convencional (Sambrook et al (1989)). Después de la extracción, el ADN se cuantificó espectrofluorométricamente utilizando el reactivo PICO GREEN (Invitrogen, Carlsbad, CA). Después se visualizó el ADN sobre un gel de agarosa para confirmar los valores del análisis PICO GREEN y para determinar la calidad del ADN.

Ejemplo 4.2: Digestión y separación de ADN

Para la caracterización molecular por transferencia Southern del evento de soja pDAB9582.814.19.1, se digirieron diez microgramos (10 µg) de ADN genómico. El ADN genómico del evento de soja pDAB9582.814.19.1 y la línea de soja no transgénica Maverick se digirieron agregando aproximadamente cinco unidades de enzima de restricción seleccionada por µg de ADN y el correspondiente tampón de reacción a cada muestra de ADN. Cada muestra se incubó a aproximadamente 37°C durante la noche. Las enzimas de restricción. *AsaI*, *HindIII*, *NsiI*, y *NdeI* se utilizaron individualmente para los productos digeridos individuales (New England Biolabs, Ipswich, MA). Las enzimas de restricción *NotI* y *ApaI* se utilizaron juntas para una doble digestión (New England Biolabs, Ipswich, MA). Además, se preparó una muestra de control de hibridación positiva combinando ADN plasmídico, pDAB9582 con ADN genómico de la variedad de soja no transgénica, Maverick. El cóctel de ADN plasmídico/ADN genómico se digirió utilizando los mismos procedimientos y enzima de restricción que las muestras de prueba.

Después de incubar las digestiones durante la noche, se agregaron 25 µl de QUICK-PRECIP PLUS SOLUTION (Edge Biosystems, Gaithersburg, MD) y las muestras de ADN digeridas se precipitaron con isopropanol. El sedimento de ADN precipitado se resuspendió en 15 µl de 1X tampón de carga (azul de bromofenol al 0,01%, EDTA 10,0 mM, glicerol al 10,0%, Tris 1,0 mM pH 7,5). Las muestras de ADN y los marcadores de tamaño molecular se sometieron a continuación a electroforesis a través de geles de agarosa al 0,85% con tampón 0,4X TAE (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) a 35 voltios durante aproximadamente 18-22 horas para lograr la separación de fragmentos. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (Invitrogen, Carlsbad, CA) y el ADN se visualizó bajo luz ultravioleta (UV).

Ejemplo 4.3: Transferencia Southern y tratamiento de membrana

El análisis de transferencia Southern se realizó esencialmente como describen Memelink, et al. (1994). Brevemente, después de la separación electroforética y la visualización de los fragmentos de ADN, los geles se despurinaron con HCl 0,25 M durante aproximadamente 20 minutos y después se expusieron a una solución desnaturalizante (NaOH 0,4 M, NaCl 1,5 M) durante aproximadamente 30 minutos, seguido de una solución neutralizante (NaCl 1,5 M, Tris 0,5 M pH 7,5) durante al menos 30 minutos. La transferencia Southern se realizó durante la noche sobre membranas de nailon utilizando un sistema de absorción con 10X SSC. Después de la transferencia, el ADN se unió a la membrana mediante entrecruzamiento UV y a continuación se lavó brevemente la membrana con una solución 2X SSC. Este procedimiento produjo membranas de transferencia Southern listas para la hibridación.

Ejemplo 4.4: Marcaje e hibridación de sondas de ADN

Los fragmentos de ADN unidos a la membrana de nailon se detectaron utilizando una sonda marcada (**Tabla 6**). Las sondas se generaron mediante una incorporación basada en PCR de un nucleótido marcado con digoxigenina (DIG), [DIG-11]-dUTP, en el fragmento de ADN amplificado del plásmido pDAB9582 utilizando cebadores específicos para elementos génicos. La generación de sondas de ADN por síntesis de PCR se llevó a cabo utilizando un PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) siguiendo los procedimientos recomendados por el fabricante.

Las sondas marcadas se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa para determinar su calidad y cantidad. A continuación se utilizó una cantidad deseada de sonda marcada para la hibridación con el ADN diana sobre las membranas de nailon para la detección de los fragmentos específicos utilizando los procedimientos esencialmente descritos para DIG EASY HYB SOLUTION (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Brevemente, las transferencias de la membrana de nailon que contenían ADN fijado se lavaron brevemente con 2X SSC y se prehibridaron con 20-25 mL de DIG EASY HYB SOLUTION precalentada en botellas de hibridación a aproximadamente 45-55°C durante aproximadamente 2 horas en un horno de hibridación. La solución de pre-

hibridación se decantó y se reemplazó por ~15 mL de DIG EASY HYB SOLUTION precalentada que contenía una cantidad deseada de sondas específicas desnaturalizadas hirviéndolas en un baño de agua durante aproximadamente cinco minutos. La etapa de hibridación se realizó a aproximadamente 45-55°C durante la noche en el horno de hibridación.

5 Al final de la hibridación de la sonda, se decantaron las DIG EASY HYB SOLUTIONS que contenían las sondas en tubos limpios y se almacenaron a aproximadamente -20°C. Estas sondas se podrían reutilizar hasta dos veces de acuerdo con el procedimiento recomendado por el fabricante. Las transferencias de membrana se enjuagaron brevemente y se lavaron dos veces en recipientes de plástico limpios con tampón de lavado de baja rigurosidad (2X SSC, SDS al 0,1%) durante aproximadamente cinco minutos a temperatura ambiente, seguido de lavado dos veces con tampón de lavado de alta rigurosidad (0,1X SSC, SDS al 0,1%) durante 15 minutos cada uno a aproximadamente 65°C. Las transferencias de membrana se lavaron brevemente con 1X tampón de ácido maleico del DIG WASH AND BLOCK BUFFER SET (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) durante aproximadamente 5 minutos. Esto estuvo seguido por un bloqueo en un 1X tampón de bloqueo durante 2 horas y una incubación con anticuerpo anti-DIG-AP (fosfatasa alcalina) (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) en un 1X tampón de bloqueo también durante un mínimo de 30 minutos. Después de 2-3 lavados con 1X tampón de lavado, las sondas de ADN específicas permanecían unidas a las transferencias de membrana y los patrones de ADN marcados con DIG se visualizaron utilizando el CDP-STAR CHEMILUMINESCENT NUCLEIC ACID DETECTION SYSTEM (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las transferencias se expusieron a una película quimioluminiscente durante uno o más puntos temporales para detectar fragmentos de hibridación y visualizar los patrones de tamaño molecular. Las películas se revelaron con un revelador de película ALL-PRO 100 PLUS (Konica Minolta, Osaka, Japón) y se escanearon las imágenes. El número y el tamaño de las bandas detectadas se documentaron para cada sonda. Se utilizaron DIG-LABELED DNA MOLECULAR WEIGHT MARKER II (DIG MWM II) y DIG-LABELED DNA MOLECULAR WEIGHT MARKER VII (DIG MWM VII), visibles después de la detección DIG como se ha descrito, para determinar el tamaño del fragmento de hibridación en las transferencias Southern.

Tabla 6 Ubicación y longitud de las sondas utilizadas en el análisis Southern

Nombre de la sonda	Elemento genético	Longitud (pb)
<i>Cry1Ac</i>	<i>cry1Ac</i>	1720
<i>Cry1F</i>	<i>cry1F</i>	1746
<i>specR</i>	Gen de resistencia a espectinomicina	750
<i>OriRep</i>	<i>Ori Rep</i>	852
<i>trfA</i>	Proteína de inicio de la replicación <i>trfA</i>	1119

Ejemplo 4.5: Resultados de la transferencia Southern

30 En la **Tabla 7**, se proporcionan los tamaños de fragmentos esperados y observados con un producto digerido y una sonda particulares, en función de los sitios de enzimas de restricción conocidos de las PTU *cry1Ac* y *cry1F*. Se identificaron dos tipos de fragmentos a partir de estos productos digeridos e hibridaciones: fragmentos internos donde los sitios de enzimas conocidos flanquean la región de la sonda y están completamente contenidos dentro de la región de inserción de la PTU de *cry1Ac* y *cry1F* y fragmentos limítrofes donde un sitio de enzima conocido está ubicado en un extremo de la región de la sonda y se espera un segundo sitio en el genoma de la soja. Los tamaños de los fragmentos limítrofes varían según el evento porque, en la mayoría de los casos, los sitios de integración de fragmentos de ADN son únicos para cada evento. Los fragmentos limítrofes proporcionan un medio para ubicar un sitio de enzimas de restricción en relación con el ADN integrado y evaluar el número de inserciones de ADN. Los análisis de transferencia Southern completados en múltiples generaciones de soja que contenían el evento de soja pDAB9582.814.19.1 produjeron datos que sugirieron que se había insertado una PTU de *cry1Ac* y *cry1F* intacta, con un bajo número de copias del plásmido pDAB9582 en el genoma de la soja del evento de soja pDAB9582.814.19.1.

Tabla 7 Fragmentos de hibridación pronosticados y observados en el análisis de transferencia Southern. 1. Los tamaños de fragmentos esperados se basan en el mapa plasmídico de pDAB9582. 2. Los tamaños de los fragmentos observados se consideran aproximadamente a partir de estos análisis y se basan en los tamaños indicados de los fragmentos DIG-LABELED DNA MOLECULAR WEIGHT MARKER II y MARK VII

Sonda de ADN	Enzimas de restricción	Muestras	Tamaños de fragmentos esperados (pb) ¹	Tamaño del fragmento observado (pb) ²
Cry1Ac	AsaI	pDAB9582	13476	>14000
		Maverick	ninguno	Ninguno
		Evento de soja pDAB9582.814.19.1	>7286	~7400
	Nsi I	pDAB9582	15326	>15000
		Maverick	Ninguno	ninguno
		Evento de soja pDAB9582.814.19.1	>9479	>10000
	No I + ApaLI	pDAB9582	4550	~4500
		Maverick	ninguno	Ninguno
		Evento de soja pDAB9582.814.19.1	4550	~4500
Cry1F	NdeI	pDAB9582	8071	~8000
		Maverick	Ninguno	ninguno
		Evento de soja pDAB9582.814.19.1	5569	~7500
	Nsi I	pDAB9582	11044	11000
		Maverick	ninguno	Ninguno
		Evento de soja pDAB9582.814.19.1	>9479	>10000
	Hind III	pDAB9582	7732	~7700
		Maverick	ninguno	ninguno
		Evento de soja pDAB9582.814.19.1	7732	~7700
EspecR	NsiI	pDAB9582	15320	~15000
		Maverick	ninguno	ninguno
		Evento de soja pDAB9582.814.19.1	ninguno	ninguno
trfA	NsiI	pDAB9582	15320	~15000
		Maverick	ninguno	ninguno
		Evento de soja pDAB9582.814.19.1	ninguno	ninguno
oriREP	NdeI	pDAB9582	5239	~5000
		Maverick	ninguno	ninguno
		Evento de soja pDAB9582.814.19.1	ninguno	ninguno

Las enzimas de restricción *AsaI* y *NsiI* se unen y escinden sitios de restricción únicos en el plásmido pDAB9582. Posteriormente, estas enzimas fueron seleccionadas para caracterizar el inserto del gen *cry1Ac* en el evento de soja pDAB9582.814.19.1. Se pronosticó que los fragmentos limítrofes de >7.286 pb o >9.479 pb hibridarían con la sonda después de los productos digeridos con *AsaI* y *NsiI*, respectivamente (**Tabla 7**). Se observaron bandas de hibridación de *cry1Ac* únicas de aproximadamente 7.400 y >10.000 pb cuando se utilizaron productos digeridos con *AsaI* y *NsiI*, respectivamente. La hibridación de la sonda con bandas de este tamaño sugiere la presencia de un único sitio de inserción para el gen *cry1Ac* en el genoma de soja del evento de soja pDAB9582.814.19.1. Se seleccionaron las enzimas de restricción *NotI* y *ApaI* para realizar una doble digestión y para liberar un fragmento que contenía la unidad de transcripción de la planta *cry1Ac* (PTU; promotor/gen/terminador) (**Tabla 7**). Los fragmentos de 4.550 pb pronosticados se observaron con la sonda después de la digestión con *NotI* y *ApaI*. Los resultados obtenidos con la digestión enzimática de las muestras de pDAB9582.814.19.1 seguida de hibridación de la sonda indicaron que una PTU *cry1Ac* intacta del plásmido pDAB9582 se había insertado en el genoma de soja del evento de soja pDAB9582.814.19.1.

