



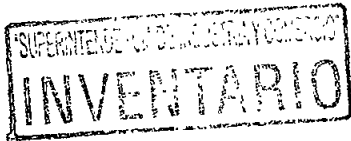
CSA125636

Organización y
Digitalización CSA Ltda



PCT

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones



SOLICITUD DE

**PATENTE DE INVENCION
PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL**

10-70011

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO: PLANTAS Y SEMILLAS DE SOJA CORRESPONDIENTES
AL EVENTO TRANSGÉNICO MON87701 Y MÉTODOS DE
DETECCIÓN DEL MISMO

52. CLASIFICACION INTERNACIONAL: C12N 15/82, C12Q 1/68,
A01H 5/00

71. SOLICITANTE: MONSANTO TECHNOLOGY, LLC

DOMICILIO: 800 North Lindberg Boulevard, St. Louis,
Missouri 63167, ESTADOS UNIDOS DE
AMERICA

74. APODERADO: Dra. MARGARITA CASTELLANOS A.

22. BOGOTA, D.C., 10 JUN. 2010

15.06.2010



No. 10-070011- -00000-0000

Fecha 2010-06-10 14:52:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios. 201FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTES
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

①

☐ Patente de Invención.☐ Patente de Modelo de Utilidad.☒ Capítulo I☐ Capítulo II

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: MONSANTO TECHNOLOGY, LLC

Dirección: 800 North Lindbergh Boulevard,
St. Louis, Missouri 63167
ESTADOS UNIDOS DE AMERICANacionalidad o Domicilio: St. Louis, Missouri,
ESTADOS UNIDOS DE AMERICALugar de Constitución: ESTADOS UNIDOS DE
AMERICA

Teléfono:

Fax:

E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: MARGARITA CASTELLANOS A.

Dirección: CALLE 94A No. 7A-09

Teléfono: 7560770 Fax: 7550158

E-mail: info@castellanosvco.com

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número 39'779.654 TPA 70.819

④

INVENTOR (ES) (72)

AI-GUO GAO

800 North Lindbergh Boulevard,
St. Louis, Missouri 63167
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

TED C. MACRAE

800 North Lindbergh Boulevard,
St. Louis, Missouri 63167
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

KATHRYN H. KOLACZ

800 North Lindbergh Boulevard,
St. Louis, Missouri 63167
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

JOHN A. MIKLOS

800 North Lindbergh Boulevard,
St. Louis, Missouri 63167
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No.

PCT/US2008/082590

Fecha

06/11/2008

Publicación Internacional No.

WO 2009/064652 A1

Fecha

22/05/2009

⑥

Título (54)

PLANTAS Y SEMILLAS DE SOJA CORRESPONDIENTES AL EVENTO TRANSGENICO
MON87701 Y METODOS DE DETECCION DEL MISMO

⑦

Clasificación Internacional (51)

C12N 15/82, C12Q 1/68, A01H 5/00

⑧

Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI ☒NO ☐

US

15/11/2007

60/988,349

⑨

Comprobante de pago No.

10-41,973 y 10-41,976

Fecha

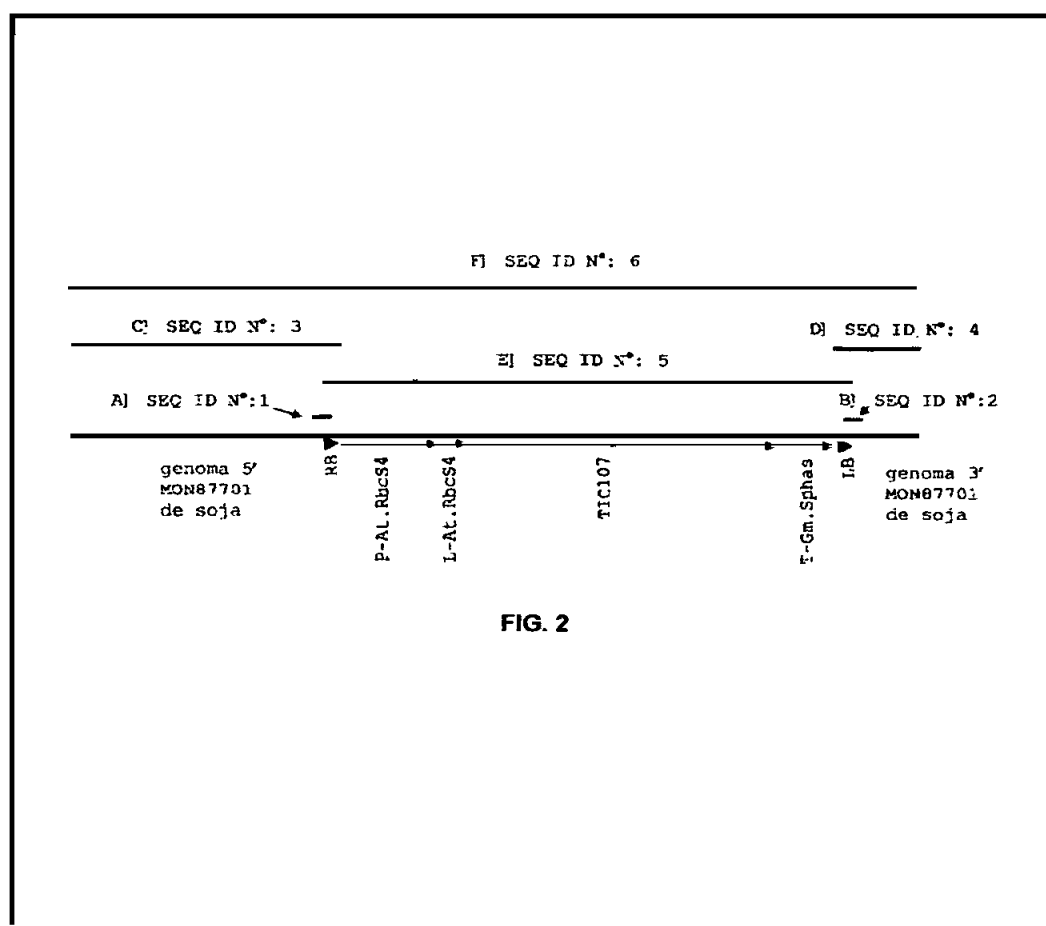
Mayo 24 de 2010

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

10 Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso, junto con la sustitución del mismo a mi favor
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☒ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☒ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Tarjeta Propietario, Extracto para la publicación

11 FIGURA CARACTERISTICA:



12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE:

MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO

FIRMA:

Margarita Castellanos Abondano
C.C. No. 39779.654 Usaquén - TPA 70.819 C.S.J.

10 JUN. 2010

000003

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176099-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 41,973
FECHA : MAYO 24 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-070011- -00000-0000

Fecha: 2010-06-10 14:52:25 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 201

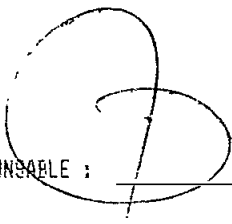
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
ALVARO CASTELLANOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	324715580	24/05/2010	6,848,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	554,000.00
		TOTAL :	\$ 554,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

000004

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 41,976
 FECHA : MAYO 24 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-070011- -00000-0000

Fecha 2010-06-10 14 52 25 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
 Tra 11 PATENTEIYII Eve 378 FASENACIONALI
 Act 411 PRESENTACION Folios: 201

**** CONSIGNACION ****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ALVARO CASTELLANOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	324715580	24/05/2010	6,842,000.00

**** CONCEPTO ****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
99		OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	546,000.00
TOTAL :			\$ 546,000.00

SON: QUINIENTOS CUARENTA Y SEIS MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
 COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
 SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

000005

CASTELLANOS & CO LTDA
ABOGADOS
Calle 94 A No. 7 A-09
Bogotá, D.C. – COLOMBIA

Señor

Jefe de la División de Nuevas Creaciones

Superintendencia de Industria y Comercio

Ministerio de Comercio, Desarrollo, Industria y Turismo

E. S. D.

Ref.: **PODER** conferido por **MONSANTO TECHNOLOGY LLC**

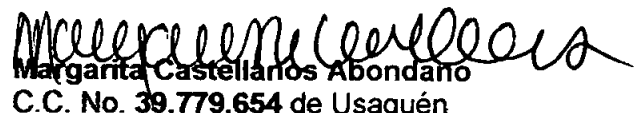
Yo, **XIMENA CASTELLANOS ABONDANO**, mayor de edad, identificada y domiciliada como aparece al pie de mi firma, atentamente manifiesto a Uds. que sustituyo en la Dra. **MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO**, el poder que me confirió **MONSANTO TECHNOLOGY LLC**, con domicilio en **800 North Lindberg Boulevard, St. Louis, Missouri 63167, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA**, debidamente legalizado por Apostilla bajo el No. **142500**, el día **21 de Diciembre de 2005**, con las mismas facultades que me fueron conferidas, para tramitar la solicitud de patente PCT Entrada en Fase Nacional, para: **PLANTAS Y SEMILLAS DE SOJA CORRESPONDIENTES AL EVENTO TRANSGÉNICO MON87701 Y MÉTODOS DE DETECCIÓN DEL MISMO**.

Del Señor Jefe,

Acepto


Ximena Castellanos Abondano
C.C. No. **39.773.330** de Usaquén
T.P.A. No. **58.236** del C.S.J.
Calle 94 A No. 7 A-09 – Bogotá
PBX: 7560770

Bogotá, D.C.
XGA/MCA/j1978


Margarita Castellanos Abondano
C.C. No. **39.779.654** de Usaquén
T.P.A. No. **70.819** del C.S.J.
Calle 94 A No. 7 A-09 – Bogotá
PBX: 7560770

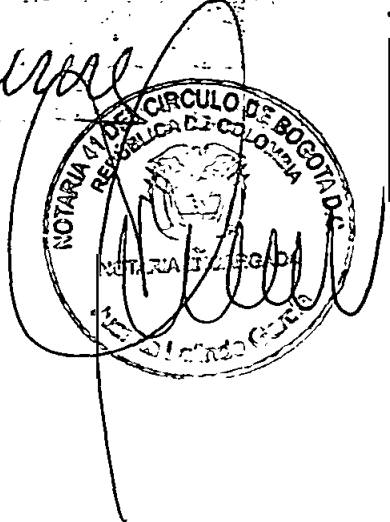
NOTARIA 41 DEL CIRCULO DE BOGOTÁ D.C.
DEPARTAMENTO DE CUNDINAMARCA
REPUBLICA DE COLOMBIA

El Notario 41 del círculo de Bogotá, da fe de que compareció personalmente: Manuel Castañeda Gómez
identificado (o) con: JS 773 000 y tarjeta
profesional de abogado No. 88 286 del Consejo
Superior de la Judicatura, quien autentica la firma puesta por ella
(el) mismo en este escrito.

(Art. 84 C. P. C. Decreto. 2282/59 mod. 36)

9 JUN. 2010

Manuel Castañeda Gómez



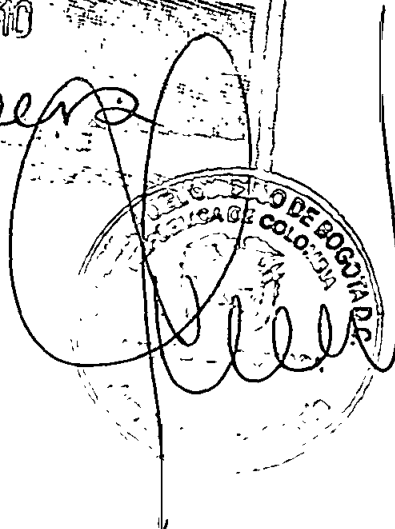
NOTARIA 41 DEL CIRCULO DE BOGOTÁ D.C.
DEPARTAMENTO DE CUNDINAMARCA
REPUBLICA DE COLOMBIA

El Notario 41 del círculo de Bogotá, da fe de que compareció personalmente: Manuel Castañeda Gómez
identificado (o) con: JS 773 654 y tarjeta
profesional de abogado No. 70-819 del Consejo
Superior de la Judicatura, quien autentica la firma puesta por ella
(el) mismo en este escrito.

(Art. 84 C. P. C. Decreto. 2282/59 mod. 36)

9 JUN. 2010

Manuel Castañeda Gómez



PODEREl (los) **MONSANTO TECHNOLOGY LLC**Domiciliados en **800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, Missouri 63167, EEUU**

Nombran por el presente a **XIMENA CASTELLANOS A. y/o MARGARITA CASTELLANOS A.** abogadas con oficinas en la Calle 94 A No. 7 A-09, Bogotá-Colombia para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad Industrial y con este fin autorizamos a dichos apoderados para que nos representen ante cualesquiera autoridades o personas de los órdenes administrativo, contencioso - administrativo y judicial en todo lo relacionado con los siguientes actos y gestiones:

- Obtención de patentes de invención, modelos y dibujos industriales; registro de marcas de fabrica, de servicio, colectivas o defensivas y de denominaciones de origen, depósito de nombres y enseñas comerciales; su renovación, prórroga, inscripción de traspaso y cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria y el registro de licencias de uso de esos derechos;
- Para la obtención de registros sanitarios;
- Acciones de oposición, observación, cancelación, nulidad, medidas cautelares y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso - administrativos que promovamos o se nos promuevan.