Las enzimas de restricción *NdeI* y *NsiI* se unen y escinden los sitios de restricción en el plásmido pDAB9582. Posteriormente, estas enzimas fueron seleccionadas para caracterizar el inserto del gen *cry1F* en el evento de soja pDAB9582.814.19.1. Se pronosticó que los fragmentos límite de >5.569 y >9.479 pb hibridarían con la sonda después de los productos digeridos con *NdeI* y *NsiI*, respectivamente (**Tabla 7**). Se observaron bandas de hibridación de *cry1F* únicas de ~7.500 pb y > 10.000 pb cuando se utilizaban *NdeI* y *NsiI*, respectivamente. La hibridación de la sonda con bandas de este tamaño sugiere la presencia de un único sitio de inserción para el gen *cry1F* en el genoma de soja del evento de soja pDAB9582.814.19.1. Se seleccionó la enzima de restricción, *HindIII*, para liberar un fragmento que contenía la unidad de transcripción de la planta *cry1F* (PTU; promotor/gen/terminador) (**Tabla 7**). El fragmento pronosticado de 7.732 pb se observó con la sonda después de las digestiones con *HindIII*. Los resultados obtenidos con la digestión enzimática de las muestras de pDAB9582.814.19.1 seguida de la hibridación de la sonda indicaron que una PTU *cry1F* intacta del plásmido pDAB9582 se había insertado en el genoma de la soja del evento de soja pDAB9582.814.19.1.

Ejemplo 4.6: Ausencia de secuencias de la cadena principal

También se realizó un análisis de transferencia Southern para verificar la ausencia del gen de resistencia a espectinomomicina (*specR*), el elemento Ori Rep y la proteína de inicio de la replicación *trfA* (elemento *trfA*) en el evento de soja pDAB9582.814.19.1. No se esperaba una hibridación específica con la resistencia a espectinomomicina, el elemento Ori Rep o el elemento *trfA* cuando se incluían controles positivos (pDAB9582 añadido a ADN genómico Maverick) y negativos (ADN genómico Maverick) apropiados para el análisis Southern. Después de la digestión con *NsiI* y la hibridación con la sonda específica de *specR*, se observó una banda de tamaño esperado de 15.320 pb en la muestra de control positivo (pDAB9582 añadido al ADN genómico Maverick). La sonda *specR* no hibridó con las muestras del control negativo y el evento de soja pDAB9582.814.19.1. De manera similar, se detectó una banda de tamaño esperado de 15.320 pb en la muestra de control positivo (pDAB9582 más Maverick) pero ausente en las muestras del control negativo y el evento de soja pDAB9582.814.19.1 después de la digestión con *NsiI* y la hibridación con la sonda *trfA*. Se detectó otra banda de tamaño esperado de 5.329 pb en la muestra de control positivo (pDAB9582 añadido al ADN genómico Maverick) pero ausente en las muestras del control negativo y el evento de soja pDAB9582.814.19.1 después de la digestión con *NdeI* y la hibridación con la sonda específica de OriRep. Estos datos indican la ausencia del gen de resistencia a la espectinomomicina, el elemento Ori Rep y la proteína de inicio de la replicación *trfA* en el evento de soja pDAB9582.814.19.1.

Ejemplo 5: Prueba agronómica y de rendimiento en el campo y tolerancia a herbicidas

Para someter a prueba las características agronómicas y la eficacia del evento de soja pDAB9582.814.19.1, el evento se plantó en una prueba de eficacia en Santa Isabel, Puerto Rico, en octubre de 2010 y febrero de 2011. El cultivar Maverick, que se había transformado originalmente para producir el evento pDAB9582.814.19.1, se plantó en cada vivero y se incluyó como control en los experimentos. La semilla para el vivero T3 se obtuvo de selecciones de una sola planta en la fase T2 y la semilla para el vivero T4 se obtuvo de selecciones de una sola planta en la fase T3. Se sometieron a prueba cuatro linajes del evento en cada generación. Cada linaje se plantó en una parcela de 4 filas de ancho y 228,6 cm (7,5 pies) de largo. El espacio entre filas fue de 76,2 cm (30 pulgadas). Las parcelas se cultivaron con iluminación durante aproximadamente 2,5 semanas para compensar la corta duración del día en Puerto Rico. Cada vivero se pulverizó con glufosinato a una tasa de 411 g ea/ha. Una parcela de las plantas de control, Maverick, se pulverizó con la misma tasa de glufosinato y una segunda parcela no se pulverizó y se utilizó como comparación de control para el evento.

Se recopilaron datos sobre la emergencia, el aspecto general, el vigor, la altura, el encamado y la madurez. La tolerancia a los herbicidas se evaluó mediante la observación visual de clorosis, necrosis de las hojas y muerte de las plantas (**Tabla 8**).

Para las comparaciones del evento de soja pDAB9582.814.19.1 con Maverick, solamente se utilizaron los datos del bloque no pulverizado de Maverick. Para la comparación de los tratamientos pulverizados y no pulverizados, los datos del bloque del evento de soja pDAB9582.814.19.1 pulverizado con un tratamiento dado se compararon con los datos del bloque no rociado de control Maverick. El evento de soja pDAB9582.814.19.1 mostró tolerancia a la

aplicación del herbicida glufosinato. En contraste, ninguna de las plantas Maverick fue tolerante a los tratamientos con herbicidas.

Tabla 8 Comparación del evento de soja pDAB9582.814.19.1 con Maverick. Los valores son promedios de viveros T₃ y T₄. Cada vivero del evento de soja pDAB9582.814.19.1 se pulverizó con glufosinato en la fase V3 a una tasa de 411 g ea/ha.

5

Evento	Emergencia (%)	Apariencia (1 = mala a 9 = buena)	Vigor (1 = escaso a 9 = bueno)	Altura (cm)	Encamado (%)	Madurez (día)
pDAB9582.814.19.1	90	8	8	69	1	91
Maverick	82	8	8	64	1	91

Ejemplo 6: Caracterización de la actividad insecticida para el evento de soja 9582.814.19.1

Se realizaron evaluaciones de campo e invernadero para caracterizar la actividad de Cry1Ac y Cry1F en el evento de soja pDAB9582.814.19.1 contra plagas de soja criadas en laboratorio, que incluían *Anticarsia gemmatalis* (oruga de las legumbres), *Pseudoplusia inclusive* (gusano medidor de soja) y *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero). El evento de soja pDAB9582.814.19.1 se comparó con la variedad de soja no transformada Maverick, para determinar el nivel de protección de las plantas proporcionado por las proteínas Cry1F y Cry1 Ac.

10

Las pruebas de invernadero se realizaron en plantas de aproximadamente cuatro semanas de edad. Se utilizaron quince plantas para evaluar el evento de soja pDAB9582.814.19.1 y el control Maverick. Para cada especie de insecto sometida a prueba (*Anticarsia gemmatalis*, *Pseudoplusia incluye*, y *Spodoptera frugiperda*) se troquelaron 3 discos de hojas de cada planta para un total de 45 discos de hojas/plantas/insectos. Los discos de hojas de 1,4 cm de diámetro (o 1,54 cm²) se colocaron en una arena de prueba encima de agar agua al 2%, se infestaron con una larva neonatal y se sellaron con una tapa de plástico perforada. La mortalidad y el consumo de hojas se clasificaron 4 días después de la infestación. Las larvas que no respondían al sondeo suave se consideraron muertas. El daño de la hoja se evaluó visualmente puntuando el porcentaje de disco de la hoja consumido por el insecto.

15

20

Las evaluaciones de campo se realizaron mediante la recolección de muestras de hojas de parcelas de vivero con aumento de semillas en Santa Isabel, Puerto Rico y el envío de estas hojas a Indianápolis, IN para su análisis. La parcela de vivero para el evento de soja pDAB9582.814.19.1 se sembró en febrero de 2011 y consistió en aproximadamente 180 plantas dispuestas en cuatro filas. Cada fila tenía 2,3 m de largo y una separación de 76,2 cm; las plantas individuales se espaciaron 5,1 cm dentro de cada fila. En marzo de 2011, se cortó una hoja trifoliada principal, completamente expandida, ubicada aproximadamente cuatro nudos por debajo del meristema de 10 plantas con evento de soja pDAB9582.814.19.1 y 10 plantas 'Maverick'. Las hojas se colocaron en bolsas de plástico etiquetadas (una por bolsa) y se sellaron. Las hojas embolsadas fueron embaladas y trasladadas al laboratorio. En el laboratorio, se troquelaron uno o dos discos de hojas de 3,33 cm (1,31 pulgadas) de diámetro de cada hoja trifoliada para proporcionar un total de 16 discos de hojas. Cada disco de hoja se colocó en una arena de prueba sobre agar al 2%, se infestó con una larva neonata de *S. frugiperda*, y se selló con una tapa de plástico perforada. Los discos foliares se mantuvieron en una cámara climática controlada durante 7 días, momento en el que se clasificaron la mortalidad y el consumo de hoja. Las larvas que no respondían al sondeo suave se consideraron muertas. El daño de la hoja se evaluó visualmente anotando el porcentaje de disco de la hoja consumido por el insecto.

25

30

Los resultados obtenidos de estos experimentos replicados indicaron que el evento de soja pDAB9582.814.19.1 sufrió un daño significativamente menor que las plantas de control Maverick para todos los insectos sometidos a prueba. Por lo tanto, el evento de soja pDAB9582.814.19.1 tiene actividad insecticida en esta amplia gama de anfitriones.

35

Ejemplo 7: Secuencia del evento de soja pDAB9582.814.19.1

SEQ ID NO: 14 proporciona la secuencia del evento de soja pDAB9582.814.19.1. Esta secuencia contiene la secuencia flanqueante genómica 5', el inserto de la hebra T de pDAB9582 y las secuencias flanqueantes genómicas 3'. Con respecto a SEQ ID NO: 14, los residuos 1-1.400 son secuencias flanqueantes genómicas 5', los residuos 1.401 - 1.536 son residuos de un reordenamiento del plásmido pDAB9582 y 1.537 - 13.896 son residuos del inserto de la hebra T de pDAB9582, y los residuos 13.897 - 15.294 son la secuencia flanqueante 3'. La secuencia de unión o transición con respecto al extremo 5' del inserto se produce, por lo tanto, en los residuos 1.400-1.401 de SEQ ID NO: 14. La secuencia de unión o transición con respecto al extremo 3' del inserto se produce, por lo tanto, en los residuos 13.896 -13.897 de SEQ ID NO: 14.

40

Cabe señalar que la progenie del evento de soja pDAB9582.814.19.1 puede tener secuencias que se desvían ligeramente de SEQ ID NO: 14. Durante el procedimiento de introgresión y reproducción de la introducción del

evento de soja pDAB9582.814.19.1 en el genoma de las células vegetales, no es infrecuente que se produzcan algunas deleciones u otras alteraciones del inserto. Además, se pueden producir errores en la amplificación por PCR, lo que podría dar lugar a errores de secuenciación menores. Por ejemplo, las secuencias flanqueantes enumeradas en la presente memoria se determinaron mediante la generación de amplicones a partir de ADN genómicos de soja, y después clonación y secuenciación de los amplicones. No es inusual encontrar ligeras diferencias y pequeñas discrepancias en las secuencias generadas y determinadas de esta manera, debido a las numerosas rondas de amplificación que son necesarias para generar suficiente amplicón para la secuenciación a partir de ADN genómicos. Un experto en la materia debe reconocer y advertir que cualquier ajuste necesario debido a estos tipos de errores o discrepancias comunes de secuenciación está dentro del alcance de la presente invención. Por lo tanto, el segmento relevante de la secuencia plasmídica proporcionada en la presente memoria podría comprender algunas variaciones menores. De ese modo, una planta que comprende un polinucleótido que tiene cierto intervalo de identidad con la secuencia del inserto sujeto está dentro del alcance de la invención sujeto. La identidad con la secuencia de SEQ ID NO: 14 puede ser una secuencia polinucleotídica que tenga al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con una secuencia ilustrada o descrita en la presente memoria. Por lo tanto, se pueden identificar algunas diferencias entre SEQ ID NO: 14 y las plantas de la progenie con el evento de soja pDAB9582.814.19.1 y están dentro del alcance de la presente invención.

Habiendo ilustrado y descrito los principios de la presente invención, debería ser evidente para los expertos en la materia que la invención se puede modificar en disposición y detalle sin apartarse de tales principios. Los autores de la presente invención reivindican todas las modificaciones que están dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Lista de secuencias

<110> Dow Agrosciences LLC

<120> EVENTO DE SOJA 9582.814.19.1 RESISTENTE A INSECTOS Y TOLERANTE A HERBICIDAS

<130> 70969

<160> 14

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1836

<212> ADN

<213> Glycine max

<400> 1

ES 2 714 432 T3

ttaacaatga ccaagattta tgctatatag aagacttggg gggcttaagg ctatgatata 60
 ttatggatga tatggttctg atttgtgtag tttcgaagga tcaaatcaac catttgttgg 120
 tacaatggga agaaaaaatg ttttcatcat tccactctat tgaaaaagat ccaacaattg 180
 taacaccccg acgaatcaca ccggaagag aagaatccaa agattgtgta ggtatgagac 240
 tgtatagttg atgaaaactt aaaaaatta attggtacta cttataccaa caagatgcat 300
 atatttttctg atagcctatc acataagaac ttcatagtta aggttgctta acttggagta 360
 gttatgaaat gagtgacctt ttaaaataat tattgtctta ggttattgta tgaaaataaa 420
 aaataataat aaatatacat aaaaaataat aattttataa aattaacctt atattatcat 480
 taatttattt ttagattttg ttattcatta ttaatatatg aggtataaat gaaaaatata 540
 ataatgtca cattaaaaaa ttaaaatgat aattattttg aaacaaatta tttattttta 600
 tacgacaatt ataatagaaa tttgagagta aaaaaaatt gaaaattcat aaaatatatg 660
 aatatattca tttctcctat ccgtcaaata aatctgctcc ataatttatc taagcattgg 720
 tcttgtagtt cagagtaata aaattttagc aattattagt tagtacagat acatttaag 780
 aaataatata ttttagcaac tagaagtta taaaagttt taaattataa agacttatat 840
 ataaatttag taaaactaga tggatgtccc aagtaatttt tatataacta ttctcgtaca 900
 acattaatga aaatcttggt tctattattt atatgtatat tattatttta ttttgaaca 960
 atatgggatt aaaaactcct ataaattaaa tcttagaata agttttccta acatgttttt 1020
 tttatggatg ttttctaac atgtttgggt atcttagttt tgctttaatt ttgtcggatt 1080
 atttttggac tttattaggt aattttgata aaacttttag ttgatgtag tagtttactc 1140
 ttacataatg atttgatatt gaatgtgtat aattggaagg caataaatga agatcaagcg 1200
 tacaagagtt cgccaatcaa gaggatttga agagagtaaa atattatgcg aagtcccatg 1260
 tgaagaaaat ccaaccattg gaataaaaaa taaagttttt tctttggaat tgctaagct 1320
 acagcactta ttggtacttg tcttaaaaat gaaactctag ctatatttag cacttgatat 1380
 tcatgaatca aacttctcta tgaaataacc gcggtgcgca tcggtgcctg ttgatccgc 1440
 gcaagttggg atcttgaagc aagttccgct catcactaag tcgcttagca tgtttgacct 1500
 tctcggacaa ctcttcttc tctttaattg atcaacagtc agcatcatca caccaaaagt 1560
 taggcccgaa tagtttgaat ttagaaagct cgcaattgag gtctacaggc caaattcgct 1620
 cttagccgta caatattact caccggatcc taaccggtgt gatcatgggc cgcgattaaa 1680
 aatctcaatt atatttggtc taatttagtt tggattgag taaaacaaat tcggcgccat 1740
 gccgggcaa gcggccgcac aagttgtac aaaaagcag gctccgctgt gactgactga 1800
 aaagcttgtc gacctgcagg tcaacggatc aggata 1836

<210> 2
 <211> 1550
 <212> ADN
 <213> Glycine max
 <400> 2

5

ES 2 714 432 T3

gcacatagac acacacatca tctcattgat gcttggtaat aattgtcatt agattgtttt 60
 tatgcataga tgcactcgaa atcagccaat tttagacaag tatcaaacgg atgtgacttc 120
 agtacattaa aaacgtccgc aatattgatat tcattaattht tatattatct aaaagagtta 180
 aaagagaaaa aagaaatag acaatthttt tctttcacat cttctaacct aaaagatga 240
 ctctatggag gctaagttta gaaaaagata cggatctagg gtgtggaaac atcaatggtc 300
 aactcctttt atatthcaat caattgggtt ttgctttatc tttacattht ctcctthtat 360
 tttccacgtc tattcaaact tacttgtag cgggtgatta ctctthtttc tthttatagat 420
 gccaatatt tctctcctat gtattaaatt agagtatatt gtcttgaaag tgacttagta 480
 tthttagttta tagtctctta aagaacgaca cthtttattc ttaactctct ttatcaagtt 540
 ttaatthtaa attatthtaa attaagtag catacatatc ttaatthtt tcttaattat 600
 tthtaaatc cctaaattht atgtthtcat acaatgtaag agatatacat attaattata 660
 tthaaagata aaacttactt tcttgcaata aaataaagaa aaggacagtc atacaattat 720
 ataattaatc cagaattht atagcttht aacatthatt ttctatcaat taagtaataa 780
 cthtaataa aattaagagt actthtttat actcctaaaga atthatttat tthcaacaaa 840
 atcgtctgac tgtthcaatt gatcattatc agcctagcat aacctaaatt tcattthcaa 900
 acataacttht tggcaccaaa tcacctggca ttgcaaaaa gtctthtgcg atatgacct 960
 ccacgacgca gaacctgt tattcattac catcacttht aatcctaatt tccatacac 1020
 ttaccttht catgacatct tcaaagcctt tathttgctt ttcttgtht agctgthtt 1080
 acctaattht atgcatataa acaagagta aagcaaaggc aaatthttgt acgtatagtt 1140
 tttagacaga aaaggaaagt aaattataga gataatgaag tttgctctt taaattcgtc 1200
 gtgatgtht ccatcatatc taaatgctta ttctgthtt tgtctthtt ctcctthtacc 1260
 ggagthtatt ttatataatt aattaagtt agtagatcta tathcttht catagataat 1320
 ccatctctt tggaggcaca tcgatcatta atcatagagt tttgagaagc attatcacta 1380
 aagcttcaat taattatatc caataaacgg tattgggtga tgatgtht atagcaata 1440
 gataatctaa tctatacgag ccacaaaagg ggcataact ctatctcgaa gaaattggag 1500
 atgaaggat tgagattggc accttgct attattgccc actaatcatt 1550

- 5 <210> 3
- <211> 12381
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Secuencia plasmídica de pDAB9582
- 10 <400> 3

ES 2 714 432 T3

agtcagcadc	atcacaccaa	aagttaggcc	cgaatagttt	gaaattagaa	agctcgcaat	60
tgaggtctac	aggccaaatt	cgctcttagc	cgtacaatat	tactcaccgg	atcctaaccg	120
gtgtgatcat	gggccgcgat	taaaaatctc	aattatattt	ggtctaattt	agtttggtat	180
tgagtaaaac	aaattcggcg	ccatgcccgg	gcaagcggcc	gcacaagttt	gtacaaaaaa	240
gcaggctccg	cggtgactga	ctgaaaagct	tgtcgacctg	caggtcaacg	gatcaggata	300
ttcttgttta	agatgttgaa	ctctatggag	gtttgtatga	actgatgatc	taggaccgga	360
taagttccct	tcttcatagc	gaacttattc	aaagaatgtt	ttgtgtatca	ttcttgttac	420
attgttatta	atgaaaaaat	attattggtc	attggactga	acacgagtg	taaatatgga	480
ccaggcccca	aataagatcc	attgatatat	gaattaaata	acaagaataa	atcgagtcac	540
caaaccactt	gcctttttta	acgagacttg	ttcaccaact	tgatacaaaa	gtcattatcc	600
tatgcaaadc	aataatcata	caaaaatadc	caataaacact	aaaaaattaa	aagaaatgga	660
taatttcaca	atatgttata	cgataaaaga	gttacttttc	caagaaattc	actgatttta	720
taagcccact	tgcattagat	aaatggcaaa	aaaaaacaaa	aaggaaaaga	aataaagcac	780
gaagaattct	agaaaatadc	aaatadcgtt	caatgcagtg	ggaccacg	ttcaattatt	840
gccaattttc	agctccaccg	tatatttaaa	aaataaaacg	ataatgctaa	aaaaatataa	900
atcgtaacga	tcgttaaadc	tcaacggctg	gatcttatga	cgaccgtag	aaattgtggt	960
tgtcgacgag	tcagtaataa	acggcgtcaa	agtggttgca	gccggcacac	acgagtcgtg	1020
tttatcaact	caaagcacia	atacttttcc	tcaacctaaa	aataaggcaa	ttagccaaaa	1080
acaactttgc	gtgtaaacia	cgctcaatac	acgtgtcatt	ttattattag	ctattgcttc	1140
accgccttag	ctttctcgtg	acctagtcgt	cctcgtcttt	tcttcttctt	cttctataaa	1200