Pudiendo en todos los actos y gestiones arriba mencionados sustituir éste mandato, transigir, desistir, recibir, cancelar, renunciar, aceptar notificaciones y nombrar apoderados judiciales y extrajudiciales.

Finalmente, este poder ratifica la validez de todos los actos y solicitudes que, a nombre de la poderdante hubieren realizado los apoderados en relación con las facultades anteriormente enumeradas, antes de la suscripción del presente poder

Dado y firmado hoy **19 de Diciembre de 2005**en **St. Louis, Missouri, USA**por **MONSANTO TECHNOLOGY LLC**

(El notario debe suscribir el documento en la pagina siguiente)

(Se requiere legalización consular o mediante apostilla)

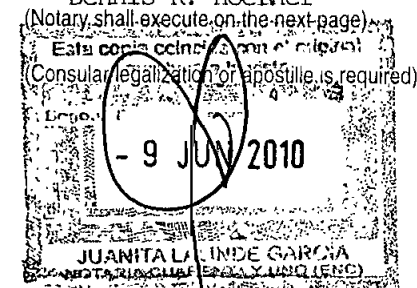
POWER OF ATTORNEYI (we) the undersigned **MONSANTO TECHNOLOGY LLC**Of **800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, Missouri 63167, EEUU**

hereby grant(s) Power of Attorney to **XIMENA CASTELLANOS A. and for MARGARITA CASTELLANOS A.** attorneys residing at Calle 94 A No. 7 A-09, Bogotá-Colombia, to obtain the protection of my (our) Industrial Property, for which purpose we authorize the said attorneys to represent us before any authorities, or persons, specially those, administrative, contentious and judicial, in all matters concerning the following:

- Obtainment of patents, models and designs, registration of trademarks, service, collective and defensive marks, and of designations of origin; the deposit of trade names and ensigns; its renewal, extension, recordal of assignments, change of name or domicile, voluntary cancellation, and the registration of licenses of use of the above rights;
- For the obtainment of Sanitary registrations;
- Actions of opposition, cancellation, nullity, infringement, granting of licenses; and in general the civil, criminal and administrative suits related to those rights; actions and suits instituted by us or against us;

In all the above matters they may substitute this power of attorney, compromise, desist, cancel, receive, renounce, accept notifications and appoint attorneys in fact, in or out of court.

Finally, this power of attorney ratifies the validity of all acts and applications made by the representatives in the name of the signatory of this power of attorney, with regard to the faculties above given, before the execution of the present power of attorney.

Given and signed this **19th December, 2005**in **St. Louis, Missouri**by 
Dennis R. Hoerner
(Notary shall execute on the next page)**CERTIFICADO NOTARIAL (Sociedad)****NOTARIAL CERTIFICATION (Corporation)****ALVARO CASTELLANOS M. & CIA.****ABOGADOS COLOMBIA**

Calle 94 A No 7A-09 - P.O. Box 6349 - Bogotá, Colombia
PHX.: (571) 610 74 20 - Fax (571) 610 07 06 - e-mail mail@alvarocastellanos.com

Hoy 19^{de} Dic. del año 2005
compareció (eron) personalmente
DENNIS R. HOERNER

a quienes conozco como la(s) personas que firma(n) en
representación de la Sociedad (Compañía) denominada
MONSANTO TECHNOLOGY LLC

Certifico :

a) Que **MONSANTO TECHNOLOGY LLC**

es una sociedad/Compañía legalmente constituida y
existente de acuerdo con las leyes de

b) Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es
St. Louis, Missouri

c) Que el objeto u objetos para los cuales se otorga el
presente poder están comprendidos dentro del objeto
social de la mencionada Sociedad /Compañía.

d) Que el Sr. **DENNIS R. HOERNER**
esta autorizado para otorgar el presente poder. Lo anterior
esta probado por medio de los siguientes documentos, que
certifico he visto*

(Ciudad) **St. Louis**

(Estado) **Missouri**

Hoy 19 del **Diciembre** de 2005

(Notario Público)

*Los documentos debe identificarse con fecha y origen.

On this 19 day of Dec. of 2005
personally appeared

Dennis R. Hoerner

whom I know to be the person(s) who signed this document as
representative(s) of the Corporation /Company named
Monsanto Technology LLC

I certify:

a) That

Monsanto Technology LLC

is a corporation (Company legally constituted and in
existence in accordance with the laws of

b) That the domicile of said Corporation/Company is
St. Louis, Missouri

c) That the purpose or purposes for which the present
Power of Attorney is granted are comprised within the
object set forth in the charter of the mentioned
Corporation/Company.

d) That Mr. **Dennis R. Hoerner**
is (are) authorized to grant the present Power of Attorney. The
aforementioned was duly proven through the following
documents and I duly certify having seen them*:

(City) **St. Louis**

(State) **Missouri**

this 19 day of Dec of the year 2005

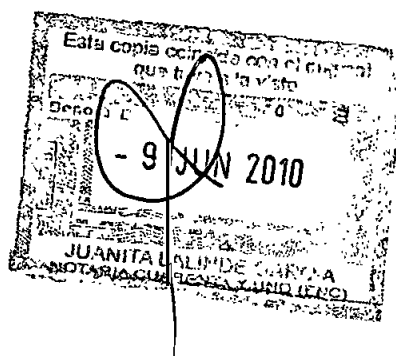
(Notary Public)

Michelle Ludwig

*Documents must be identified with date and origin



MICHELLE LUDWIG
My Commission Expires
July 13, 2009
St. Louis County
Commission #05550747



ALVARO CASTELLANOS M. & CIA.

ABOGADOS COLOMBIA

Calle 94 A No 7A-09- P O Box 6349 - Bogota, Colombia
PBX.: (571) 610 74 20 - Fax (571) 610 07 06 - e-mail mail@alvarocastellanos.com

Apostille

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document
2. has been signed by MICHELLE LUDWIG
3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC
4. bears the seal/stamp of MICHELLE LUDWIG-NOTARY PUBLIC-STATE OF MISSOURI

Certified

5. at Jefferson City, Missouri

6. the 21ST day of DECEMBER, 2005

7. by Robin Carnahan, Secretary of State, State of Missouri

8. No. 142500

9. Seal/Stamp

10. Signature:

Robin Carnahan

Comm 48 (01-2005)



000009

-----TRADUCCION OFICIAL No. 06-02-04-----

de un documento escrito en INGLES, el cual para su identificación lleva el sello de la Traductora e Intérprete Oficial, Res. 2755/68 y 01144/97 de Minjusticia, al igual que la presente.-----

(Adjunto a un documento de Poder otorgado por MONSANTO TECHNOLOGY LLC)

Sello Notarial:

MICHELLE LUDWIG

Mi comisión vence Julio 13, 2009

Condado de St. Louis – Comisión #05550747

APOSTILLA

(Convención de La Haya de octubre 5, 1961)

1. País: Estados Unidos de América

Este documento público

2. ha sido firmado por Michelle Ludwig

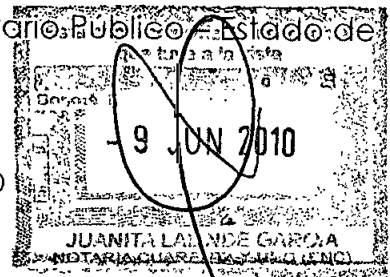
3. actuando en su carácter de Notario Público

4. Lleva el sello de Michelle Ludwig – Notario Público – Estado de Missouri

CERTIFICADO

5. En Jefferson City, Missouri

6. El día 21 de Diciembre de 2005



DORA DUQUE DE BERNAL
TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL
RES. 02755/68 Y 01144/97 - MINJUSTICIA
REP. DE COLOMBIA

000010

7. por Robin Carnahan, Secretario de Estado, Estado de Missouri

8. No. 142500

9. Sello (en dorado)

10. Firma:

(fdo) Robin Carnahan

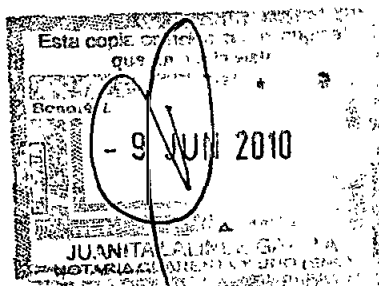
ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA, a la cual me remito,

Bogotá, D. C., Febrero 9, 2006.

Dora Duque de Bernal

DORA DUQUE DE BERNAL
TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL
RES. 02755/68 Y 01144/97 - MINJUSTICIA
REP. DE COLOMBIA

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO
2006 FEB 13 A 11:55
Jefe de Legalizaciones
SANTAFE DE BOGOTA D.C.



MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

613662
Dora Duque
CITA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS

ATCC

10801 University Blvd • Manassas, VA 20110-2209 • Telephone: 703-365-2700 • FAX: 703-365-2745

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT ISSUED PURSUANT TO RULE 7.3 AND VIABILITY STATEMENT ISSUED PURSUANT TO RULE 10.2

To: (Name and Address of Depositor or Attorney)

Monsanto Co.
ATTN: Thomas J. LaRosa
700 Chesterfield Parkway North, GG3K
Chesterfield, MO 63017

Deposited on Behalf of: Monsanto Technology LLC

Identification Reference by Depositor:

Patent Deposit Designation

Insect Resistant Soybean Seed, Glycine max: MON87701

PTA-8194

The seeds were accompanied by: ☒ a scientific description ☐ a proposed taxonomic description indicated above. The seeds were received January 31, 2007 by this International Depository Authority and have been accepted.

AT YOUR REQUEST: ☒ We will inform you of requests for the seeds for 30 years.

The seeds will be made available if a patent office signatory to the Budapest Treaty certifies one's right to receive, or if a U.S. Patent is issued citing the seeds and ATCC is instructed by the United States Patent & Trademark Office or the depositor to release said seeds.

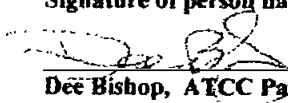
If the seeds should die or be destroyed during the effective term of the deposit, it shall be your responsibility to replace them with viable seeds of the same.

The seeds will be maintained for a period of at least 30 years from date of deposit, or five years after the most recent request for a sample, whichever is longer. The United States and many other countries are signatory to the Budapest Treaty.

The viability of the seeds cited above was tested February 26, 2007. On that date, the seeds were viable.

International Depository Authority: American Type Culture Collection, Manassas, VA 20110-2209 USA.

Signature of person having authority to represent ATCC:


Dee Bishop, ATCC Patent Depository

Date: March 1, 2007

cc: Timothy K. Ball

(Ref: Docket or Case#: 38-21(53458))

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
22 May 2009 (22.05.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/064652 A1

- (51) International Patent Classification:
C12N 15/82 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/US2008/082590
- (22) International Filing Date:
6 November 2008 (06.11.2008)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/988,349 15 November 2007 (15.11.2007) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): MON-SANTO TECHNOLOGY LLC [—/US]; 800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, MO 63167 (US).
- (71) Applicants (for US only): GAO, Ai-Guo [US/US]; 800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, MO 63167 (US). KOLACZ, Kathryn, H. [US/US]; 800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, MO 63167 (US). MACRAE, Ted, C. [US/US]; 800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, MO 63167 (US). MIKLOS, John, A. [US/US]; 800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, MO 63167 (US).

- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): PARADISE, Mark, S. [US/US]; 800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, MO 63167 (US). PERLAK, Frederick, J. [US/US]; 800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, MO 63167 (US). TOEDEBUSCH, Andrea, S. [US/US]; 800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, MO 63167 (US).
- (74) Agent: DAVIS, J., Wendy; Howrey LLP, 1111 Louisiana, 25th Floor, Houston, TX 77002 (US).
- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,

[Continued on next page]

(54) Title: SOYBEAN PLANT AND SEED CORRESPONDING TO TRANSGENIC EVENT MON87701 AND METHODS FOR DETECTION THEREOF

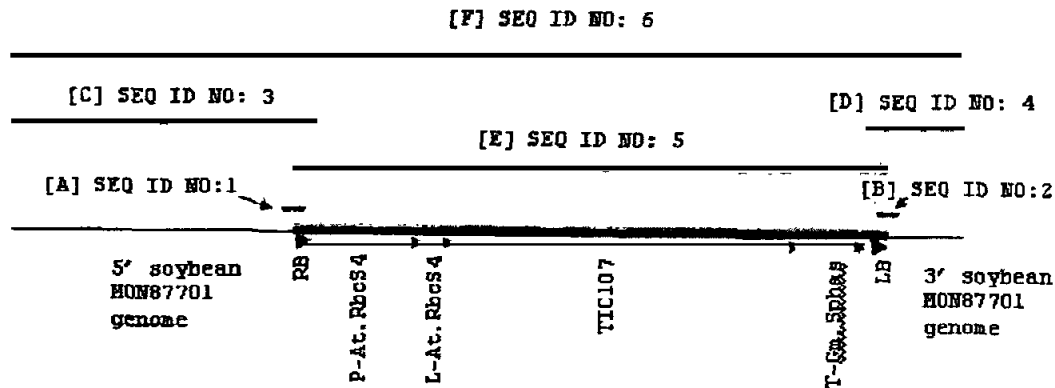


FIG. 2

(57) Abstract: The present invention provides a transgenic soybean event MON87701, and cells, seeds, and plants comprising DNA diagnostic for the soybean event. The invention also provides compositions comprising nucleotide sequences that are diagnostic for said soybean event in a biological sample, probes and primers for use in detecting nucleotide sequences that are diagnostic for the presence of said soybean event in a biological sample, and methods for detecting the presence of said soybean event nucleotide sequences in a biological sample. The invention further provides methods of growing the seeds of such soybean event into soybean plants, and methods of breeding to produce soybean plants comprising DNA diagnostic for the soybean event.



FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL,
NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— *with sequence listing part of description published sepa-
rately in electronic form and available upon request from
the International Bureau*

Published:

— *with international search report*

- 1 -

**SOYBEAN PLANT AND SEED CORRESPONDING TO TRANSGENIC EVENT
MON87701 AND METHODS FOR DETECTION THEREOF**

[0001] This application claims the benefit of priority to U.S. Provisional Application Serial No. 60/988,349, filed November 15, 2007, which is herein incorporated by reference in its entirety.

FIELD OF THE INVENTION

[0002] The present invention relates to transgenic soybean event MON87701 and plant parts and seed thereof. The event exhibits resistance to insect infestation from insects in the order of Lepidoptera. The present invention also relates to methods for detecting the presence of said soybean event in a biological sample, and provides nucleotide sequences that are unique to the event.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0003] Soybean is an important crop and is a primary food source in many areas of the world. The methods of biotechnology have been applied to soybean for improvement of agronomic traits and the quality of the product. One such agronomic trait is insect resistance.

[0004] It would be advantageous to be able to detect the presence of transgene/genomic DNA of a particular plant in order to determine whether progeny of a sexual cross contain the transgene/genomic DNA of interest. In addition, a method for detecting a particular plant would be helpful when complying with regulations requiring the pre-market approval and labeling of foods derived from the recombinant crop plants.

[0005] Transgenic crops expressing *B. thuringiensis* δ -endotoxins enable growers to significantly reduce the time and cost associated with applying chemical insecticides as well as increase crop yields in transgenic plants grown under heavy insect pressure as compared to greatly reduced yields in non-transgenic commercial plant varieties. Despite this success, it is still anticipated that insects may evolve resistance to *B. thuringiensis* δ -endotoxins expressed in transgenic plants. Such resistance, should it become widespread, would clearly limit the commercial value of germplasm containing genes encoding some *B. thuringiensis* δ -endotoxins.

[0006] One possible way of increasing the effectiveness of the transgenic insecticides against target pests and contemporaneously reducing the development of insecticide-resistant pests would be to ensure that transgenic crops express high levels of *B. thuringiensis* δ -endotoxins

- 2 -

(McGaughey and Whalon (1992), Science 258:1451-55; Roush Roush (1994), Biocontrol. Sci. Technol. 4:501-516). Of the many insecticidal proteins identified from *Bacillus thuringiensis*, relatively few individual insecticidal proteins such as Cry1's, Cry3's, VIP3A, Cry34, Cry35 and Cry2Ab have been tested for expression in plants. In the case of Cry2Ab, in order to achieve high levels of *in planta* expression, this insecticidal protein (Cry2Ab) had to be targeted to the chloroplast to avoid undesirable phytotoxic effects.

[0007] The expression of foreign genes in plants is known to be influenced by their chromosomal position, perhaps due to chromatin structure (*e.g.*, heterochromatin) or the proximity of transcriptional regulation elements (*e.g.*, enhancers) close to the integration site (Weising *et al.* (1988), Ann. Rev. Genet 22:421-477). For this reason, it is often necessary to screen a large number of events in order to identify an event characterized by optimal expression of an introduced gene of interest. For example, it has been observed in plants and in other organisms that there may be wide variation in the levels of expression of an introduced gene among events. There may also be differences in spatial or temporal patterns of expression, for example, differences in the relative expression of a transgene in various plant tissues, that may not correspond to the patterns expected from transcriptional regulatory elements present in the introduced gene construct. For this reason, it is common to produce several hundreds to several thousands different events and screen the events for a single event that has the desired transgene expression levels and patterns for commercial purposes. An event that has the desired levels or patterns of transgene expression is useful for introgressing the transgene into other genetic backgrounds by sexual outcrossing using conventional breeding methods. Progeny of such crosses maintain the transgene expression characteristics of the original transformant. This strategy is used to ensure reliable gene expression in a number of varieties that are suitably adapted to specific local growing conditions.

[0008] It is possible to detect the presence of a transgene by any well known nucleic acid detection method such as the polymerase chain reaction (PCR) or DNA hybridization using nucleic acid probes. These detection methods generally focus on frequently used genetic elements, such as promoters, terminators, marker genes, etc. As a result, such methods may not be useful for discriminating between different events, particularly those produced using the same DNA construct unless the sequence of chromosomal DNA adjacent to the inserted DNA

- 3 -

("flanking DNA") is known. An event-specific PCR assay is discussed, for example, by Taverniers et al. (J. Agric. Food Chem., 53: 3041-3052, 2005) in which an event-specific tracing system for transgenic maize lines Bt11, Bt176, and GA21 and for canola event GT73 is demonstrated. In this study, event-specific primers and probes were designed based upon the sequences of the genome/transgene junctions for each event. Transgenic plant event specific DNA detection methods have also been described in US Patent Nos. 6,893,826; 6,825,400; 6,740,488; 6,733,974; 6,689,880; 6,900,014 and 6,818,807.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0009] The present invention is related to the transgenic soybean plant designated MON87701 having seed deposited with American Type Culture Collection (ATCC) with Accession No. PTA-8194. Another aspect of the invention is the progeny plants, or seeds, or parts of the plants and seeds of the soybean event MON87701. The plant parts include, but are not limited to pollen, ovule, flowers, shoots, roots, stems, leaves, pods, seeds and meristematic tissues. The soybean plant MON87701 is particularly resistant to insects in the Lepidoptera family such as Velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatilis*), Soybean looper (*Pseudoplusia includens*), Soybean axil borer (*Epinotia aporema*), Yellow Bear Moth (*Spilosoma virginica*), Corn earworm (*Helicoverpa zea*), Fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) and Sunflower looper (*Rachiplusia nu*) amongst others, all of which are agriculturally important insect pests.

[0010] The present invention is also related to the DNA construct of soybean plant MON87701 and the detection of the transgene/genomic insertion region in soybean MON87701 and progeny thereof.

[0011] Novel genetic compositions contained in the genome of MON87701 and products from MON87701 such as meal, flour, food products, protein supplements and biomasses remaining in a field from which soybean plants corresponding to MON87701 have been harvested are further aspects of this invention.

[0012] According to one aspect of the invention, compositions and methods are provided for detecting the presence of the transgene/genomic insertion region from a novel soybean plant designated MON87701. DNA sequences are provided that comprise at least one junction sequence of MON87701 selected from the group consisting of SEQ ID NO:1 ([A] corresponding to positions 5748 through 5767 of SEQ ID NO:6 [F], Figure 2) and SEQ ID NO:2 ([B]

- 4 -

corresponding to positions 12,174 through 12,193 of SEQ ID NO:6 [F], Figure 2) and compliments thereof. The junction sequence is a nucleotide sequence that spans the point at which heterologous DNA inserted into the genome is linked to the soybean cell genomic DNA. Detection of this sequence in a biological sample containing soybean DNA is diagnostic for the presence of the soybean event MON87701 DNA in said sample. A soybean event MON87701 and soybean seed comprising these DNA molecules is an aspect of this invention.

[0013] DNA sequences that comprise novel transgene/genomic insertion region, SEQ ID NO:3 [C], SEQ ID NO:4 [D] and SEQ ID NO:5 [E] or SEQ ID NO:1 [A], SEQ ID NO:2 [B] and SEQ ID NO:5 [E] (see Figure 2) from soybean event MON87701 are also aspects of this invention. The soybean plant and seed comprising these molecules are further aspects of this invention.

[0014] According to another aspect of the invention, two DNA molecules are provided for use in a DNA detection method. The DNA molecules are of sufficient length of contiguous nucleotides of SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:5 or its complement to function as DNA primers or probes diagnostic for DNA extracted from soybean plant MON87701 or progeny thereof. For Example, the first DNA molecule comprises 11 or more contiguous polynucleotides of any portion of the transgene region of SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:5, or complement thereof, and a second DNA molecule of similar length of any portion of a 5' flanking soybean genomic DNA region of SEQ ID NO:3 or complement thereof, where these DNA molecules when used together are useful as DNA primers in a DNA amplification method that produces an amplicon. The amplicon produced using these DNA primers in the DNA amplification method is diagnostic for soybean event MON87701 when the amplicon contains SEQ ID NO:1. Any amplicon produced by DNA primers homologous or complementary to any portion of SEQ ID NO:3 and SEQ ID NO:5, and any amplicon that comprises SEQ ID NO:1 is an aspect of the invention.

[0015] According to another aspect of the invention, two DNA molecules are provided for use in a DNA detection method. The DNA molecules are of sufficient length of contiguous nucleotides of SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:5 or its complement to function as DNA primers or probes diagnostic for DNA extracted from soybean plant MON87701 or progeny thereof. For example, the first DNA molecule comprises 11 or more contiguous polynucleotides of any portion of the transgene region of the DNA molecule of SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:5, or complement thereof, and a second DNA molecule of similar length of any portion of a 3' flanking soybean

- 5 -

genomic DNA of SEQ ID NO:4 or complement thereof, where these DNA molecules when used together are useful as DNA primers in a DNA amplification method. The amplicon produced using these DNA primers in the DNA amplification method is diagnostic for soybean event MON87701 when the amplicon contains SEQ ID NO:2. Any amplicons produced by DNA primers homologous or complementary to any portion of SEQ ID NO:4 and SEQ ID NO:5, and any amplicon that comprises SEQ ID NO:2 is an aspect of the invention.

[0016] According to another aspect of the invention, two DNA molecules are provided for use in a DNA detection method. The DNA molecules are of sufficient length of contiguous nucleotides of SEQ ID NO:6 or its complement to function as DNA primers or probes diagnostic for DNA extracted from soybean plant MON87701 or progeny thereof. When used together as DNA primers in a DNA amplification method, an amplicon is produced that comprises SEQ ID NO:1 and/or SEQ ID NO:2. The amplicon produced is diagnostic for soybean event MON87701. Any amplicons produced by DNA primers homologous or complementary to any portion of SEQ ID NO:6, and any amplicon that comprises SEQ ID NO:1 and/or SEQ ID NO:2 is an aspect of the invention.

[0017] According to another aspect of the invention, methods of detecting the presence of DNA corresponding to the soybean event MON87701 in a biological sample are provided. Such methods comprise: (a) contacting the biological sample with a primer set that, when used in a nucleic acid amplification reaction with genomic DNA from soybean event MON87701, produces an amplicon that is diagnostic for soybean event MON87701; (b) performing a nucleic acid amplification reaction, thereby producing the amplicon; and (c) detecting the amplicon wherein said amplicon comprises SEQ ID NO:1 and/or SEQ ID NO:2, wherein detection of such amplicon is indicative of presence of the DNA corresponding to the soybean event MON87701.

[0018] According to another aspect of the invention, methods of detecting the presence of a DNA corresponding to the MON87701 event in a biological sample, such methods comprise: (a) contacting the biological sample with a probe that hybridizes under stringent hybridization conditions with genomic DNA from soybean event MON87701 and does not hybridize under the stringent hybridization conditions with a control soybean plant; (b) subjecting the biological sample and probe to stringent hybridization conditions; and (c) detecting hybridization of the probe to the soybean event MON87701 DNA, wherein detection of such hybridization in

- 6 -

indicative of presence of the DNA corresponding to the MON87701 event. Preferably, the probe is selected from the group consisting of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 and complement thereof.

[0019] A biological sample can comprise any organic material derived from soybean cells or tissue, including stems, roots, leaves, flowers or flower parts, seed or seed pods, and the like, that contains a detectable amount of a nucleotide sequence corresponding to such organic material. A biological sample derived from soybean event MON87701 comprises the transgene/genome insertion regions of the present invention, and particularly those as set forth in the Sequence Listing as shown in SEQ ID NO:1 through SEQ ID NO:6, and the complements thereof.

[0020] Kits for the detection of soybean event MON87701 are provided which use primers designed from SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 or SEQ ID NO:6. An amplicon produced using said kit is diagnostic for MON87701 when the amplicon (1) contains either nucleotide sequences set forth as SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2 or (2) contains both SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2. The kit can be provided as a means for specifically detecting only the present event MON87701 DNA in a biological sample, or the kit can be provided as a means for detecting a multiplicity of different transgenic events from any number of different biological samples. In the latter case, *i.e.*, a kit for detecting a multiplicity of different transgenic events, the kit may provide probes or primers in the form of a micro array, or any sort of array which provides the user of said kit with the ability to distinguish differences between transgenic and non-transgenic samples, zygosity of transgenic events, and even the presence or absence of events, whether approved or unapproved for commercialization. Detection or scoring of the presence or absence of certain events using such kits can be by fluorometric, colorimetric, isotopic, or luminescent means.