ES 2 714 432 T3

acaataccca aagcttcttc ttcacaattc agatttcaat ttctcaaaat cttaaaaact	1260
ttctctcaat tctctctacc gtgatcaagg taaatttctg tgttccttat tctctcaaaa	1320
tcttcgattt tgttttcgtt cgatcccaat ttcgtatatg ttctttgggt tagattctgt	1380
taatcttaga tcgaagacga ttttctgggt ttgatcgta gatatcatct taattctoga	1440
ttagggtttc ataaatatca tccgatttgt tcaaataatt tgagttttgt cgaataatta	1500
ctcttcgatt tgtgatttct atctagatct ggtgttagtt tctagtttgt gcgatcgaat	1560
ttgtcgatta atctgagttt ttctgattaa cagagatctc catggagaac aatatccaga	1620
accagtgtgt cccatacaat tgcctcaaca atcctgaagt tgagatcctc aacgaagaga	1680
ggagcaactgg acgccttccc cttgacatct ccctctccct cacaaggttc cttttgtctg	1740
agtttgttcc tgggtgagggt gtggcctttg gcctctttga cctcatctgg ggcttcatca	1800
ccccatctga ttggagcctc ttccttctcc agattgaaca attgattgag cagaggattg	1860
agacccttga aaggaacaga gccatcacca cacttctgtg ccttgctgac agctatgaaa	1920
tctacattga agcactccgt gagtgggaag ccaatcccaa caatgctcaa ctccgtgaag	1980
atgtgaggat tcgctttgcc aacacagatg acgctttgat cacagccatc aacaatttca	2040
ccctcaccag ctttgagatc cctttgctct cagtctatgt tcaagctgca aacctccact	2100
tgagcttgct tagggatgct gtgtccttcg gacaaggttg gggacttgac atagccactg	2160
tcaacaatca ctacaacaga ctcatcaact tgattcatcg ctacaccaa cattgcttgg	2220
acacctaaa tcaaggattg gagaacctca gaggcaccaa cactcgcaa tgggcaagggt	2280
tcaaccagtt tagaagggat ctcacactca ctgtgcttga catagttgct ctcttcccca	2340
actatgatgt tcgcacctac ccaattcaaa ccagctccca acttacaagg gaaatctaca	2400
cctcctcagt cattgaggac agcccagttt ctgccaaacat acccaatggt ttcaaccgtg	2460
ctgagtttgg tgtcagacca ccccatctca tggacttcat gaactccttg tttgtgactg	2520
ccgagactgt taggtcccaa actgtgtggg gaggccacct tgttagctcc cgcaacaccg	2580
ctggcaaccg catcaacttc ccatcctatg gggttttcaa tcctggtgga gccatctgga	2640
ttgcagatga ggaccaagg cctttctaca gaaccttgtc agatcctgtc tttgtcagag	2700
gaggctttgg caatccacac tatgttcttg gtttgagggg agtggctttt cagcagactg	2760
gcaccaatca caccgcaca ttcagaaaca gggcaccat tgacagcctt gatgagatcc	2820
cacctcaaga caacagcgga gcacctgga acgactactc ccatgtgctc aatcatgtca	2880
cctttgtgcg ctggcctggt gagatcagcg gttcagattc ttggagagca ccaatgttct	2940
catggacca tcgctctgcc acaccacaa acaccattga tccagagaga atcaccacaga	3000
ttcccttgggt gaaggcacac acacttcagt ctggaaccac agttgtcaga gggcctgggt	3060

ES 2 714 432 T3

tcaactggtgg agacattctc agacgcacct ctggagggcc atttgcttac accattgtca 3120
 acatcaatgg gcaacttccc cagcgttacc gtgccagaat ccgctatgct tccaccacta 3180
 acttgagaat ctatgtcaca gttgctggtg aaaggatctt tgctggtcag ttcaacaaga 3240
 caatggacac tggatgatcca ttgacattcc agtcattctc ctatgccacc atcaaacactg 3300
 cattcacctt tccaatgagc cagtccagct tcacagtggg tgcagatacc ttcagctccg 3360
 gcaatgaggt gtacattgac cgctttgagt tgattccagt gactgccaca cttgaggctg 3420
 agtctgactt ggagcgtgct cagaaggccg tgaatgctct cttcacctct tcaaatcaga 3480
 ttgggctcaa gacagatgtg actgactacc atatagaccg tgtttccaat cttggtgagt 3540
 gcctctctga tgagttctgc ttggatgaga agaaagagtt gtcagagaag gtcaagcacg 3600
 ccaagaggct ctctgatgag aggaacttgc ttcaagatcc caacttcaga gggatcaacc 3660
 gtcaattgga tcgtggatgg aggggatcaa ctgacataac cattcaagga ggtgacgatg 3720
 tgttcaagga gaactatgtc acactcttgg ggaccttga tgagtgtac ccaacatacc 3780
 tttaccagaa gatagacgaa agcaagctca aggcctacac aagataccag ttgagaggtt 3840
 acattgagga ctctcaagac cttgaaatct acctcatcag atacaacgcc aaacatgaga 3900
 cagtcaatgt gcctgggact ggttcaactc ggccacttcc agccccaagc cccattggca 3960
 agtgtgcccc tcaactcacat cacttctcct tggacataga tgttggctgc actgacttga 4020
 atgaggacct tgggtgtgtg gtgatcttca agatcaagac ccaagatggc catgcaaggt 4080
 tgggcaatct tgagtttctt gaagagaaac cacttgttgg agaagccctt gccagagtga 4140
 agagggtgga gaagaaatgg agggacaaga gagagaagtt ggagtgggaa acaaacattg 4200
 tgtacaaaaga agccaagaa tcagttgatg ctttgtttgt gaactcccaa tatgataggc 4260
 tccaagctga caccaacata gcaatgattc atgctgcaga caaaagggtt cacagcattc 4320
 gtgaagcata ccttctgaa ctctcagtga ttctggtgg caatgctgca atctttgaag 4380
 agcttgaagg acgcatcttc actgccttct ccttgtatga tgcaaggaat gtcacatcaaga 4440
 atggtgactt caacaatggc ctttctgctt ggaatgtgaa agggcacgtg gatgttgaag 4500
 agcagaacaa tcaccgctct gtccttgttg tcctgagtg ggaagctgaa gtttcacaag 4560
 aagttcgtgt ctgccctggc cgtggctaca ttcttctgt gactgcttac aaagaaggct 4620
 atggagaagg ttgtgtcacc atccacgaga tagagaacaa tactgatgaa ttgaagttca 4680
 gcaactgtgt tgaggaagag gtctacccaa acaatactgt caottgcaat gactacactg 4740
 caactcaaga agagtatgag ggcacttaca cttctcgaac ccgtggctat gatggagcct 4800
 atgagagcaa ctcatctgtg cctgctgact atgcttcagc ctatgaagag aaggcataca 4860
 ctgatggaag gcgtgacaat ccttgtgaaa gcaacagagg ctatggggac tacacacccc 4920
 tcccagctgg ctatgtgacc aaagagttgg agtactttcc tgaaactgac aaggtttggga 4980

ES 2 714 432 T3

ttgagatagg	agaaactgaa	ggcacattca	tagttgactc	tgtggagctt	ttgctcatgg	5040
aagagtgagt	agtttagctta	atcacctaga	gctcggtcac	cagcataatt	tttattaatg	5100
tactaaatta	ctgttttggt	aaatgcaatt	ttgctttctc	gggattttaa	tatcaaaatc	5160
tatttagaaa	tacacaatat	tttgttgcag	gcttgctgga	gaatcgatct	gctatcataa	5220
aaattacaaa	aaaattttat	ttgcctcaat	tatttttagga	ttggtattaa	ggacgcttaa	5280
attatttgtc	gggtcactac	gcatcattgt	gattgagaag	atcagcgata	cgaaatattc	5340
gtagtactat	cgataattta	tttgaaaatt	cataagaaaa	gcaaacgtta	catgaattga	5400
tgaacaata	caaagacaga	taaagccacg	cacatttagg	atattggccg	agattactga	5460
atattgagta	agatcacgga	atctctgaca	ggagcatgtc	ttcaattcag	cccaaattgg	5520
agttgaaata	ctcaaaccgc	cccatatgca	ggagcggatc	attcattggt	tgtttggttg	5580
cctttgcaa	catgggagtc	caaggttgcg	gccgcgcgcc	gaaaacaact	ttgtatacaa	5640
aagttgccgc	ggtgactgac	tgaactaaac	ccagaaggta	attatccaag	atgtagcatc	5700
aagaatccaa	tgtttacggg	aaaaactatg	gaagtattat	gtaagctcag	caagaagcag	5760
atcaatatgc	ggcacatatg	caacctatgt	tcaaaaatga	agaatgtaca	gatacaagat	5820
cctatactgc	cagaatacga	agaagaatac	gtagaaattg	aaaagaaga	accaggcgaa	5880
gaaaagaatc	ttgaagacgt	aagcactgac	gacaacaatg	aaaagaaga	gataaggtcg	5940
gtgattgtga	aagagacata	gaggacacat	gtaagtgga	aaatgtaagg	gcgaaagta	6000
accttatcac	aaaggaatct	tatccccac	tacttatcct	tttatatttt	tccgtgtcat	6060
ttttgccctt	gagttttcct	atataaggaa	ccaagttcgg	catttgtgaa	aacaagaaa	6120
aatttggtgt	aagctatttt	ctttgaagta	ctgaggatac	aacttcagag	aaatttgtaa	6180
gttttagat	ccaacaatgg	acaacaatcc	caacatcaac	gagtgcattc	cttacaactg	6240
cctgagcaac	cctgaggttg	aggtgctggg	tggagaacgg	attgagactg	gttacacacc	6300
tatcgacatc	tcgttgtcac	ttacccaatt	ccttttgtca	gagttcgtgc	ccggtgctgg	6360
attcgtgctt	ggacttgtcg	atatcatttg	gggaatcttt	ggtccctctc	aatgggacgc	6420
ctttcttgta	cagatagagc	agttaattaa	ccaaagaata	gaagaattcg	ctaggaacca	6480
agccatctca	aggttagaag	gcctcagcaa	cctttaccag	atctacgcag	aatcttttcg	6540
agagtgggaa	gcagaccoga	ccaatcctgc	cttaagagag	gagatgcgca	ttcaattcaa	6600
tgacatgaac	agcgcgctga	cgaccgcaat	tccgctcttc	gccgttcaga	attaccaagt	6660
tcctctttta	tccgtgtacg	tgcaggctgc	caacctgcac	ttgtcgggtc	tccgcgatgt	6720
ctccgtgttc	ggacaacggt	ggggctttga	tgccgcaact	atcaatagtc	gttataatga	6780
tctgactagg	cttattggca	actataccga	ttatgctggt	cgctggtaca	acacgggtct	6840

ES 2 714 432 T3

cgaacgtgtc tggggaccgg attctagaga ttgggtcagg tacaaccagt tcaggcgaga 6900
 gttgacacta actgtcctag acattgtcgc tctctttccc aactacgact ctaggcgcta 6960
 cccaatccgt actgtgtcac aattgaccgg ggaaatctac acaaaccag tcctcgagaa 7020
 cttcgacggg agctttcgag gctcggctca gggcatagag agaagcatca ggtctccaca 7080
 cctgatggac atattgaaca gtatcacgat ctacaccgat gcgcaccgg gttattacta 7140
 ctggtcaggg catcagatca tggcatcacc cgttgggttc tctggaccag aattcacttt 7200
 cccactttac gggactatgg gcaatgcagc tccacaacaa cgtattgttg ctcaactcgg 7260
 tcaggggcgtg tatagaacct tgtccagcac tctatatagg agacctttca acatcggcat 7320
 caacaatcaa caattgtctg tgcttgacgg gacagaatth gcctatggaa cctcctcaa 7380
 tctgccatcc gctgtctaca gaaagagcgg aacagttgat agcttgatg agatccctcc 7440
 acagaacaac aacgttccac ctaggcaagg gtttagccat cgccttagcc atgtgtccat 7500
 gttccgttca ggctttagta atagcagcgt tagtatcatc agagctccga tgttctcttg 7560
 gatacatcgt agtgcctgagt ttaacaacat aattgcatcc gatagcatta ctacagatccc 7620
 agctgtcaag gggaaactttc tctttaatgg ttctgtcatt tcaggaccag gattcactgg 7680
 aggcgacttg gttaggctga attcttccgg caacaacatc cagaatagag ggtatattga 7740
 agtgccatt cacttcccat cgacatctac cagatatcgt gttcgtgtaa ggtatgcctc 7800
 tgttaccctt attcacctca acgtcaattg gggtaattcc tccatctttt ccaatacagt 7860
 accagcgaca gctacatcct tggataatct ccaatctagc gatttcggtt acttcgaaag 7920
 tgccaatgcc ttcacctctt ccctaggtaa catagtaggt gttagaaatt tctccggaac 7980
 cgccggagtg ataatcgacc gottcgaatt cattcccgtt actgcaacgc tcgaggcaga 8040
 gtctgacttg gaaagagcac agaagggcgt gaatgctctg ttcacttcgt ccaatcagat 8100
 tgggctcaag acagatgtga ctgactatca catcgatcgc gtttccaacc ttgttgagtg 8160
 cctctctgat gagttctgtt tggatgagaa gaaggagtg tccgagaagg tcaaactgc 8220
 taagcgactt agtgatgagc ggaacttgct tcaagatccc aactttcggg ggatcaacag 8280
 gcaactagat cgtggatgga ggggaagtac ggacatcacc attcaaggag gtgatgatgt 8340
 gttcaaggag aactatgtta cgctcttggg tacctttgat gagtgctatc caacatacct 8400
 gtaccagaag atagatgaat cgaaactcaa agcctacaca agataccagt tgagaggtta 8460
 catcgaggac agtcaagacc ttgagatcta cctcatcaga tacaacgcca aacatgagac 8520
 agtcaatgtg cctgggacgg gttcactctg gccactttca gcccgaagtc ccatcggcaa 8580
 gtgtgcccat cactcacacc acttctcctt ggacatagac gttggctgta ccgacctgaa 8640
 cgaagacctc ggtgtgtggg tgatcttcaa gatcaagact caagatggcc atgccaggct 8700
 aggcaatctg gagtttctag aagagaaacc acttggtgga gaagccctcg ctagagtgaa 8760

ES 2 714 432 T3

gagggctgag aagaagtgga gggacaagag agagaagttg gaatgggaaa caaacattgt 8820
gtacaaagaa gccaaagaaa gcgttgacgc tctgtttgtg aactctcagt atgataggct 8880
ccaagctgat accaacatag ctatgattca tgctgcagac aaacgcggtc atagcattcg 8940
ggaagcttac cttcctgaac ttagcgtgat tccgggtgtc aatgctgcta tctttgaaga 9000
gttagaaggg cgcaccttca ctgcattctc cttgtatgat gcgaggaatg tcatcaagaa 9060
tggtgacttc aacaatggcc tatcctgctg gaatgtgaaa gggcacgtag atgtagaaga 9120
acagaacaat caccgctctg tccttgttgt tcctgagtgg gaagcagaag tttcacaaga 9180
agttcgtgtc tgtcctggtc gtggctacat tcttcgtgtt accgcgtaca aagaaggata 9240
cggagaaggt tgcgtcacca tacacgagat tgagaacaac accgacgagc tgaagttcag 9300
caactgcgctc gaggaggaag tctacccaaa caacaccgta acttgcaatg actacactgc 9360
gactcaagag gagtatgagg gtacttacac ttctcgcaat cgaggatacg atggagccta 9420
tgagagcaac tcttctgtac ccgctgacta tgcatcagcc tatgaggaga aggcttacac 9480
cgatggagct agggacaatc cttgcgaatc taacagaggc tatggggact acacaccggt 9540
accagccggc tatgtcacca aagagttaga gtactttcca gaaaccgaca aggtttggat 9600
tgagattgga gaaacggaag gaacattcat tgttgatagc gtggagttac ttctgatgga 9660
ggaatgagta gttagcttaa tcacctagag ctcggttacc tatcaaatc tatttagaaa 9720
tacacaatat tttgttgacg gcttgctgga gaatcgatct gctatcataa aaattacaaa 9780
aaaattttat ttgcctcaat tatttttagga ttggtattaa ggacgcttaa attatttgtc 9840
gggtcactac gcacattgtg gattgagaag atcagcgata cgaaatattc gtagtactat 9900
cgataattta tttgaaaatt cataagaaaa gcaaaccgta catgaattga tgaaacaata 9960
caaagacaga taaagccacg cacatttagg atattggccg agattactga atattgagta 10020
agatcacgga atttctgaca ggagcatgtc ttcaattcag cccaaatggc agttgaaata 10080
ctcaaaccgc cccatattgca ggagcggatc attcattggt tgtttgggtg cctttgccaa 10140
catgggagtc caaggttgcg gccgcgcgcc gaccagctt tcttgtaaa agtggttgcg 10200
gccgcttaat taaatttaaa tgcccgggcg tttaacgcg gccgcttaat taaggccggc 10260
ctgcagcaaa ccagaaggt aattatccaa gatgtagcat caagaatcca atgtttacgg 10320
gaaaaactat ggaagtatta tgtaagctca gcaagaagca gatcaatag cggcacatat 10380
gcaacctatg ttcaaaaatg aagaatgtac agatacaaga tcctatactg ccagaatacg 10440
aagaagaata cgtagaaatt gaaaaagaag aaccaggcga agaaaagaat cttgaagacg 10500
taagcaactga cgacaacaat gaaaagaaga agataaggtc ggtgattgtg aaagagacat 10560
agaggacaca tgtaaggtgg aaaatgtaag ggcggaaagt aaccttatca caaaggaatc 10620

ES 2 714 432 T3

ttatcccca ctacttatcc ttttatatth ttccgtgtca tttttgccct tgagttttcc 10680
tatataagga accaagttcg gcatttgtga aaacaagaaa aaatttgggtg taagctatth 10740
tctttgaagt actgaggata caacttcaga gaaatttghta agtttghtaga tctccatgtc 10800
tccggagagg agaccagttg agattaggcc agctacagca gctgatatgg ccgcggtttg 10860
tgatatcgth aaccattaca ttgagacgtc tacagtgaac tttaggacag agccacaaac 10920
accacaagag tggattgatg atctagagag gttgcaagat agataccctt ggttggttgc 10980
tgaggttgag ggtgttgtgg ctggtattgc ttacgctggg ccctggaagg ctaggaacgc 11040
ttacgattgg acagttgaga gtactgttha cgtgtcacat aggcatacaa ggttgggctt 11100
aggatccaca ttgtacacac atttgcttaa gtctatggag gcgcaaggtt ttaagtctgt 11160
ggttgcgtgtt ataggccttc caaacgatcc atctgttagg ttgcatgagg ctttgggata 11220
cacagccggg ggtacattgc gcgagctgg atacaagcat ggtggatggc atgatgttgg 11280
tttttgcaa agggattttg agttgccagc tcctccaagg ccagttaggc cagttaccca 11340
gatctgaggt accctgagct tgagcttatg agcttatgag cttagagctc ggatccacta 11400
gtaacggccg ccagtggtct ggaattcgcc cttgactaga taggcgcca gatcggcggc 11460
aatagcttct tagcgccatc ccgggttgat cctatctgtg ttgaaatagt tgcggtgggc 11520
aaggctctct ttcaaaaaga caggcgcca aaggaacca aggtgaggtg ggctatggct 11580
ctcagttcct tgtggaagcg cttggtctaa ggtgcagagg tgttagcggg atgaagcaaa 11640
agtgtccgat tgtaacaaga tatgttgatc ctacgtaagg atattaaagt atgtatcat 11700
cactaatata atcagtgat tccaatatgt actacgattt ccaatgtctt tattgtcgcc 11760
gtatgtaatc ggcgtcacia aataatcccc ggtgactttc ttttaatcca ggatgaaata 11820
atatgttatt ataatttttg cgatttggtc cgttatagga attgaaagtgt gcttgcggtc 11880
gccaccactc ccatttcata attttacatg tatttgaaaa ataaaaattt atggtattca 11940
atthaaacac gtatacttgt aaagaatgat atcttgaaag aaatatagtt taaatattta 12000
ttgataaaat aacaagtcag gtattatagt ccaagcaaaa acataaattt attgatgcaa 12060
gtthaaattc agaaatattt caataactga ttatatcagc tggtagattg ccgtagatga 12120
aagactgagt gcgatattat ggtgtaatac atagcggccg ggtttctagt caccggttag 12180
gatccgttha aactcgaggc tagcgcatgc acatagacac acacatcatc tcattgatgc 12240
ttggtaaata ttgtcattag attgttttha tgcatagatg cactcgaaat cagccaattt 12300
tagacaagta tcaaacggat gtgacttcag tacattaaaa acgtccgcaa tgtgttatta 12360
agttgtctaa gcgtcaattt g 12381

<210> 4
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Cebador 81419_FW3

<400> 4
tttctctat ccgtcaaata aatctgctcc 30

10

<210> 5

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

 <220>
 5 <223> Cebador 81419_RV1

 <400> 5
 gggtgatttg ggcctaaaag ttatgtt 27

 <210> 6
 <211> 24
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador 81419_RV2

 <400> 6
 15 tggagggtca tatcgcaaaa gact 24

 <210> 7
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> Cebador 81419_RV3

 <400> 7
 gttctgctgc gggagggtc atat 24

 <210> 8
 <211> 29
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador 5'IREnd-01

 30 <400> 8
 cgagctttct aattcaaac tattcgggc 29

 <210> 9
 <211> 30
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador 5'IREnd-02

 <400> 9
 40 tcctagatca tcagttcata caaacctcca 30

 <210> 10
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador AtUbi10RV1

 <400> 10
 45 cggtctaga tcatcagttc atacaaacc 29

 <210> 11
 <211> 28
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 714 432 T3

<220>
<223> Cebador AtUbi10RV2

<400> 11
cactcgtgtt cagtccaatg accaataa 28

5 <210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador 3'PATEnd05

<400> 12
gctcctccaa ggccagttag 20

10 <210> 13
 <211> 20
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador 3'PATEnd06

<400> 13
ccagttaggc cagttaccca 20

15 <210> 14
 <211> 15294
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de evento de soja 9582.814.19.1

20 <400> 14

25

ES 2 714 432 T3

ttaacaatga ccaagattta tgctatatag aagacttggg gggcttaagg ctatgatata 60
 ttatggatga tatggttctg atttgtgtag tttcgaagga tcaaatcaac catttgttgg 120
 tacaatggga agaaaaaatg ttttcatcat tccactctat tgaaaaagat ccaacaattg 180
 taacaccccc acgaatcaca ccggaaagag aagaatccaa agattgtgta ggtatgagac 240
 tgtatagttg atgaaaactt aaaaaatta attggtacta cttataccaa caagatgcat 300
 atatttttctg atagcctatc acataagaac ttcatagtta aggggtgctta acttgagta 360
 gttatgaaat gagtgacctt taaaataat tattgtctta ggttattgta tgaaaataaa 420
 aaataataat aaatatacat aaaaaataat aattttataa aattaacctt atattatcat 480
 taatttattt ttagattttg ttattcatta ttaatatatg aggtataaat gaaaaatata 540
 ataatgtca cattaaaaaa ttaaaatgat aattattttg aaacaaatta tttattttta 600
 tacgacaatt ataatagaaa tttgagagta aaaaaaatt gaaaattcat aaaatatatg 660
 aatatattca tttctcctat ccgtcaaaata aatctgctcc ataatttattc taagcattgg 720
 tctttagatt cagagtaata aaatttttagc aattattagt tagtacagat acatttaaag 780
 aaataatata ttttagcaac tagaagtta taaaagtta taaattataa agacttatat 840
 ataaatttag taaaactaga tggatgtccc aagtaatttt tatataacta ttctcgtaca 900
 acattaatga aaatcttgtt tctattattt atatgtatat tattatttta ttttgaaca 960
 atatgggatt aaaaactcct ataaattaa tcttagaata agttttccta acatgttttt 1020
 tttatggatg ttttcctaac atgtttgggt atcttagttt tgctttaatt ttgtcggatt 1080
 atttttggac tttattaggt aattttgata aaacttttag ttgatgttag tagtttactc 1140
 ttacataatg atttgatatt gaatgtgat aattggaagg caataaatga agatcaagcg 1200
 tacaagagtt cgccaatcaa gaggatttga agagagtaaa atattatgcg aagtcccatg 1260
 tgaagaaaat ccaaccattg gaataaaaaa taaagttttt tctttggaat tgctaattgct 1320
 acagcactta ttggtacttg tcttaaaaat gaaactctag ctatatttag cacttgatat 1380
 tcatgaatca aacttctcta tgaaataacc gcggtgcgca tcggtgcctg ttgatcccgc 1440
 gcaagttggg atcttgaagc aagtccgct catcactaag tcgcttagca tgtttgacct 1500
 tctcggacaa ctcttcttc tctttaattg atcaacagtc agcatcatca caccaaaagt 1560
 taggcccgaa tagtttgaat ttagaaagct cgcaattgag gtctacagcg caaattcgct 1620
 cttagcogta caatattact caccggatcc taaccggtgt gatcatgggc cgcgattaaa 1680
 aatctcaatt atatttggtc taatttagtt tggattgag taaaacaaat tcggcgccat 1740
 gcccgggcaa gcggccgcac aagtttgtag aaaaaagcag gctccgcggt gactgactga 1800
 aaagcttgtc gacctgcagg tcaacggatc aggatattct tgtttaagat gttgaactct 1860