[0021] Another aspect of the invention is a soybean plant, or seed, or product derived from the plant or seed of MON87701, in which the genomic DNA when isolated from the soybean plant, or seed, or product comprises a DNA molecule incorporating SEQ ID NO:1 and/or SEQ ID NO:2. Preferably, the genomic DNA thereof comprises a DNA molecule consisting essentially of the nucleotide sequence of SEQ ID NO:3 from about positions 1 to 5757, the nucleotide sequence of SEQ ID NO:5 from about positions 1 to 6426 and the nucleotide sequence of SEQ ID NO:4 from about positions 379 to 2611 (the contig of which is presented as SEQ ID NO:6).

- 7 -

[0022] A further aspect of the invention is a soybean plant, or seed, or product derived from the plant or seed of MON87701, wherein the genomic DNA comprises a DNA molecule consisting essentially of the nucleotide sequence of SEQ ID NO:6 from about positions 1 to 14,416.

[0023] Another aspect of the invention is a soybean plant, or seed, or product derived from the plant or seed of MON87701, in which the genomic DNA when isolated from the soybean plant, or seed, or product produces an amplicon in a DNA amplification method, wherein said amplicon comprises SEQ ID NO:1 and/or SEQ ID NO:2.

[0024] Another aspect of the invention is a method of producing an insect resistant soybean plant. This method comprises: (a) crossing the soybean plant of MON87701 with another soybean plant; (b) obtaining at least one progeny plant derived from the cross of (a); and (c) selecting progeny that comprises nucleotide sequences of SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2. Said selection includes subjecting the at least one progeny plant obtained from (b) to a nucleic acid amplification reaction, wherein progeny that produces an amplicon comprising at least one nucleotide sequence of SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 or SEQ ID NO:6 is selected, or subjecting the at least one progeny plant obtained from (b) to a nucleic acid hybridization reaction, wherein progeny hybridizing to a probe that hybridizes under stringent conditions with one or more DNA sequence selected from SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2 is selected. The progeny so-selected is an insect resistant soybean plant.

[0025] Another aspect of the invention is a method for protecting a soybean plant from insect infestation. This method comprises providing in the diet of a Lepidopteran pest of soybean an insecticidally effective amount of cell(s) or tissue(s) of the soybean plant MON87701. The Lepidopteran pest is selected from the group consisting of *Anticarsia*, *Pseudoplusia*, *Epinotia*, *Spilosoma*, *Helicoverpa*, *Spodoptera* and *Rachiplusia*.

[0026] Another aspect of the invention is commodity product derived from a soybean plant, or seed, or seed progeny of MON87701. Such commodity products include, but are not limited to, whole or processed soy seeds, animal protein feed, vegetable oil, meal, flour, nontoxic plastics, printing inks, lubricants, waxes, hydraulic fluids, electric transformer fluids, solvents, cosmetics, hair care products, soymilk, soy nut butter, natto, tempeh, soy protein concentrate, soy protein isolates, texturized soy protein concentrate, hydrolyzed soy protein, whipped topping, cooking

- 8 -

oil, salad oil, shortening, lecithin, edible whole soybeans (raw, roasted, or as edamamé), soymilk, soy yogurt, soy cheese, tofu, yuba and biodiesel.

[0027] Another aspect of the invention is a method of determining zygosity of the progeny of soybean event MON87701. The method comprises (a) contacting a soybean sample with the primer pair SQ3443 (SEQ ID NO:12) and SQ3445 (SEQ ID NO:13), that when used in a nucleic acid amplification reaction with genomic DNA from soybean event MON87701, produces an amplicon from the combination of primers SQ3443 and SQ3445 that is diagnostic for soybean event MON87701; (b) performing a nucleic acid amplification reaction; (c) detecting a first amplicon produced; (d) contacting the same sample with the primer pair SQ3445 (SEQ ID NO:13) and SQ3446 (SEQ ID NO:14), that when used in a nucleic acid amplification reaction with genomic DNA from soybean plants produces an amplicon from the combination of primers SQ3445 and SQ3446 that is diagnostic of the wild-type soybean genomic DNA homologous to the soybean genomic region of a transgene insertion identified as soybean event MON87701; (e) performing a nucleic acid amplification reaction, and (f) detecting a second amplicon produced; wherein detection of both amplicons indicates that the soybean sample is heterozygous for soybean event MON87701 DNA.

[0028] Another aspect of the invention is a method of determining zygosity of the progeny of soybean event MON87701 further using probes labeled with fluorophore(s). Such method comprises (a) contacting a soybean sample with the primer pair SQ3443 (SEQ ID NO:12), SQ3445 (SEQ ID NO:13), and the probe 6FAMTM-labeled PB1111 (SEQ ID NO:15), that when used in a nucleic acid amplification reaction with genomic DNA from soybean event MON87701, produces an amplicon that is diagnostic for soybean event MON87701, releasing a fluorescent signal from the combination of primers SQ3443 and SQ3445 and probe 6FAMTM-labeled PB1111; (b) performing a nucleic acid amplification reaction; (c) detecting a first amplicon produced; (d) contacting the same sample with the primer pair SQ3445 (SEQ ID NO:13) and SQ3446 (SEQ ID NO:14) and a VICTM-labeled PB1112 (SEQ ID NO:16), that when used in a nucleic acid amplification reaction with genomic DNA from soybean plants, produces an amplicon that is diagnostic for wild-type soybean genomic DNA homologous to the soybean genomic region of a transgene insertion identified as soybean event MON87701, releasing a fluorescent signal from the combination of primers SQ3445 and SQ3446 and probe VICTM-

- 9 -

labeled PB1112; (e) performing a nucleic acid amplification reaction; and (f) detecting a second amplicon produced; wherein detection of both amplicons indicates that the soybean sample comprising DNA that is heterozygous for the transgene insertion identified as soybean event MON87701.

[0029] The foregoing and other aspects of the invention will become more apparent from the following detailed description.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0030] Figure 1 illustrates the map of binary transformation vector, pMON53570 that was used to generate soybean plant MON87701.

[0031] Figure 2 illustrates organization of the transgenic insert in the genome of soybean event MON87701: [A] corresponds to the relative position of SEQ ID NO:1 which forms the junction between SEQ ID NO:3 and SEQ ID NO:5; [B] corresponds to the relative position of SEQ ID NO:2 which forms the junction between SEQ ID NO:4 and SEQ ID NO:5; [C] corresponds to the relative position of SEQ ID NO:3, the soybean genome sequence flanking the arbitrarily assigned/designated 5' end of the expression cassette integrated into the genome in event MON87701; [D] corresponds to the relative position of SEQ ID NO:4, the soybean genome sequence flanking the arbitrarily assigned/designated 3' end of the expression cassette integrated into the genome in event MON87701; [E] represents the various elements comprising SEQ ID NO:5 and is the sequence of the expression cassette inserted into the genome of the event MON87701; and [F] represents the contiguous sequence comprising, as represented in the figure from left to right, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5 and SEQ ID NO:4, in which SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2 are incorporated as set forth above, as these sequences are present in the genome in event MON87701.

BRIEF DESCRIPTION OF THE SEQUENCES

[0032] SEQ ID NO:1 – A 20 nucleotide sequence representing the junction between the soybean genomic DNA and the integrated expression cassette (see Figure 2). This sequence corresponds to positions 5748 to 5767 of SEQ ID NO:6. In addition, SEQ ID NO:1 ([A]) is a nucleotide sequence corresponding to positions 5748 through 5757 of SEQ ID NO:3 ([C]) and the integrated right border of the TIC107 expression cassette corresponding to positions 1 through

- 10 -

10 of SEQ ID NO:5 ([E]). SEQ ID NO:1 also corresponds to positions 5748 to 5767 of the 5' flanking sequence, SEQ ID NO:3 ([C]).

[0033] SEQ ID NO:2 – A 20 nucleotide sequence representing the junction between the integrated expression cassette and the soybean genomic DNA (see Figure 2). This sequence corresponds to positions 12174 to 12193 of SEQ ID NO:6 ([F]). In addition, SEQ ID NO:2 ([B]) is a nucleotide sequence corresponding positions 6417 through 6426 of SEQ ID NO:5 ([E]) and the 3' flanking sequence corresponding to positions 379 through 388 of SEQ ID NO:4 ([D]). SEQ ID NO:2 ([B]) also corresponds to positions 369 to 388 of the 3' flanking sequence, SEQ ID NO:4 ([D]).

[0034] SEQ ID NO:3 ([C] of Figure 2) – The 5' sequence flanking the inserted DNA of MON87701 up to and including a region of transformation DNA (T-DNA) insertion.

[0035] SEQ ID NO:4 ([D] of Figure 2) – The 3' sequence flanking the inserted DNA of MON87701 up to and including a region of T-DNA insertion.

[0036] SEQ ID NO:5 ([E] of Figure 2) – The sequence of the integrated TIC107 expression cassette, including right and left border sequence after integration.

[0037] SEQ ID NO:6 ([F] of Figure 2) – A 14,416 bp nucleotide sequence representing the contig of the 5' sequence flanking the inserted DNA of MON87701 (SEQ ID NO:3), the sequence of the integrated expression cassette (SEQ ID NO:5) and the 3' sequence flanking the inserted DNA of MON87701 (SEQ ID NO: 4).

[0038] SEQ ID NO:7 – The TIC107 expression cassette of pMON53570.

[0039] SEQ ID NO:8 – The sequence of the TIC107 encoding DNA, including nucleotides encoding the chloroplast transit peptide.

[0040] SEQ ID NO:9 – Primer SQ1135 used to identify MON87701 events. Primer SQ1135 is complimentary to the 5' region of the inserted expression cassette, close to the right T-DNA insertion border corresponding to positions 5790 to 5766 of SEQ ID NO:6 and positions 33 to 9 of SEQ ID NO:5.

[0041] SEQ ID NO:10 – Primer SQ1136 used to identify MON87701 events. Primer SQ1136 corresponds to a 5' region flanking the inserted expression cassette close to the right T-DNA insertion border corresponding to positions 5705 to 5732 of SEQ ID NO:6 and positions 5705 to

- 11 -

5732 of SEQ ID NO:3. A PCR amplicon of about 86 bp produced using the combination of primers SQ1135 and SQ1136 is positive for the presence of the event MON87701.

[0042] SEQ ID NO:11 – Probe PB63 used to identify MON87701 events. This probe is a 6FAMTM-labeled synthetic oligonucleotide whose sequence is complimentary to positions 5763 to 5748 of SEQ ID NO:6. Release of a fluorescent signal in an amplification reaction using primers SQ1135 and SQ1136 in combination with 6FAMTM-labeled probe PB63 is diagnostic of event MON87701.

[0043] SEQ ID NO:12 – Primer SQ3443 used to determine zygosity of MON87701 events. Primer SQ3443 corresponds to a region of the inserted expression cassette, close to the left T-DNA border, corresponding to positions 12145 to 12168 of SEQ ID NO:6 and to positions 6388 to 6411 of SEQ ID NO:5.

[0044] SEQ ID NO:13 – Primer SQ3445 used to determine zygosity of MON87701 events. Primer SQ3445 is complimentary to the 3' region flanking the inserted expression cassette, close to the left T-DNA corresponding to positions 12215 to 12188 of SEQ ID NO:6 and to positions 410 to 383 SEQ ID NO:4. Detection of a PCR amplicon using primers SQ3443 and SQ3445 with or without 6FAMTM-labeled Probe PB1111 is positive for presence of event MON87701 in a zygosity assay.

[0045] SEQ ID NO:14 – Primer SQ3446 used to determine zygosity of MON87701 events. Primer SQ3446 corresponds to a region of the wild-type genomic DNA wherein insertion of the expression cassette for MON87701 occurred. Detection of a PCR amplicon using primer SQ3445 and SQ3446 with or without VICTM-labeled probe PB1112 is positive for the presence of the wild-type allele.

[0046] SEQ ID NO:15 – Probe PB1111 used to determine zygosity of MON87701 events. This probe is a 6FAMTM-labeled synthetic oligonucleotide whose sequence corresponds to positions 12172 to 12187 of SEQ ID NO:6. A PCR amplicon produced using primers SQ3443 and SQ3445 causes the release of a fluorescent signal using probe PB1111, which is positive for the presence of event MON87701 in a zygosity assay for MON87701 event.

[0047] SEQ ID NO:16 – Probe PB1112 used to determine zygosity of MON87701 events. This probe is a VICTM-labeled synthetic oligonucleotide whose sequence corresponds to a region of the wild-type genomic DNA immediately following the region of homology to primer SQ3446 at

- 12 -

the point of insertion of the expression cassette for event MON87701. A PCR amplicon produced using primers SQ3445 and SQ3446 causes the release of a fluorescent signal using probe PB1112, which is positive for the presence of the wild-type allele in a zygosity assay for MON87701 event. Heterozygosity of the MON87701 event is demonstrated by the fluorescent detection of two different amplicons using probes PB1111 and PB1112 in an amplification reaction using primers SQ3443, SQ3445 and SQ3446.

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

[0048] The following definitions and methods are provided to better define the present invention and to guide those of ordinary skill in the art in the practice of the present invention. Unless otherwise noted, terms are to be understood according to conventional usage by those of ordinary skill in the relevant art. Definitions of common terms in molecular biology may also be found in Rieger *et al.*, *Glossary of Genetics: Classical and Molecular*, 5th edition, Springer-Verlag: New York, 1991; and Lewin, *Genes V*, Oxford University Press: New York, 1994.

[0049] As used herein, the term "soybean" means *Glycine max* and includes all plant varieties that can be bred with soybean, including wild soybean species as well as those plants belonging to *Glycine soja* that permit breeding between species.

[0050] As used herein, the term "comprising" means "including but not limited to".

[0051] The term "glyphosate" refers to N-phosphonomethylglycine and its salts. N-phosphonomethylglycine is a well-known herbicide that has activity on a broad spectrum of plant species.

[0052] A "commodity product" refers to any product which is comprised of material derived from soybean or soybean oil and is sold to consumers. Processed soybeans are the largest source of protein feed and vegetable oil in the world. The soybean plant MON87701 can be used to manufacture commodities typically acquired from soy. Soybeans of MON87701 can be processed into meal, flour, as well as be used as a protein source in animal feeds for both terrestrial and aquatic animals. Soybeans and soybean oils from MON87701 can be used in the manufacture of many different products, not limited to, nontoxic plastics, printing inks, lubricants, waxes, hydraulic fluids, electric transformer fluids, solvents, cosmetics, and hair care products. Soybeans and soybean oils of MON87701 are suitable for use in a variety of soyfoods made from whole soybeans, such as soymilk, soy nut butter, natto, and tempeh, and soyfoods

- 13 -

made from processed soybeans and soybean oil, including soybean meal, soy flour, soy protein concentrate, soy protein isolates, texturized soy protein concentrate, hydrolyzed soy protein, whipped topping, cooking oil, salad oil, shortening, and lecithin. Whole soybeans are also edible, and are typically sold to consumers raw, roasted, or as edamamé. Soymilk, which is typically produced by soaking and grinding whole soybeans, may be consumed without other processing, spray-dried, or processed to form soy yogurt, soy cheese, tofu, or yuba.

[0053] Soybean Oils of MON87701 can be used to make biodiesel. The use of biodiesel in conventional diesel engines results in substantial reductions of pollutants such as sulfates, carbon monoxide, and particulates compared to petroleum diesel fuel, and use in school buses can greatly reduce exposure to toxic diesel exhaust. Biodiesel is typically obtained by extracting, filtering and refining soybean oil to remove free fats and phospholipids, and then transesterifying the oil with methanol to form methyl esters of the fatty acids (see for example US Patent No. 5,891,203). The resultant soy methyl esters are commonly referred to as "biodiesel." The oil derived from MON87701 may also be used as a diesel fuel without the formation of methyl esters, such as, for example, by mixing acetals with the oil (see for example US Patent No. 6,013,114). The seeds of MON87701 used to make said oils can be identified by the methods of the present invention. It is expected that purified oil from MON87701 event seeds or mixtures of seeds some or all of which are MON87701 will have relatively no DNA available for testing. However, the seeds from which the oils are extracted can be characterized with the method of the present invention to identify the presence of the MON87701 event within the population of seeds used to make said oils. Also, plant waste from the process used to make said oils can be used in the methods of the present invention to identify the presence of MON87701 events within a mixture of seeds processed to make said oils. Likewise, plant debris left after making a commodity product, or left behind following harvest of the soybean seed, can be characterized by the methods of the present invention to identify MON87701 events within the raw materials used to make said commodity products.

[0054] A transgenic "event" is produced by transformation of plant cells with heterologous DNA, *i.e.*, a nucleic acid construct that includes a transgene of interest, regeneration of a population of plants resulting from the insertion of the transgene into the genome of the plant, and selection of a particular plant characterized by insertion into a particular genome location.

- 14 -

The term "event" refers to the original transformant and progeny of the transformant that include the heterologous DNA. The term "event" also refers to progeny produced by a sexual outcross between the transformant and another variety that include the heterologous DNA. Even after repeated back-crossing to a recurrent parent, the inserted DNA and flanking DNA from the transformed parent is present in the progeny of the cross at the same chromosomal location. The term "event" also refers to DNA from the original transformant comprising the inserted DNA and flanking genomic sequence immediately adjacent to the inserted DNA that would be expected to be transferred to a progeny that receives inserted DNA including the transgene of interest as the result of a sexual cross of one parental line that includes the inserted DNA (e.g., the original transformant and progeny resulting from selfing) and a parental line that does not contain the inserted DNA. The present invention relates to the event MON87701 DNA, plant cells, tissues, seeds and processed products derived from MON87701.

[0055] It is also to be understood that two different transgenic plants can also be mated to produce offspring that contain two independently segregating added, exogenous genes. Selfing of appropriate progeny can produce plants that are homozygous for both added, exogenous genes. Back-crossing to a parental plant and out-crossing with a non-transgenic plant are also contemplated, as is vegetative propagation. Descriptions of other breeding methods that are commonly used for different traits and crops can be found in one of several references, e.g., Fehr, in *Breeding Methods for Cultivar Development*, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison WI (1987).

[0056] As used herein when referring to an "isolated DNA molecule", it is intended that the DNA molecule be one that is present, alone or in combination with other compositions, but not within its natural environment. For example, a coding sequence, intron sequence, untranslated leader sequence, promoter sequence, transcriptional termination sequence, and the like, that are naturally found within the DNA of a soybean genome are not considered to be isolated from the soybean genome so long as they are within the soybean genome. However, each of these components, and subparts of these components, would be "isolated" within the scope of this disclosure so long as the structures and components are not within the soybean genome. Similarly, a nucleotide sequence encoding a *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein or any insecticidal variant of that protein would be an isolated nucleotide sequence so long as the

- 15 -

nucleotide sequence was not within the DNA of the *Bacillus thuringiensis* bacterium from which the structure was first observed. An artificial nucleotide sequence encoding the same amino acid sequence or a substantially identical amino acid sequence that the native *B. thuringiensis* nucleotide sequence encodes would be considered to be isolated for the purposes of this disclosure. For the purposes of this disclosure, any transgenic nucleotide sequence, i.e., the nucleotide sequence of the DNA inserted into the genome of the cells of the soybean plant event MON87701 would be considered to be an isolated nucleotide sequence whether it is present within the plasmid used to transform soybean cells from which the MON87701 event arose, within the genome of the event MON87701, present in detectable amounts in tissues, progeny, biological samples or commodity products derived from the event MON87701. The nucleotide sequence or any fragment derived therefrom would therefore be considered to be isolated or isolatable if the DNA molecule can be extracted from cells, or tissues, or homogenate from a plant or seed or plant organ; or can be produced as an amplicon from extracted DNA or RNA from cells, or tissues, or homogenate from a plant or seed or plant organ, any of which is derived from such materials derived from the event MON87701. For that matter, the junction sequences as set forth at SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2, and nucleotide sequences derived from event MON87701 that also contain these junction sequences are considered to be isolated or isolatable, whether these sequences are present within the genome of the cells of event MON87701 or present in detectable amounts in tissues, progeny, biological samples or commodity products derived from the event MON87701.

[0057] A "probe" is an isolated nucleic acid to which is attached a conventional detectable label or reporter molecule, e.g., a radioactive isotope, ligand, chemiluminescent agent, or enzyme. Such a probe is complementary to a strand of a target nucleic acid, in the case of the present invention, to a strand of genomic DNA from soybean event MON87701 whether from a soybean plant or from a sample that includes DNA from the event. Probes according to the present invention include not only deoxyribonucleic or ribonucleic acids but also polyamides and other probe materials that bind specifically to a target DNA sequence and such binding can be used to detect the presence of that target DNA sequence.

[0058] "Primers" are isolated nucleic acids that are annealed to a complementary target DNA strand by nucleic acid hybridization to form a hybrid between the primer and the target DNA

- 16 -

strand, and then extended along the target DNA strand by a polymerase, *e.g.*, a DNA polymerase. Primer pairs of the present invention refer to their use for amplification of a target nucleic acid sequence, *e.g.*, by the polymerase chain reaction (PCR) or other conventional nucleic acid amplification methods.

[0059] Probes and primers are generally 11 nucleotides or more in length, preferably 18 nucleotides or more, more preferably 24 nucleotides or more, and most preferably 30 nucleotides or more. Such probes and primers hybridize specifically to a target sequence under high stringency hybridization conditions. Preferably, probes and primers according to the present invention have complete sequence similarity with the target sequence, although probes differing from the target sequence and that retain the ability to hybridize to target sequences may be designed by conventional methods.

[0060] Methods for preparing and using probes and primers are described, for example, in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., vol. 1-3, ed. Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 (hereinafter, "Sambrook *et al.*, 1989"); *Current Protocols in Molecular Biology*, ed. Ausubel *et al.*, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, 1992 (with periodic updates) (hereinafter, "Ausubel *et al.*, 1992"); and Innis *et al.*, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press: San Diego, 1990. PCR-primer pairs can be derived from a known sequence, for example, by using computer programs intended for that purpose such as Primer (Version 0.5, © 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA).

[0061] Primers and probes based on the flanking DNA and insert sequences disclosed herein can be used to confirm (and, if necessary, to correct) the disclosed sequences by conventional methods, *e.g.*, by re-cloning and sequencing such sequences.

[0062] The nucleic acid probes and primers of the present invention hybridize under stringent conditions to a target DNA sequence. Any conventional nucleic acid hybridization or amplification method can be used to identify the presence of DNA from a transgenic event in a sample. Nucleic acid molecules or fragments thereof are capable of specifically hybridizing to other nucleic acid molecules under certain circumstances. As used herein, two nucleic acid molecules are said to be capable of specifically hybridizing to one another if the two molecules are capable of forming an anti-parallel, double-stranded nucleic acid structure. A nucleic acid

- 17 -

molecule is said to be the "complement" of another nucleic acid molecule if they exhibit complete complementarity. As used herein, molecules are said to exhibit "complete complementarity" when every nucleotide of one of the molecules is complementary to a nucleotide of the other. Two molecules are said to be "minimally complementary" if they can hybridize to one another with sufficient stability to permit them to remain annealed to one another under at least conventional "low-stringency" conditions. Similarly, the molecules are said to be "complementary" if they can hybridize to one another with sufficient stability to permit them to remain annealed to one another under conventional "high-stringency" conditions. Conventional stringency conditions are described by Sambrook *et al.*, 1989, and by Haymes *et al.*, In: *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, DC (1985), Departures from complete complementarity are therefore permissible, as long as such departures do not completely preclude the capacity of the molecules to form a double-stranded structure. In order for a nucleic acid molecule to serve as a primer or probe it need only be sufficiently complementary in sequence to be able to form a stable double-stranded structure under the particular solvent and salt concentrations employed.

[0063] As used herein, a "substantially homologous sequence" is a nucleic acid sequence that will specifically hybridize to the complement of the nucleic acid sequence to which it is being compared under high stringency conditions. Appropriate stringency conditions which promote DNA hybridization, for example, 6.0 x sodium chloride/sodium citrate (SSC) at about 45°C, followed by a wash of 2.0 x SSC at 50°C, are known to those skilled in the art or can be found in *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. For example, the salt concentration in the wash step can be selected from a low stringency of about 2.0 x SSC at 50°C to a high stringency of about 0.2 x SSC at 50°C. In addition, the temperature in the wash step can be increased from low stringency conditions at room temperature, about 22°C, to high stringency conditions at about 65°C. Both temperature and salt may be varied, or either the temperature or the salt concentration may be held constant while the other variable is changed. In a preferred embodiment, a nucleic acid of the present invention will specifically hybridize to one or more of the nucleic acid molecules set forth in SEQ ID NO:1 and 2 or complements thereof or fragments of either under moderately stringent conditions, for example at about 2.0 x SSC and about 65°C. In a particularly preferred embodiment, a nucleic acid of the

- 18 -

present invention will specifically hybridize to one or more of the nucleic acid molecules set forth in SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2 or complements or fragments of either under high stringency conditions. In one aspect of the present invention, a preferred marker nucleic acid molecule of the present invention has the nucleic acid sequence set forth in SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2 or complements thereof or fragments of either. In another aspect of the present invention, a preferred marker nucleic acid molecule of the present invention shares 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% and 100% sequence identity with the nucleic acid sequence set forth in SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2 or complement thereof or fragments of either. In a further aspect of the present invention, a preferred marker nucleic acid molecule of the present invention shares 95%, 96%, 97%, 98%, 99% and 100% sequence identity with the sequence set forth in SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2 or complement thereof or fragments of either. SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2 may be used as markers in plant breeding methods to identify the progeny of genetic crosses similar to the methods described for simple sequence repeat DNA marker analysis, in "DNA markers: Protocols, applications, and overviews: (1997) 173-185, Cregan, et al., eds., Wiley-Liss NY"; all of which is herein incorporated by reference. The hybridization of the probe to the target DNA molecule can be detected by any number of methods known to those skilled in the art, these can include, but are not limited to, fluorescent tags, radioactive tags, antibody based tags, and chemilluminiscent tags.

[0064] Regarding the amplification of a target nucleic acid sequence (e.g., by PCR) using a particular amplification primer pair, "stringent conditions" are conditions that permit the primer pair to hybridize only to the target nucleic-acid sequence to which a primer having the corresponding wild-type sequence (or its complement) would bind and preferably to produce a unique amplification product, the amplicon, in a DNA thermal amplification reaction.