ES 2 714 432 T3

atggagggtt gtatgaactg atgatctagg accggataag ttcccttctt catagcgaac 1920
ttattcaaag aatgttttgt gtatcattct tgttacattg ttattaatga aaaaatatta 1980
ttggtcattg gactgaacac gagtgttaaa tatggaccag gccccaata agatccattg 2040
atatatgaat taaataacaa gaataaatcg agtcaccaa ccacttgctt tttttaacga 2100
gacttgttca ccaacttgat acaaaagtca ttatcctatg caaatcaata atcatacaa 2160
aatatccaat aacctataaa aattaaaaga aatggataat ttcacaatat gttatacgat 2220
aaagaagtta cttttccaag aaattcactg attttataag cccacttgca ttagataaat 2280
ggcaaaaaaa aacaaaaag aaagaaata aagcacgaag aattctagaa aatacgaat 2340
acgcttcaat gcagtgggac ccacggttca attattgcca attttcagct ccaccgtata 2400
tttaaaaaat aaaacgataa tgctaaaaaa atataaatcg taacgatcgt taaatctcaa 2460
cggctggatc ttatgacgac cgttagaaat tgtggtgtc gacgagtcag taataaacgg 2520
cgtcaaagtg gttgcagccg gcacacacga gtcgtgttta tcaactcaa gcacaaatac 2580
ttttcctcaa cctaaaaata aggcaattag ccaaaaaaa ctttgctgtt aaacaacgct 2640
caatacacgt gtcattttat tattagctat tgcttcaccg ccttagcttt ctgctgacct 2700
agtcgtcctc gtcttttctt cttcttcttc tataaaaaaa tacccaaagc ttcttcttca 2760
caattcagat ttcaatttct caaaatctta aaaactttct ctcaattctc tctaccgtga 2820
tcaaggtaaa tttctgtggt ccttattctc tcaaaatctt cgattttggt ttcggtcgat 2880
cccaatttcg tatatgttct ttggtttaga ttctgttaat cttagatcga agacgatttt 2940
ctgggtttga tcgttagata tcactttaat tctcgattag ggtttcataa atatcatccg 3000
attgttcaa ataatttgag ttttgtcgaa taattactct tcgatttggt atttctatct 3060
agatctgggt ttagtttcta gtttgtcgga tcgaatttgt cgattaatct gagtttttct 3120
gattaacaga gatctccatg gagaacaata tccagaacca gtgtgtccca tacaattgcc 3180
tcaacaatcc tgaagttgag atcctcaacg aagagaggag cactggacgc cttccccttg 3240
acatctccct ctccctcaca aggttccttt tgtctgagtt tgttcctggt gtgggtgtgg 3300
cctttggcct ctttgacctc atctgggct tcatcaccoc atctgattgg agcctcttcc 3360
ttctccagat tgaacaattg attgacgaga ggattgagac ccttgaaagg aacagagcca 3420
tcaccacact tcgtggcctt gctgacagct atgaaatcta cattgaagca ctccgtgagt 3480
gggaagccaa tccaacaat gctcaactcc gtgaagatgt gaggattcgc tttgccaaca 3540
cagatgacgc tttgatcaca gccatcaaca atttcacct caccagcttt gagatccctt 3600
tgctctcagt ctatgttcaa gctgcaaacc tccacttgag cttgcttagg gatgctgtgt 3660
ccttcggaca aggttgggga cttgacatag ccaactgcaa caatcactac aacagactca 3720
tcaacttgat tcatcgctac accaaacatt gcttgacac ctacaatcaa ggattggaga 3780

ES 2 714 432 T3

acctcagagg caccaacact cgccaatggg caaggttcaa ccagtttaga agggatctca	3840
cactcactgt gcttgacata gttgctctct tcccacta tgatgttcgc acctacccaa	3900
ttcaaaccag ctcccactt acaagggaaa tctacacctc ctcagtcatt gaggacagcc	3960
cagtttctgc caacataccc aatggtttca accgtgctga gtttgggtgc agaccacccc	4020
atctcatgga cttcatgaac tccttgtttg tgactgccga gactgttagg tcccactg	4080
tgtggggagg ccacctgtt agctcccgca acaccgctgg caaccgcatc aacttcccat	4140
cctatggggg tttcaatcct ggtggagcca tctggattgc agatgaggac ccaagcctt	4200
tctacagaac cttgtcagat cctgtctttg tcagaggagg ctttggcaat ccacactatg	4260
ttcttggtt gaggggagt gcttttcagc agactggcac caatcacacc cgcacattca	4320
gaaacagcgg caccattgac agccttgatg agatcccacc tcaagacaac agcgggagcac	4380
cctggaacga ctactcccat gtgctcaatc atgtcacctt tgtgcgctgg cctggtgaga	4440
tcagcggttc agattcttg agagcaccaa tgttctcatg gacctatgc tctgccacac	4500
ccacaaacac cattgatcca gagagaatca cccagattcc cttggtgaag gcacacacac	4560
ttcagtctgg aaccacagtt gtcagagggc ctgggttcac tggaggagac attctcagac	4620
gcacctctgg agggccattt gcttacacca ttgtcaacat caatgggcaa cttccccagc	4680
gttaccgtgc cagaatccgc tatgcttcca ccactaactt gagaatctat gtcacagttg	4740
ctggtgaaag gatctttgct ggtcagttca acaagacaat ggacactggt gatccattga	4800
cattccagtc attctctat gccaccatca aactgcatt cacctttcca atgagccagt	4860
ccagcttcac agtgggtgca gataccttca gctccggcaa tgaggtgtac attgaccgct	4920
ttgagttgat tccagtgact gccacacttg aggctgagtc tgacttggag cgtgctcaga	4980
aggccgtgaa tgctctcttc acctcttcaa atcagattgg gctcaagaca gatgtgactg	5040
actaccatat agaccgtgtt tccaatcttg ttgagtgcct ctctgatgag ttctgcttgg	5100
atgagaagaa agagttgtca gagaaggta agcacgcaa gaggctctct gatgagagga	5160
acttgcttca agatcccaac ttcagagggg tcaaccgtca attggatcgt ggatggaggg	5220
gatcaactga cataaccatt caaggaggtg acgatgtgtt caaggagaac tatgtcacac	5280
tcttggggac ctttgatgag tgctacccaa cataccttta ccagaagata gacgaaagca	5340
agctcaaggc ctacacaaga taccagttga gaggttacat tgaggactct caagacctg	5400
aatctacct catcagatac aacgccaac atgagacagt caatgtgcct gggactggtt	5460
cactctggcc actttcagcc ccaagcccca ttggcaagtg tgcccatcac tcacatcact	5520
tctccttggg catagatgtt ggctgcactg acttgaatga ggaccttggg gtgtgggtga	5580
tcttcaagat caagacccaa gatggccatg caaggttggg caatcttgag tttcttgaag	5640

ES 2 714 432 T3

agaaaccact tgttggagaa gcccttgcca gagtgaagag ggctgagaag aaatggaggg 5700
 acaagagaga gaagttggag tgggaaacaa acattgtgta caaagaagcc aaagaatcag 5760
 ttgatgcttt gtttgtgaac tcccaatatg ataggctcca agctgacacc aacatagcaa 5820
 tgattcatgc tgcagacaaa agggttcaca gcattcgtga agcatacctt cctgaactct 5880
 cagtgattcc tgggttcaat gctgcaatct ttgaagagct tgaaggacgc atcttactg 5940
 ccttctcctt gtatgatgca aggaatgtca tcaagaatgg tgacttcaac aatggccttt 6000
 cctgctggaa tgtgaaaggg cacgtggatg ttgaagagca gaacaatcac cgetctgtcc 6060
 ttgttgtccc tgagtgggaa gctgaagttt cacaagaagt tcgtgtctgc cctggctgtg 6120
 gctacattct tcgtgtgact gcttacaag aaggctatgg agaaggttgt gtcacatcc 6180
 acgagataga gaacaatact gatgaattga agttcagcaa ctgtgttgag gaagaggtct 6240
 acccaacaa tactgtcact tgcaatgact acactgcaac tcaagaagag tatgagggca 6300
 cttacacttc tcgcaaccgt ggctatgatg gaggctatga gagcaactca tctgtgcctg 6360
 ctgactatgc ttcagcctat gaagagaagg catacactga tgggaaggcgt gacaatcctt 6420
 gtgaaagcaa cagaggctat ggggactaca caccctccc agctggctat gtgaccaaag 6480
 agttggagta ctttctgaa actgacaagg tttggattga gataggagaa actgaaggca 6540
 cattcatagt tgactctgtg gagcttttgc tcatggaaga gtgagtagtt agcttaatca 6600
 cctagagctc ggtcaccagc ataattttta ttaatgtact aaattactgt tttgttaaat 6660
 gcaattttgc tttctcggga ttttaatatc aaaatctatt tagaaataca caatattttg 6720
 ttgcaggctt gctggagaat cgatctgcta tcaaaaaat tacaacaaaa ttttatttgc 6780
 ctcaattatt ttaggattgg tattaaggac gcttaaatta tttgtcgggt cactacgcat 6840
 cattgtgatt gagaagatca gcgatacgaa atattcgtag tactatcgat aatttatttg 6900
 aaaattcata agaaaagcaa acgttacatg aattgatgaa acaatacaaa gacagataaa 6960
 gccacgcaca tttaggatat tggccgagat tactgaatat tgagtaagat cacggaatth 7020
 ctgacaggag catgtcttca attcagccca aatggcagtt gaaatactca aaccgcccc 7080
 tatgcaggag cggatcattc attgtttgtt tggttgcctt tgccaacatg ggagtccaag 7140
 gttcgggccg cgcgccgaaa acaactttgt atacaaaagt tgccgcggtg actgactgaa 7200
 ctaaaccag aaggttaatta tccaagatgt agcatcaaga atccaatgtt tacgggaaaa 7260
 actatggaag tattatgtaa gctcagcaag aagcagatca atatgcggca catatgcaac 7320
 ctatgttcaa aaatgaagaa tgtacagata caagatccta tactgccaga atacgaagaa 7380
 gaatacgtag aaattgaaaa agaagaacca ggccaagaaa agaactctga agacgtaagc 7440
 actgacgaca acaatgaaaa gaagaagata aggtcgtgta ttgtgaaaga gacatagagg 7500
 acacatgtaa ggtgaaaaat gtaagggcgg aaagtaacct tatcacaag gaatcttctc 7560