[0065] The term "specific for (a target sequence)" indicates that a probe or primer hybridizes under stringent hybridization conditions only to the target sequence in a sample comprising the target sequence.

[0066] As used herein, "amplified DNA" or "amplicon" refers to the product of nucleic acid amplification of a target nucleic acid sequence that is part of a nucleic acid template. For example, to determine whether the soybean plant resulting from a sexual cross contains

- 19 -

transgenic event genomic DNA from the soybean plant of the present invention, DNA extracted from a soybean plant tissue sample may be subjected to nucleic acid amplification method using a primer pair that includes a primer derived from flanking sequence in the genome of the plant adjacent to the insertion site of inserted heterologous DNA, and a second primer derived from the inserted heterologous DNA to produce an amplicon that is diagnostic for the presence of the event DNA. The amplicon is of a length and has a sequence that is also diagnostic for the event. The amplicon may range in length from the combined length of the primer pairs plus one nucleotide base pair, preferably plus about fifty nucleotide base pairs, more preferably plus about two hundred-fifty nucleotide base pairs, and even more preferably plus about four hundred-fifty nucleotide base pairs. Alternatively, a primer pair can be derived from flanking sequence on both sides of the inserted DNA so as to produce an amplicon that includes the entire insert nucleotide sequence. A member of a primer pair derived from the plant genomic sequence may be located a distance from the inserted DNA molecule, this distance can range from one nucleotide base pair up to about twenty thousand nucleotide base pairs. The use of the term "amplicon" specifically excludes primer dimers that may be formed in the DNA thermal amplification reaction.

[0067] Nucleic acid amplification can be accomplished by any of the various nucleic acid amplification methods known in the art, including the polymerase chain reaction (PCR). A variety of amplification methods are known in the art and are described, *inter alia*, in U.S. Patent Nos. 4,683,195 and 4,683,202 and in *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, ed. Innis *et al.*, Academic Press, San Diego, 1990. PCR amplification methods have been developed to amplify up to 22 kb of genomic DNA and up to 42 kb of bacteriophage DNA (Cheng *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5695-5699, 1994). These methods as well as other methods known in the art of DNA amplification may be used in the practice of the present invention. The sequence of the heterologous DNA insert or flanking sequence from soybean event MON87701 with seed samples deposited as ATCC PTA-8194 can be verified (and corrected if necessary) by amplifying such sequences from the event using primers derived from the sequences provided herein followed by standard DNA sequencing of the PCR amplicon or of the cloned DNA.

[0068] The amplicon produced by these methods may be detected by a plurality of techniques. One such method is Genetic Bit Analysis (Nikiforov, *et al.* Nucleic Acid Res. 22:4167-4175,

- 20 -

1994) where a DNA oligonucleotide is designed which overlaps both the adjacent flanking genomic DNA sequence and the inserted DNA sequence. The oligonucleotide is immobilized in wells of a microwell plate. Following PCR of the region of interest (using one primer in the inserted sequence and one in the adjacent flanking genomic sequence), a single-stranded PCR product can be hybridized to the immobilized oligonucleotide and serve as a template for a single base extension reaction using a DNA polymerase and labelled ddNTPs specific for the expected next base. Readout may be fluorescent or ELISA-based. A signal indicates presence of the insert/flanking sequence due to successful amplification, hybridization, and single base extension.

[0069] Another method is the Pyrosequencing technique as described by Winge (Innov. Pharma. Tech. 00:18-24, 2000). In this method an oligonucleotide is designed that overlaps the adjacent genomic DNA and insert DNA junction. The oligonucleotide is hybridized to single-stranded PCR product from the region of interest (one primer in the inserted sequence and one in the flanking genomic sequence) and incubated in the presence of a DNA polymerase, ATP, sulfurylase, luciferase, apyrase, adenosine 5' phosphosulfate and luciferin. dNTPs are added individually and the incorporation results in a light signal which is measured. A light signal indicates the presence of the transgene insert/flanking sequence due to successful amplification, hybridization, and single or multi-base extension.

[0070] Fluorescence Polarization as described by Chen, *et al.*, (Genome Res. 9:492-498, 1999) is a method that can be used to detect the amplicon of the present invention. Using this method an oligonucleotide is designed which overlaps the genomic flanking and inserted DNA junction. The oligonucleotide is hybridized to single-stranded PCR product from the region of interest (one primer in the inserted DNA and one in the flanking genomic DNA sequence) and incubated in the presence of a DNA polymerase and a fluorescent-labeled ddNTP. Single base extension results in incorporation of the ddNTP. Incorporation can be measured as a change in polarization using a fluorometer. A change in polarization indicates the presence of the transgene insert/flanking sequence due to successful amplification, hybridization, and single base extension.

[0071] TAQMAN® (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) is described as a method of detecting and quantifying the presence of a DNA sequence and is fully understood in the

- 21 -

instructions provided by the manufacturer. Briefly, a FRET oligonucleotide probe is designed which overlaps the genomic flanking and insert DNA junction. The FRET probe and PCR primers (one primer in the insert DNA sequence and one in the flanking genomic sequence) are cycled in the presence of a thermostable polymerase and dNTPs. Hybridization of the FRET probe results in cleavage and release of the fluorescent moiety away from the quenching moiety on the FRET probe. A fluorescent signal indicates the presence of the flanking/transgene insert sequence due to successful amplification and hybridization.

[0072] Molecular Beacons have been described for use in sequence detection as described in Tyangi, *et al.* (Nature Biotech.14:303-308, 1996). Briefly, a FRET oligonucleotide probe is designed that overlaps the flanking genomic and insert DNA junction. The unique structure of the FRET probe results in it containing secondary structure that keeps the fluorescent and quenching moieties in close proximity. The FRET probe and PCR primers (one primer in the insert DNA sequence and one in the flanking genomic sequence) are cycled in the presence of a thermostable polymerase and dNTPs. Following successful PCR amplification, hybridization of the FRET probe to the target sequence results in the removal of the probe secondary structure and spatial separation of the fluorescent and quenching moieties that in turn results in the production of a fluorescent signal. The fluorescent signal indicates the presence of the flanking/transgene insert sequence due to successful amplification and hybridization.

[0073] Other described methods, such as, microfluidics (US Patent pub. 2006068398, US Patent No.6,544,734) provide methods and devices to separate and amplify DNA samples. Optical dyes used to detect and quantitate specific DNA molecules (WO/05017181). Nanotube devices (WO/06024023) that comprise an electronic sensor for the detection of DNA molecules or nanobeads that bind specific DNA molecules and can then be detected.

[0074] DNA detection kits can be developed using the compositions disclosed herein and the methods well known in the art of DNA detection. The kits are useful for the identification of soybean event MON87701 DNA in a sample and can be applied to methods for breeding soybean plants containing the appropriate event DNA. The kits may contain DNA primers or probes that are homologous or complementary to SEQ ID NO:1 through SEQ ID NO:6 or DNA primers or probes homologous or complementary to DNA sequence of the genetic elements contained in the transgene insert. These DNA sequences can be used as primers in DNA

- 22 -

amplification reactions or as probes in a DNA hybridization method. The sequences of the genomic DNA and transgene genetic elements contained in MON87701 soybean genome as illustrated in Figure 2, consists of a portion of the right border region (RB) from *Agrobacterium tumefaciens*, a promoter sequence derived from the Arabidopsis ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase small subunit gene (herein referred to as P-RbcS4 located at positions 155 to 1850 on SEQ ID NO:5) is operably linked to an untranslated leader sequence derived from the Arabidopsis ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase small subunit gene (herein referred to as L-RbcS4 located at positions 1851 to 1877 on SEQ ID NO:5) operably connected to the insect toxin coding sequence, TIC107, which is comprised of a chloroplast transit peptide derived from transit peptide sequence of the Arabidopsis ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase small subunit gene and an insect toxin derived from Cry1Ac (herein referred to as TIC107 located at positions 1889 to 2141 for the transit peptide and positions 2142 to 5678 for the toxin coding sequence, respectively on SEQ ID NO:5) and is operably connected to a 3' termination region derived from the *Glycine max* 7S alpha' beta conglycinin storage protein gene (herein referred to as T-Sphas located at positions 5688 to 6126 on SEQ ID NO:5) and a portion of the left border (LB) region from *Agrobacterium tumefaciens*. DNA molecules useful as primers in DNA amplification methods can be derived from the sequences of the genetic elements of the transgene insert contained in the MON87701 event. These primer molecules can be used as part of a primer set that also includes a DNA primer molecule derived from the genome flanking the transgene insert of event MON87701 as presented in SEQ ID NO:3 from bases 1 through 5747 and SEQ ID NO:4 from bases 389 through 2611.

[0075] The soybean plant MON87701 was produced by an *Agrobacterium* mediated transformation process of an inbred soybean line with the plasmid construct pMON53570 (as shown in Figure 1). The transformation method used is similar to that described in US Patent 5,914,451. The plasmid construct pMON53570 contains the linked plant expression cassettes with the regulatory genetic elements necessary for expression of the TIC107 protein in soybean plant cells. Soybean cells were regenerated into intact soybean plants and individual plants were selected from the population of plants that showed integrity of the plant expression cassettes and resistance to Lepidopteran insect larvae feeding damage as well as a loss of the unlinked

- 23 -

glyphosate resistance selection cassette. A soybean plant that contains in its genome the linked plant expression cassettes of pMON53570 is an aspect of the present invention.

[0076] The plasmid DNA inserted into the genome of soybean plant MON87701 was characterized by detailed molecular analyses. These analyses included: the insert number (number of integration sites within the soybean genome), the copy number (the number of copies of the T-DNA within one locus), and the integrity of the inserted gene cassettes. DNA molecular probes were used that included the intact TIC107 coding region and its respective regulatory elements, the promoters, introns, and polyadenylation sequences of the plant expression cassettes, and the plasmid pMON53570 backbone DNA region. The data show that MON87701 contains a single T-DNA insertion with one copy of the TIC107 expression cassette. No additional elements from the transformation vector pMON53570, linked or unlinked to intact gene cassettes, were detected in the genome of MON87701. Finally, Inverse PCR and DNA sequence analyses were performed to determine the 5' and 3' insert-to-plant genome junctions, confirm the organization of the elements within the insert (Figure 2), and determine the complete DNA sequence of the insert in soybean plant MON87701 (SEQ ID NO:5).

[0077] The present invention is directed to a DNA molecule comprising a nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, or complement thereof. The DNA molecule preferably comprises a nucleotide sequence of SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6 or complement thereof. Still preferably, the DNA molecule consists essentially of the nucleotide sequence of SEQ ID NO:3 from positions 1 to 5757, the nucleotide sequence of SEQ ID NO:5 from positions 1 to 6426, and the nucleotide sequence of SEQ ID NO:4 from positions 379 to 2611, or complement thereof, or essentially of the nucleotide sequence of SEQ ID NO:6 or complement thereof.

[0078] The present invention is also directed to a soybean plant, or parts thereof, or seed that comprises the DNA molecule.

[0079] A composition derived from the soybean plant, or parts thereof, of the present invention is also provided. Such composition comprises a detectable amount of the DNA molecule and is a commodity product selected from soybean meal, soy flour, soy protein concentrate, soy protein isolates, texturized soy protein concentrate, hydrolyzed soy protein, soybean oil and whipped topping.

- 24 -

[0080] The present invention is further directed to a method of producing an insect resistant soybean plant. This method comprises: (a) crossing the soybean plant of MON87701 with another soybean plant; (b) obtaining at least one progeny plant derived from the cross of (a); and (c) selecting progeny that comprises nucleotide sequences of SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2. Said selection includes subjecting the at least one progeny plant obtained from (b) to a nucleic acid amplification reaction, wherein progeny that produces an amplicon comprising at least one nucleotide sequence of SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 or SEQ ID NO:6 is selected, or subjecting the at least one progeny plant obtained from (b) to a nucleic acid hybridization reaction, wherein progeny hybridizing to a probe that hybridizes under stringent conditions with one or more DNA sequence selected from SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2 is selected. The progeny so-selected is an insect resistant soybean plant.

[0081] The present invention is still further directed to a method for protecting a soybean plant from insect infestation. This method comprises providing in the diet of a Lepidopteran pest of soybean an insecticidally effective amount of cell(s) or tissue(s) of the soybean plant MON87701. The Lepidopteran pest is selected from the group consisting of *Anticarsia*, *Pseudoplusia*, *Epinotia*, *Spilosoma*, *Helicoverpa*, *Spodoptera* and *Rachiplusia*.

[0082] Still further provided in the present invention is a pair of DNA molecules comprising a first DNA molecule and a second DNA molecule, wherein the DNA molecules are of sufficient length of contiguous nucleotides of SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:5 or its complement; or SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:5 or its complement; or SEQ ID NO:6 or its complement; to function as DNA primers or probes diagnostic for DNA extracted from soybean plant MON87701 or progeny thereof.

[0083] For example, the first DNA molecule of the pair comprises 11 or more contiguous nucleotides of any portion of the transgene region of SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:5, or complement thereof, and the second DNA molecule of the pair comprises a similar length of a 5' flanking soybean genomic DNA region of SEQ ID NO:3, or complement thereof. A specific example is that the first DNA molecule comprises SEQ ID NO:9 and the second DNA molecule comprises SEQ ID NO:10.