ES 2 714 432 T3

ccccactact tatectttta tatttttccg tgtcattttt gcccttgagt tttcctatat 7620
 aaggaaccaa gttcggcatt tgtgaaaaca agaaaaaatt tgggtgaagc tattttcttt 7680
 gaagtactga ggatacaact tcagagaaat ttgtaagttt gtagatccaa caatggacaa 7740
 caatcccaac atcaacgagt gcattcctta caactgcctg agcaaccctg aggttgaggt 7800
 gctgggtgga gaacggattg agactggtta cacacctatc gacatctcgt tgtcacttac 7860
 ccaattcctt ttgtcagagt tcgtgcccg tgctggattc gtgcttgac ttgtcgatat 7920
 catttgogga atctttggtc cctctcaatg ggacgccttt cttgtacaga tagagcagtt 7980
 aattaaccaa agaatagaag aattcgctag gaaccaagcc atctcaaggt tagaaggcct 8040
 cagcaacctt taccagattt acgcagaatc ttttcgagag tgggaagcag acccgaccaa 8100
 tcctgcctta agagaggaga tgcgcattca attcaatgac atgaacagcg cgctgacgac 8160
 cgcaattccg ctcttcgccg ttcagaatta ccaagttcct cttttatccg tgtacgtgca 8220
 ggctgccaac ctgcacttgt cgggtctccg cgatgtctcc gtgttcggac aacggtgggg 8280
 ctttgatgcc gcaactatca atagtcgtta taatgatctg actaggctta ttggcaacta 8340
 taccgattat gctgttcgct ggtacaacac gggctctgaa cgtgtctggg gaccgattc 8400
 tagagattgg gtcaggtaca accagttcag gcgagagttg acactaactg tcctagacat 8460
 tgtcgtctc tttcccaact acgactctag gcgctacca atccgtactg tgtcacaatt 8520
 gacccgggaa atctacacaa acccagtcct cgagaacttc gacggtagct ttcgaggctc 8580
 ggctcagggc atagagagaa gcatcaggtc tccacacctg atggacatat tgaacagtat 8640
 cacgatctac accgatgcgc accgcgggta ttactactgg tcagggcacc agatcatggc 8700
 atcaccogtt gggttctctg gaccagaatt cactttccca ctttacggga ctatgggcaa 8760
 tgcagctcca caacaacgta ttgttgctca actcggtcag ggcgtgtata gaacctgtc 8820
 cagcactcta tataggagac cttcaacat cggcatcaac aatcaacaat tgtctgtgct 8880
 tgacgggaca gaatttgcct atggaacctc ctcaaactc ccatccgctg tctacagaaa 8940
 gagcggaaac gttgatagct tggatgagat ccctccacag aacaacaacg ttccacctag 9000
 gcaagggttt agccatcgcc ttagccatgt gtccatgtc cgttcaggct ttagtaatag 9060
 cagcgttagt atcatcagag ctccgatgtt ctcttgata catcgtagtg ctgagttaa 9120
 caacataatt gcatccgata gcattactca gatcccagct gtcaagggga actttctctt 9180
 taatggttct gtcatttcag gaccaggatt cactggaggc gacttgggta ggctgaattc 9240
 ttccggcaac aacatccaga atagagggta tattgaagtg cccattcact tcccatcgac 9300
 atctaccaga tatcgtgttc gtgtaaggta tgctctgtt acccctattc acctcaacgt 9360
 caattggggg aattcctcca tcttttcaa tacagtacca gcgacagcta catccttggg 9420

ES 2 714 432 T3

taatctccaa tctagcgatt tccggttactt cgaaagtgcc aatgccttca cctcttcctt	9480
aggtaacata gtaggtgtta gaaatttctc cggaaccgcc ggagtgataa tgcaccgctt	9540
cgaattcatt cccgttactg caacgctcga ggcagagtct gacttggaag gagcacagaa	9600
ggcgggtaat gctctgttca cttcgtccaa tcagattggg ctcaagacag atgtgactga	9660
ctatcacatc gatcgcggtt ccaaccttgt tgagtgcttc tctgatgagt tctggttga	9720
tgagaagaag gagttgtccg agaaggtcaa acatgctaag cgacttagtg atgagcggaa	9780
cttgettcaa gatcccaact ttcgcgggat caacaggcaa ctagatcgtg gatggagggg	9840
aagtacggac atcaccattc aaggagggtga tgatgtgttc aaggagaact atgttacgct	9900
cttgggtacc tttgatgagt gctatccaac atacctgtac cagaagatag atgaatcgaa	9960
actcaaagcc tacacaagat accagttgag aggttacatc gaggacagtc aagacctga	10020
gatctacctc atcagataca acgccaaaca tgagacagtc aatgtgcctg ggacgggttc	10080
actctggcca cttcagccc caagtccat cggcaagtgt gcccatcact cacaccactt	10140
ctccttggac atagacgttg gctgtaccga cctgaacgaa gacctcgtg tgtgggtgat	10200
cttcaagatc aagactcaag atggccatgc caggctaggc aatctggagt ttctagaaga	10260
gaaaccactt gttggagaag ccctcgtag agtgaagagg gctgagaaga agtggaggga	10320
caagagagag aagttggaat gggaaacaaa catttgttac aaagaagcca aagaaagcgt	10380
tgacgctctg tttgtgaact ctcagatga taggctccaa gctgatacca acatagctat	10440
gattcatgct gcagacaaac gcgttcatag cattcgggaa gcttaccttc ctgaacttag	10500
cgtgattccg ggtgtcaatg ctgctatctt tgaagagtta gaagggcgca tcttactgc	10560
attctccttg tatgatgcca ggaatgtcat caagaatggt gacttcaaca atggcctatc	10620
ctgctggaat gtgaaagggc acgtagatgt agaagaacag aacaatcacc gctctgtcct	10680
tgttgttcct gagtgggaag cagaagtctc acaagaagt cgtgtctgtc ctggtcgtgg	10740
ctacattctt cgtgttaccg cgtacaaaga aggatacggg gaaggttgcg tcaccataca	10800
cgagattgag aacaacaccg acgagctgaa gttcagcaac tgcgtcaggg aggaagtcta	10860
cccaaacaac accgtaactt gcaatgacta cactgcgact caagaggagt atgagggtag	10920
ttacacttct cgcaatcgag gatacgatgg agcctatgag agcaactctt ctgtaccgcg	10980
tgactatgca tcagcctatg aggagaaggc ttacaccgat ggacgtaggg acaatcctg	11040
cgaatctaac agaggctatg gggactacac accgttacca gccggctatg tcaccaaaga	11100
gtagagtagc tttccagaaa ccgacaaggc ttggattgag attggagaaa cggaaggaa	11160
attcattggt gatagcgtgg agttacttct gatggaggaa tgagtagtta gcttaatcac	11220
ctagagctcg gttacctatc aaaatctatt tagaaataca caatattttg ttgcaggctt	11280
gctggagaat cgatctgcta tcataaaaat tacaacaaaaa ttttatttgc ctcaattatt	11340

ES 2 714 432 T3

ttaggattgg	tattaaggac	gcttaaatta	tttgtcgggt	cactacgcat	cattgtgatt	11400
gagaagatca	gcgatacga	atattcgtag	tactatcgat	aatttatttg	aaaattcata	11460
agaaaagcaa	acggtacatg	aattgatgaa	acaatacaaa	gacagataaa	gccacgcaca	11520
tttaggatat	tggccgagat	tactgaatat	tgagtaagat	cacggaatth	ctgacaggag	11580
catgtcttca	attcagccca	aatggcagtt	gaaatactca	aaccgcccc	tatgcaggag	11640
cggatcattc	attgtttggt	tggttgcctt	tgccaacatg	ggagtccaag	gttgccggccg	11700
cgcccgacc	cagctttctt	gtacaaagtg	gttgccggccg	cttaattaa	tttaaagcc	11760
cggcggttta	aacggcgccg	cttaattaag	gccggcctgc	agcaaacca	gaaggttaatt	11820
atccaagatg	tagcatcaag	aatccaatgt	ttacgggaaa	aactatggaa	gtattatgta	11880
agctcagcaa	gaagcagatc	aatatgcggc	acatatgcaa	cctatgttca	aaaatgaaga	11940
atgtacagat	acaagatcct	atactgccag	aatacgaaga	agaatacgt	gaaattgaaa	12000
aagaagaacc	aggcgaagaa	aagaatcttg	aagacgtaag	cactgacgac	aacaatgaaa	12060
agaagaagat	aaggtcggtg	attgtgaaag	agacatagag	gacacatgta	aggtggaaaa	12120
tgtaaggcg	gaaagtaacc	ttatcacaaa	ggaatcttat	ccccactac	ttatcctttt	12180
atatttttcc	gtgtcatttt	tgcccttgag	ttttcctata	taaggaacca	agttcggcat	12240
ttgtgaaaac	aagaaaaaat	ttggtgtaag	ctattttctt	tgaagtactg	aggatacaac	12300
ttcagagaaa	tttghtaagt	tgtagatctc	catgtctccg	gagaggagac	cagttgagat	12360
taggccagct	acagcagctg	atatggccgc	ggtttgtgat	atcgtaacc	attacattga	12420
gacgtctaca	gtgaacttta	ggacagagcc	acaaacacca	caagagtgga	ttgatgatct	12480
agagaggttg	caagatagat	acccttggtt	ggttgctgag	gttgaggggtg	ttgtggctgg	12540
tattgcttac	gctgggccct	ggaaggctag	gaacgcttac	gattggacag	ttgagagtac	12600
tgtttacgtg	tcacataggc	atcaaagggt	gggcctagga	tccacattgt	acacacattt	12660
gcttaagtct	atggaggcgc	aaggttttaa	gtctgtggtt	gctgttatag	gccttccaaa	12720
cgatccatct	gttaggttgc	atgaggcttt	gggatacaca	gcccggggt	cattgcgcgc	12780
agctggatac	aagcatggtg	gatggcatga	tgttggtttt	tggcaaagg	atthtgagtt	12840
gccagctcct	ccaaggccag	ttaggccagt	taccagatc	tgaggtacc	tgagcttgag	12900
cttatgagct	tatgagctta	gagctcggat	ccactagtaa	cggccgccag	tgtgctggaa	12960
ttcgcccttg	actagatag	cgccagatc	ggcggaata	gcttcttagc	gccatcccgg	13020
gttgatccta	tctgtgttga	aatagttgcg	gtgggcaagg	ctctctttca	gaaagacagg	13080
cggccaaagg	aacccaagg	gagtggtgct	atggctctca	gttccttggt	gaagcgttg	13140
gtctaagggtg	cagaggtggt	agcgggatga	agcaaaagt	tccgattgta	acaagatatg	13200