[0084] Another example is that the first DNA molecule of the pair comprises 11 or more contiguous nucleotides of any portion of the transgene region of SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:5,

- 25 -

or complement thereof, and the second DNA molecule of the pair comprises a similar length of a 3' flanking soybean genomic DNA region of SEQ ID NO:4, or complement thereof. A specific example is that the first DNA molecule comprises SEQ ID NO:12 and the second DNA molecule comprises SEQ ID NO:13.

[0085] The present invention is further directed to a method of detecting the presence of a DNA molecule selected from the group consisting of SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 and SEQ ID NO:6 in a biological sample. This method comprises: (a) contacting the biological sample with a DNA primer pair comprising DNA primer molecules of sufficient length of contiguous nucleotides of SEQ ID NO:3 or its complement, SEQ ID NO:4 or its complement, SEQ ID NO:5 or its complement, or SEQ ID NO:6 or its complement, to function as DNA primers or probes diagnostic for DNA extracted from soybean plant MON87701 or progeny thereof; (b) providing a nucleic acid amplification reaction condition; (c) performing the nucleic acid amplification reaction, thereby producing a DNA amplicon molecule; and (d) detecting the DNA amplicon molecule so produced. Detection of an amplicon comprising at least one of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 and complement thereof is indicative of the presence of the DNA molecule in the biological sample.

[0086] The biological sample can comprise any organic material derived from soybean cells or tissue, including stems, roots, leaves, flowers or flower parts, seed or seed pods, and the like, that contains a detectable amount of a nucleotide sequence corresponding to such organic material. A biological sample derived from soybean event MON87701 comprises the transgene/genome insertion regions of the present invention, and particularly those as set forth in the Sequence Listing as shown in SEQ ID NO:1 through SEQ ID NO:6, and the complements thereof. For example, the biological sample suitable for the present invention can be soybean meal, soy flour, soy protein concentrate, soy protein isolates, texturized soy protein concentrate, hydrolyzed soy protein and whipped topping. The sample being tested can be a DNA sample extracted from a soybean plant.

[0087] The present invention is still further directed to a method of detecting the presence of a DNA molecule selected from the group consisting of SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 and SEQ ID NO:6 in a biological sample. Such method comprises: (a) contacting the biological sample with a DNA probe that hybridizes under stringent conditions with said DNA

- 26 -

molecule, and does not hybridize under the stringent conditions with a biological sample not containing the DNA molecule; (b) subjecting the biological sample and DNA probe to stringent hybridization conditions; and (c) detecting hybridization of the DNA probe to the biological sample. Detection of hybridization is indicative of the presence of the DNA molecule in the biological sample. For example, the biological sample being tested can be a DNA sample extracted from a soybean plant.

[0088] The probes used in the above detection method can comprise SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2 or complement thereof, or comprise SEQ ID NO:11 or SEQ ID NO:15. Specific examples of such probe include SEQ ID NO:11 or SEQ ID NO:15. Such probe can further be labeled with at least one fluorophore.

[0089] The present invention is still further directed to a DNA detection kit comprising: at least one DNA molecule of sufficient length of contiguous nucleotides homologous or complementary to SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, or SEQ ID NO:6 to function as a DNA primer or probe specific for soybean event MON87701 and/or its progeny. The at least one DNA molecule can comprise SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, or complement thereof. A specific example of such DNA molecule is SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, or complement thereof.

[0090] The present invention is still further directed to a method of determining zygosity of DNA of a soybean plant genome comprising soybean event MON87701 in a soybean sample. This method comprises: (a) contacting the sample with a first primer pair of SEQ ID NO:12 and SEQ ID NO:13, that when used together in a nucleic acid amplification reaction with soybean event MON87701 DNA, produces an amplicon that is diagnostic for soybean event MON87701; (b) performing a nucleic acid amplification reaction; (c) detecting a first amplicon so produced; (d) contacting the sample with a second primer pair of SEQ ID NO:13 and SEQ ID NO:14, that when used together in a nucleic acid amplification reaction with soybean genomic DNA other than soybean event MON87701 DNA, produces an amplicon that is diagnostic for soybean genomic DNA other than soybean event MON87701 DNA; (e) performing a nucleic acid amplification reaction; and (f) detecting a second amplicon so produced. Detection of both the amplicon that is diagnostic for soybean event MON87701 and the amplicon that is diagnostic for soybean genomic DNA other than soybean event MON87701 DNA indicates that the sample is heterozygous for soybean event MON87701 DNA. Preferably, the first primer pair is further

- 27 -

used together with probe of SEQ ID NO:15, and/or the second primer pair is further used with probe of SEQ ID NO:16.

[0091] The following examples are included to demonstrate examples of certain preferred embodiments of the invention. It should be appreciated by those of skill in the art that the techniques disclosed in the examples that follow represent approaches the inventors have found function well in the practice of the invention, and thus can be considered to constitute examples of preferred modes for its practice. However, those of skill in the art should, in light of the present disclosure, appreciate that many changes can be made in the specific embodiments that are disclosed and still obtain a like or similar result without departing from the spirit and scope of the invention.

EXAMPLES

Example 1: Transformation of Soybean A5547 with pMON53570 and event selection

[0092] The transgenic soybean plant MON87701 was generated by an Agrobacterium-mediated transformation of soybean cells with a DNA fragment derived from pMON53570 (Figure 1). The binary plant transformation vector, pMON53570, contains two plant transformation cassettes or T-DNAs. Each cassette is flanked by right border and left border sequences at the 5' and 3' ends of the transformation cassette, respectively. An expression cassette, presented as SEQ ID NO:7, is used for the expression of an insect toxin. The expression cassette is comprised of a promoter and leader sequence derived from the Arabidopsis ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase small subunit gene (P-RbcS4, Krebbers et al., (1988) Plant Mol. Biol. 11: 745-759) which is cloned directly upstream of the insect toxin coding sequence, TIC107, which in turn is cloned directly upstream of a terminator sequence derived from the Glycine max 7S alpha' beta conglycinin storage protein gene (T-Sphas, see for example, Schuler et al., (1982) Nucleic Acids Res. 10: 8225-8244). The insect toxin coding sequence, TIC107 is presented as SEQ ID NO:8. The nucleic acid sequence set forth as SEQ ID NO:8 is a synthetic or artificial sequence encoding an insecticidal toxin derived from Cry1Ac (US Patent 5,880,275) with a chloroplast transit peptide coding sequence derived from the Arabidopsis ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase small subunit gene cloned directly upstream of the insect toxin coding sequence.

- 28 -

[0093] The plant transformation vector, pMON53570 was mobilized into disarmed *Agrobacterium tumefaciens* strain ABI by electroporation and selected on spectinomycin and chloramphenicol. Explants from Asgrow soybean variety A5547 were transformed with pMON53570 using a method similar to that described in US Patent 5,914,451. Soybean explants and induced *A. tumefaciens* containing pMON53570 were mixed within 14 hours from the time of initiation of seed germination and wounding by sonication. Following wounding, explants were placed in culture for two to five days after which, they were transferred to selection media containing glyphosate for transformed plant cell selection and antibiotics.

[0094] Selection and formation of transgenic shoots was allowed to proceed for six to eight weeks. Developing shoots were sampled and assayed by PCR for the presence of the TIC107 cassette using primers based upon the TIC107 expression cassette sequence. Approximately 100-R0 transformation events were produced and tested for the presence of a single-copy of the transgene cassette. Southern analysis used as a first pass screen employed a restriction endonuclease that cleaved the expression cassette once. A single EcoRV site was inserted just inside the right border of the expression cassette. This enzyme cleaves with sufficient frequency in the soybean genome as to usually disassociate closely linked copies of the transgene in multiple copy events. TAQMAN® analysis was also performed to confirm copy number in the R0 generation as described below. Forty two of the R0 events demonstrated a single-copy insertion of the transgene cassette and were allowed to self pollinate to generate F1 progeny. Seventy five F1 plants were grown from seed from each of the selected forty two R0 events. A non-lethal spray of glyphosate was applied to all of the F1 progeny. Those F1 progeny in which the glyphosate resistance cassette was unlinked, turned yellow demonstrating the absence of the glyphosate selection cassette. One hundred and fifteen plants were identified as unlinked events. The one hundred and fifteen F1 plants were allowed to recover from the glyphosate application and then tested for insect resistance to feeding against *Anitcarsia gemmatalis* and *Pseudoplusia includens* at R1 and R7 growth stages. All events passed the bioassay criteria of less than 10% feeding against *Anitcarsia* and *Pseudoplusia*.

[0095] Southern analysis was performed on the one hundred and fifteen selected F1 plants to confirm the presence of the expression cassette and absence of undesired nucleotide sequences from the transformation vector. Twelve events were selected from the pool of one hundred and

- 29 -

fifteen as the most suitable events for further F1 evaluation of copy number by Southern analysis. TAQMAN® and zygosity assays were also performed on the selected F1 events as described below. Out of the twelve F1 selected events, nine demonstrated by preliminary Southern analysis a single copy of the toxin expression cassette. Several lines from the nine events were carried forward to the F2 and F3 generation for further insect trials and genetic characterization. Only a single F1 plant from each line was selected to generate seed for successive generations.

[0096] At F3 generation, a more detailed Southern analysis was performed on four selected lines to build a more detailed restriction enzyme map of the inserted expression cassette. Out of the nine events, one event was completely free of backbone, the glyphosate resistance cassette and the plasmid origin of replication. This event was later discovered to have two unlinked insect toxin expression cassettes and gave rise to several lines of progeny. One progeny line also designated event MON87701 was selected at F3 generation based upon its performance characteristics and molecular characterization. Flanking sequence was generated for each of the selected F3 generation lines using inverse PCR as described below. R0 event selection and F1 zygosity analysis were performed as described below using sequences deduced through inverse PCR of the transformed and wild type lines.

Example 2: Isolation of flanking sequences using inverse PCR

[0097] Sequences flanking the T-DNA insertion in MON87701 were determined using inverse PCR as described in Ochman et al., 1990 (PCR Protocols: A guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc.). Plant genomic DNA was isolated from both Asgrow A5547 and the transgenic lines from tissue grown under green house conditions for Southern and TAQMAN® analysis. Approximately 1 gram of young trifoliate leaf tissue was combined with liquid nitrogen and ground to a fine powder using a mortar and pestle. DNA was extracted using a Nucleon Plant DNA extraction kit (RPN8511, Amersham, Piscataway, NJ) according to the manufacturer's protocol. After the final precipitation step, DNAs were resuspended in 0.5 ml of TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA). This method can be modified by one skilled in the art to extract DNA from any tissue of soybean, including, but not limited to seed.

- 30 -

[0098] An aliquot of DNA was digested with restriction endonucleases selected based upon restriction analysis of the T-DNA. After self-ligation of restriction fragments, PCR was performed using primers designed from the T-DNA sequence that would amplify sequences extending away from the 5' and 3' ends of the T-DNA. PCR products were separated by agarose gel electrophoresis and purified using a QIAGEN gel purification kit (Qiagen, Valencia, CA). The subsequent products were sequenced directly using standard sequencing protocols. The 5' flanking sequence which extends into the right border sequence of the TIC107 expression cassette T-DNA is presented as SEQ ID NO:3 ([C], see Figure 2). The 3' flanking sequence which extends into the left border sequence of the TIC107 expression cassette T-DNA is presented as SEQ ID NO:4 ([D], see Figure 2). The portion of the TIC107 expression cassette DNA (SEQ ID NO:7) that was fully integrated into the A5547 genomic DNA is presented as SEQ ID NO:5 ([E], see Figure 2).

[0099] Isolated sequences were compared to the T-DNA sequence to identify the flanking sequence and the co-isolated T-DNA fragment. Confirmation of the presence of the expression cassette was achieved by PCR with primers designed based upon the deduced flanking sequence data and the known T-DNA sequence. The A5547 wild type sequence corresponding to the same region in which the T-DNA was integrated in the transformed line was isolated using primers designed from the flanking sequences in MON87701. The PCR reactions were performed using the Elongase amplification system (Invitrogen, Carlsbad, CA). The flanking sequences in MON87701 and the A5547 wild type sequence were analyzed against multiple nucleotide and protein databases. This information was used to examine the relationship of the transgene to the plant genome and to look for the insertion site integrity. The flanking sequence and wild type sequences were used to design primers for TAQMAN® endpoint assays used to identify the events and determine zygosity as described in example 3.

Example 3: Event specific endpoint TAQMAN® and Zygosity assays.

[0100] The methods used to identify event MON87701 in a sample are described in an event specific endpoint TAQMAN® PCR for which examples of conditions are described in Table 1 and Table 2. The DNA primers used in the endpoint assay are primers SQ1135 (SEQ ID NO:9), SQ1136 (SEQ ID NO:10) and 6FAMTM labeled primer PB63 (SEQ ID NO:11). 6FAMTM is a

fluorescent dye product of Applied Biosystems (Foster City, CA) attached to the DNA primer. For TAQMAN® MGB probes, the 5' exonuclease activity of Taq DNA polymerase cleaves the probe from the 5'-end, between the fluorophore and quencher. When hybridized to the target DNA strand, quencher and fluorophore are separated enough to produce a fluorescent signal, thus releasing fluorescence.