ES 2 714 432 T3

ttgatcctac gtaaggatat taaagtatgt attcactact aatataatca gtgtattcca 13260
 atatgtacta cgatttccaa tgtctttatt gtgcgcgat gtaatcggcg tcacaaaata 13320
 atccccggtg actttctttt aatccaggat gaaataatat gttattataa tttttgcat 13380
 ttggtccgtt ataggaattg aagtgtgctt gcggtcgcca ccaactccat ttcataattt 13440
 tacatgtatt tgaaaaataa aaatttatgg tattcaattt aaacacgat acttgtaaag 13500
 aatgatatct tgaaaagaat atagtttaa tatttattga taaaataaca agtcaggat 13560
 tatagtccaa gcaaaaacat aaatttattg atgcaagttt aaattcagaa atatttcaat 13620
 aactgattat atcagctggg acattgccgt agatgaaaga ctgagtgcca tattatggtg 13680
 taatacatag cggccgggtt tctagtcacc ggtaggagtc cgtttaaact cgaggctagc 13740
 gcatgcacat agacacacac atcatctcat tgatgcttgg taataattgt cattagattg 13800
 tttttatgca tagatgcact cgaaatcagc caattttaga caagtatcaa acggatgtga 13860
 cttcagtaca ttaaaaacgt ccgcaatatg atattcatta attttatatt atctaaaaga 13920
 gttaaaagag aaaaaagaaa tatgacaatt ttttctttc acatcttcta acctaaaagt 13980
 atgactctat ggaggctaag tttagaaaaa gatacggatc tagggtgtgg aaacatcaat 14040
 ggtcaactcc ttttatattt caatcaattg ggttttctt tatctttaca ttttctcctt 14100
 ttattttcca cgtctattca aatctacttg ttagcgggtg attactctt tttctttat 14160
 agatgccaat ttttctctc ctatgtatta aattagagta tattgtcttg aaagtgactt 14220
 agtattttag tttatagtct cttaaagaac gacacctttt attcttaact ctctttatca 14280
 agttttaatt taaaattatt ttaaattaag tatgcataca tatcttaata ttttcttaa 14340
 ttatttttaa attccctaaa tttaatgtt tcatacaatg taagagatat acatattaat 14400
 tataatttaa gataaaactt actttcctgc aataaaataa agaaaaggac agtcatacaa 14460
 ttatataatt aatccagaat atttatagct tttaaacatt tttttctat caattaagta 14520
 ataaacttaa ataaaattaa gagtactttt ttatactcca aagaatttat ttattttcaa 14580
 caaaaatcgtc tgactgtttc aattgatcat tatcagccta gcataaccta aatttcattt 14640
 tcaaacataa cttttggcac caaatcacc gcgattgcaa aaaagtctt tgcgatatga 14700
 ccctccacga cgcagaacca ctgttattca ttaccatcac ttttaacct aatttccat 14760
 acacttacc tttccatgac atcttcaaag cttttattt gcttttcttg tttaaagtgt 14820
 tttaacctaa tttcatgcat ataaacaaag agtaaagcaa aggcaaatat ttgtacgtat 14880
 agtttttaga cagaaaagga aagtaaatta tagagataat gaagtttgct cttttaaatt 14940
 cgtcgtgatg ttatccatca tatctaaatg cttattcctg tttttgtctt ttttctctt 15000
 taccggagtt tttttatat aattaattaa agttagtaga tctatattct tttcataga 15060
 taatccatct tctttggagg cacatcgatc attaatacata gagttttgag aagcattatc 15120
 actaaagctt caattaatta tatccaataa acggtattgg tgtatgatgt tatgatagca 15180
 aatagataat ctaatctata cgagccacaa agggggcatg aactctatct cgaagaatt 15240
 ggagatgaag ggattgagat tggcaccttg tgctattatt gccactaat catt 15294

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para controlar insectos que comprende exponer insectos a plantas de soja resistentes a insectos, comprendiendo dichas plantas de soja un segmento polinucleotídico que tiene al menos una identidad de 95% con SEQ ID NO: 14, que comprende el evento de soja 9582.814.19.1, en donde una semilla de soja representativa ha sido depositada en la Colección de Cultivos Tipo Americana (ATCC) con el número de acceso PTA-12006.
2. El método de la reivindicación 1, en donde dichos insectos son *Pseudoplusia includens* (gusano medidor de la soja).
3. El método de la reivindicación 1, en donde dichos insectos son *Anticarsia gemmatalis* (oruga de las leguminosas).
4. El método de la reivindicación 1, en donde dichos insectos son *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero).
- 10 5. Una secuencia de ADN aislada que comprende una o más secuencias seleccionadas del grupo que consiste en los pb 1.385-1.415 de SEQ ID NO: 1, los pb 1.350-1.450 de SEQ ID NO: 1, los pb 1.300-1.500 de SEQ ID NO: 1, los pb 1.200-1.600 de SEQ ID NO: 1, los pb 137-168 de SEQ ID NO: 2, los pb 103-203 de SEQ ID NO: 2, y los pb 3-303 de SEQ ID NO: 2.
- 15 6. Una planta de soja, o una parte de la misma que comprende una secuencia de ADN que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 14, que comprende el evento de soja 9582.814.19.1, en donde una semilla de soja representativa ha sido depositada en la Colección de Cultivos Tipo Americana (ATCC) con el número de acceso PTA-12006, que es resistente a *Pseudoplusia includens* (gusano medidor de la soja) y comprende ADN que tiene al menos una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en los pb 1385-1415 de SEQ ID NO: 1, los pb 1350-1450 de SEQ ID NO: 1, los pb 1300-1500 de SEQ ID NO: 1, los pb 1200-1600 de SEQ ID NO: 1,
- 20 los pb 137-168 de SEQ ID NO: 2, los pb 103-203 de SEQ ID NO: 2, los pb 3-303 de SEQ ID NO: 2, y complementos de los mismos, en donde las partes de la planta de soja se seleccionan del grupo que consiste en polen, óvulo, flores, brotes, raíces, hojas, núcleos de células vegetativas, células de polen, semillas, y células huevo.
- 25 7. Una planta de soja según la reivindicación 6 que comprende una secuencia de ADN que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:14, elaborada cruzando una primera planta de soja que comprende una o más secuencias seleccionadas del grupo que consiste en los pb 1385-1415 de SEQ ID NO: 1, los pb 1350-1450 de SEQ ID NO: 1, los pb 1300-1500 de SEQ ID NO: 1, los pb 1200-1600 de SEQ ID NO: 1, los pb 137-168 de SEQ ID NO: 2, los pb 103-203 de SEQ ID NO: 2, y los pb 3-303 de SEQ ID NO:2, y complementos de las mismas con una segunda planta de soja y analizar la planta de soja producida para determinar la presencia de ADN que comprende una o más secuencias seleccionadas del grupo que consiste en los pb 1385-1415 de SEQ ID NO: 1, los pb 1350-1450 de SEQ ID NO: 1, los pb 1300-1500 de SEQ ID NO: 1, los pb 1200-1600 de SEQ ID NO: 1, los pb 137-168 de SEQ ID NO: 2, los pb 103-203 de SEQ ID NO: 2, los pb 3-303 de SEQ ID NO: 2, y complementos de las mismas.
- 30 8. La planta de soja, o parte de la misma, de la reivindicación 6 que comprende una secuencia de ADN que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 14, que comprende el evento de soja 9582.814.19.1, en donde semillas representativas de dicha planta de soja han sido depositadas en la Colección de Cultivos Tipo Americana con el Núm. de Acceso PTA-12006.
- 35 9. Un método de control de plagas en los granos, semillas, sémola, o harina de soja que comprende incluir el evento de soja 9582.814.19.1, en donde una semilla de soja representativa ha sido depositada en la Colección de Cultivos Tipo Americana (ATCC) con el número de acceso PTA-12006, que comprende una secuencia de ADN que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 14 en dicho grano, semilla, sémola o harina como se demuestra porque dicho grano, semilla, sémola, o harina comprenden una o más secuencias de ADN seleccionadas del grupo que consiste en los pb 1385-1415 de SEQ ID NO: 1, los pb 1350-1450 de SEQ ID NO: 1, los pb 1300-1500 de SEQ ID NO: 1, los pb 1200-1600 de SEQ ID NO: 1, los pb 137-168 de SEQ ID NO: 2, los pb 103-203 de SEQ ID NO: 2, los pb 3-303 de SEQ ID NO: 2, y complementos de las mismas.
- 40

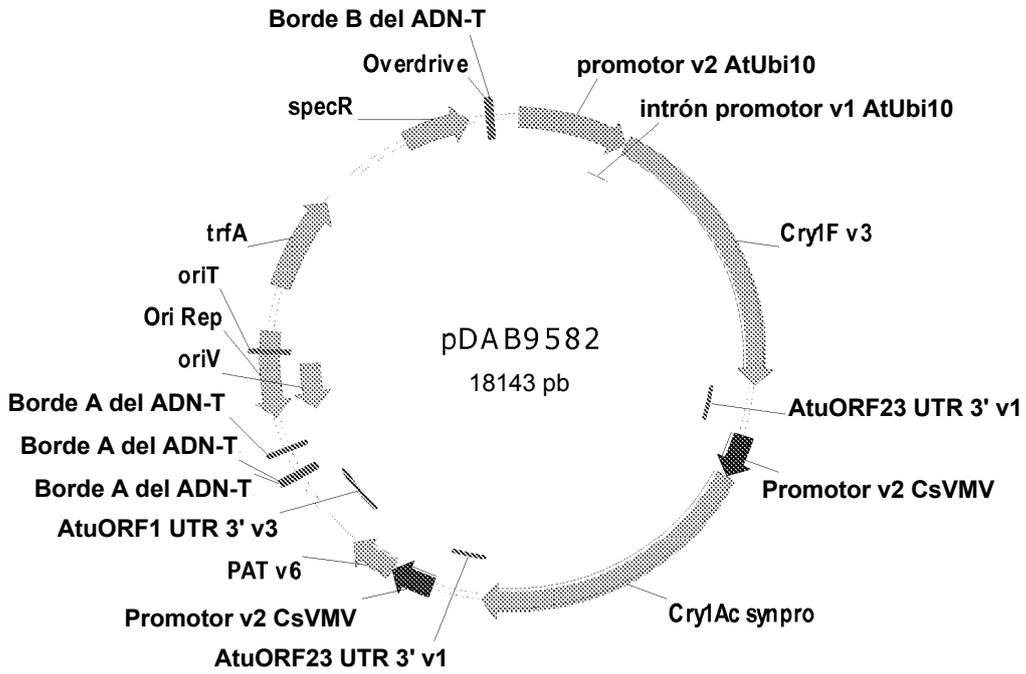


Fig. 1

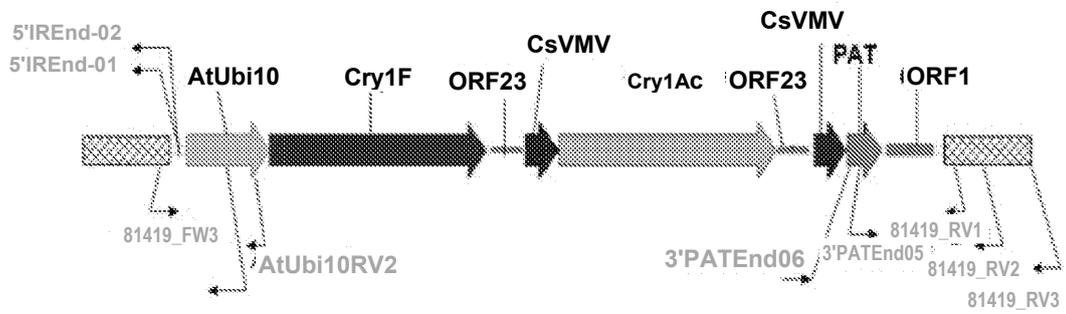


Fig. 2

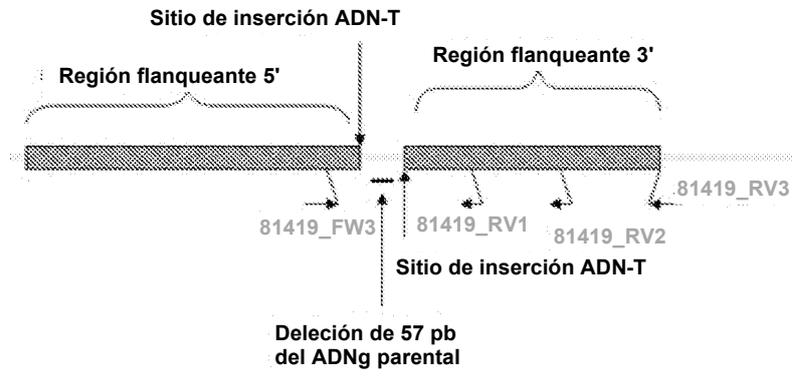


Fig. 3