[00101] SQ1135 (SEQ ID NO:9) and SQ1136 (SEQ ID NO:10) when used in these reaction methods with PB63 (SEQ ID NO:11) produce a DNA amplicon that is diagnostic for event MON87701 DNA. The controls for this analysis should include a positive control from soybean containing event MON87701 DNA, a negative control from non-transgenic soybean and a negative control that contains no template DNA.

[00102] These assays are optimized for use with an Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700 or Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700, or Eppendorf Mastercycler Gradient thermocycler. Other methods and apparatus known to those skilled in the art that produce amplicons that identify the event MON87701 DNA is within the skill of the art.

[00103] Proceed with the DNA amplification in a Stratagene Robocycler, or MJ Engine, or Perkin-Elmer 9700, or Eppendorf Mastercycler Gradient thermocycler or Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700 or MJ Research DNA Engine PTC-225 thermal cycler using the following cycling parameters. When running the PCR in the Eppendorf Mastercycler Gradient or MJ Engine, the thermocycler should be run in the calculated mode. When running the PCR in the Perkin-Elmer 9700, run the thermocycler with the ramp speed set at maximum.

Table 1. Soybean MON87701 Event Specific Endpoint TAQMAN® PCR

Step	Reagent	Volume	Comments
1	18 megohm water	adjust for final volume of 10 µl	
2	2X Universal Master Mix (Contains dNTPs, enzyme and buffer)	5.0 µl	1X final concentration of dNTPs, enzyme and buffer
3	Primer-1 and Primer-2 Mix (resuspended in 18 megohm water to a concentration of 20 uM for each primer) Example: In a microcentrifuge tube, the	0.5 µl	1.0 µM final concentration

Step	Reagent	Volume	Comments
	following should be added to achieve 500 ul at a final concentration of 20uM: 100 ul of Primer SQ1135 (SEQ ID NO:9) at a concentration of 100 uM 100 ul of Primer SQ1136 (SEQ ID NO:10) at a concentration of 100 uM 300 ul of 18 megohm water		
4	Event 6-FAM TM MGB Probe PB63 (SEQ ID NO:11) (resuspended in 18 megohm water to a concentration of 10 uM)	0.2 µl	0.2 µM final concentration
5	Extracted DNA (template): 1. Leaf Samples to be analyzed 2. Negative control (non-transgenic DNA) 3. Negative water control (no template control) 4. Positive control GM_A19459A DNA	3.0 µl	

Table 2. Endpoint TAQMAN® thermocycler conditions

Cycle No.	Settings
1	50°C 2 minutes
1	95°C 10 minutes
10	95°C 15 seconds 64°C 1 minute -1°C/cycle
30	95°C 15 seconds 54°C 1 minute
1	10°C Forever

- 33 -

[00104] R0 plants demonstrating the presence of the TIC107 expression cassette were allowed to develop into fully mature plants. The R0 plants were evaluated for the occurrence of linkage between the TIC107 expression cassette and the glyphosate resistance expression cassette using Southern analysis with a DNA restriction enzyme known to not cut into both cassettes and the region between each cassette in the plasmid, *PacI*. Probes designed based upon the sequences of the glyphosate resistance cassette, the TIC107 cassette and the origin of replication (OR-Ec.oriV-RK2) which resides in between the two expression cassettes in pMON53570 were used to probe Southern blots to determine linkage. The R0 plants were also evaluated for copy number of the TIC107 expression cassette using a combination of Southern analysis and endpoint TAQMAN®. R0 plants demonstrating an unlinked relationship between the Glyphosate resistance cassette and the TIC107 expression cassette were allowed to self pollinate and produce F1 progeny.

[00105] F1 plants were assayed for the absence of the glyphosate resistance cassette due to segregation occurring in the F1 population from unlinked self-pollinated R0 transformed events. A non-lethal application of glyphosate was applied to the F1 individuals. Those plants in which the resistance cassette was lost due to segregation demonstrated damage from the application of glyphosate. These plants were allowed to recover and develop normally. Zygosity assays for the TIC107 expression cassette were performed upon F1 plants using a TAQMAN® endpoint assay as described below.

[00106] The methods used to determine zygosity for event MON87701 in a sample are described in an event specific zygosity endpoint TAQMAN PCR for which examples of conditions are described in Table 3 and Table 4. The DNA primers used in the zygosity assay are primers SQ3443 (SEQ ID NO:12), SQ3445 (SEQ ID NO:13), SQ3446 (SEQ ID NO:14), 6FAMTM-labeled primer PB1111 (SEQ ID NO:15) and VICTM-labeled primer PB1112 (SEQ ID NO:16). 6FAMTM and VICTM are fluorescent dye products of Applied Biosystems (Foster City, CA) attached to the DNA primers. For TAQMAN MGB probes, the 5' exonuclease activity of Taq DNA polymerase cleaves the probe from the 5'-end, between the fluorophore and quencher. When hybridized to the target DNA strand, quencher and fluorophore are separated enough to produce a fluorescent signal, thus releasing fluorescence.

[00107] SQ3443 (SEQ ID NO:12) and SQ3445 (SEQ ID NO:13) when used in these reaction methods with PB1111 (SEQ ID NO:15) produce a DNA amplicon that is diagnostic for event

MON87701 DNA. The controls for this analysis should include a positive control from soybean containing event MON87701 DNA, a negative control from non-transgenic soybean and a negative control that contains no template DNA.

[00108] SQ3445 (SEQ ID NO:13) and SQ3446 (SEQ ID NO:14) when used in these reaction methods with PB1112 (SEQ ID NO:16) produce a DNA amplicon that is diagnostic for the wild type allele.

[00109] Heterozygosity is determined by the presence of both amplicons demonstrated by the liberation of fluorescent signal from both probes PB1111 and PB1112.

[00110] These assays are optimized for use with an Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700 or Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700, or Eppendorf Mastercycler Gradient thermocycler. Other methods and apparatus known to those skilled in the art that produce amplicons that identify the event MON87701 DNA is within the skill of the art.

[00111] Proceed with the DNA amplification in a Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700, or Eppendorf Mastercycler Gradient thermocycler or Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700 or MJ Research DNA Engine PTC-225 thermal cycler using the following cycling parameters. When running the PCR in the Eppendorf Mastercycler Gradient or MJ Engine, the thermocycler should be run in the calculated mode. When running the PCR in the Perkin-Elmer 9700, run the thermocycler with the ramp speed set at maximum.

Table 3. Soybean MON87701 Event Specific Zygosity Endpoint TAQMAN® PCR

Step	Reagent	Volume	Comments
1	18 megohm water	adjust for final volume of 10 µl	
2	2X Universal Master Mix (Contains dNTPs, enzyme and buffer)	5.0 µl	1X final concentration of dNTPs, enzyme and buffer
3	Zygosity Primer-1, Primer-2, & Primer-3 Mix (resuspended in 18 megohm water to a concentration of 20 µM for each primer) Example: In a microcentrifuge tube, the following should be added to	0.5 µl	1.0 µM final concentration

Step	Reagent	Volume	Comments
	achieve 500 ul at a final concentration of 20uM: 100 ul of Primer SQ3443 (SEQ ID NO:12) at a concentration of 100 uM 100 ul of Primer SQ3445 (SEQ ID NO:13) at a concentration of 100 uM 100 ul of Primer SQ3446 (SEQ ID NO:14) at a concentration of 100 uM 200 ul of 18 megohm water		
4	Event 6-FAM ^{1M} MGB Probe PB1111 (SEQ ID NO:15) (resuspended in 18 megohm water to a concentration of 10 uM)	0.2 µl	0.2 µM final concentration
5	WT VIC ^{1M} MGB Probe PB1112 (SEQ ID NO:16) (resuspended in 18 megohm water to a concentration of 10 uM)	0.2 µl	0.2 µM final concentration
6	Extracted DNA (template): 1. Leaf Samples to be analyzed 2. Negative control (non-transgenic DNA) 3. Negative water control (no template control) 4. Positive control Homozygous GM_A19459A DNA 5. Positive control Hemizygous GM_A19459A DNA	3.0 µl	

Table 4. Zygosity Endpoint TAQMAN® thermocycler conditions

Cycle No.	Settings
1	50°C 2 minutes
1	95°C 10 minutes
10	95°C 15 seconds 64°C 1 minute -1°C/cycle
30	95°C 15 seconds 54°C 1 minute
1	10°C Forever

- 36 -

[00112] The event MON87701 F1 plants were also tested for resistance to *Anticarsia* and *Pseudoplusia*. Resistance was defined as less than 10% feeding in the R1 and R7 growth stages. Copy number analysis was further performed on selected F1 individuals using Southern analysis and a restriction endonuclease known to cut in one single location within the TIC107 expression cassette, *EcoRV*. Expression of the TIC107 protein in the F1 population was confirmed using protein test strips (EnviroLogix, QuickStix™ Kit for Cry1Ac Cotton Leaf & Seed, Cat. # AS 003, Portland, Maine 04103) following the manufacturer's protocol. Southern analysis was performed on selected events in the F3 population to confirm the presence of a single intact T-DNA insert. Ultimate line selection was based upon performance characteristics in field testing, protein expression and molecular characterization.

Example 4: Identification of event MON87701 in any MON87701 breeding event

[00113] The following example describes how one may identify the MON87701 event within progeny of any breeding event using MON87701 soybean.

[00114] DNA event primer pairs are used to produce an amplicon diagnostic for soybean event MON87701. An amplicon diagnostic for MON87701 comprises at least one junction sequence, SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2 ([A] and [B], respectively as illustrated in Figure 2). SEQ ID NO:1 ([A] of Figure 2) is a nucleotide sequence corresponding to the junction of the 5' flanking sequence (positions 5748 through 5757 of SEQ ID NO:3 [C], see Figure 2) and the integrated right border of the TIC107 expression cassette (positions 1 through 10 of SEQ ID NO:5 [E], see figure 2). SEQ ID NO:1 also corresponds to positions 5748 to 5767 of the 5' flanking sequence, SEQ ID NO:3 ([C], see Figure 2). SEQ ID NO:2 ([B], see Figure 2) is a nucleotide sequence corresponding to the junction of the integrated left border of the TIC107 expression cassette (positions 6417 through 6426 of SEQ ID NO:5 [E], see Figure 2) and the 3' flanking sequence (positions 379 through 388 of SEQ ID NO:4 [D], see Figure 2). SEQ ID NO:2 ([C], see Figure 2) also corresponds to positions 369 to 388 of the 3' flanking sequence, SEQ ID NO:4 ([D], see Figure 2).

[00115] Event primer pairs that will produce a diagnostic amplicon for MON87701 include primer pairs based upon the flanking sequences and the inserted TIC107 expression cassette. To acquire a diagnostic amplicon in which at least 11 nucleotides of SEQ ID NO:1 is found, one

- 37 -

would design a forward primer based upon SEQ ID NO:3 from bases 1 through 5747 and a reverse primer based upon the TIC107 inserted expression cassette, SEQ ID NO:5 from positions 10 through 6416. To acquire a diagnostic amplicon in which at least 11 nucleotides of SEQ ID NO:2 is found, one would design a forward primer based upon the TIC107 inserted expression cassette, SEQ ID NO:5 from positions 10 through 6416 and a reverse primer based upon the 3' flanking sequence, SEQ ID NO:4 from bases 389 through 2611. For practical purposes, one should design primers which produce amplicons of a limited size range, preferably between 200 to 1000 bases. Smaller sized amplicons in general are more reliably produced in PCR reactions, allow for shorter cycle times, and can be easily separated and visualized on agarose gels or adapted for use in endpoint TAQMAN®-like assays. In addition, amplicons produced using said primer pairs can be cloned into vectors, propagated, isolated and sequenced or can be sequenced directly with methods well established in the art. Any primer pair derived from the combination of SEQ ID NO:3 and SEQ ID NO:5 or the combination of SEQ ID NO:4 and SEQ ID NO:5 that are useful in a DNA amplification method to produce an amplicon diagnostic for MON87701 or progeny thereof is an aspect of the present invention. Any single isolated DNA polynucleotide primer molecule comprising at least 11 contiguous nucleotides of SEQ ID NO:3, or its complement that is useful in a DNA amplification method to produce an amplicon diagnostic for MON87701 or progeny thereof is an aspect of the present invention. Any single isolated DNA polynucleotide primer molecule comprising at least 11 contiguous nucleotides of SEQ ID NO:4, or its complement that is useful in a DNA amplification method to produce an amplicon diagnostic for MON87701 or progeny thereof is an aspect of the present invention. Any single isolated DNA polynucleotide primer molecule comprising at least 11 contiguous nucleotides of SEQ ID NO:5, or its complement that is useful in a DNA amplification method to produce an amplicon diagnostic for MON87701 or progeny thereof is an aspect of the present invention.

[00116] An example of the amplification conditions for this analysis is illustrated in Table 5 and Table 6. However, any modification of these methods or the use of DNA primers homologous or complementary to SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:4 or DNA sequences of the genetic elements contained in the transgene insert (SEQ ID NO:5) of MON87701 that produce an amplicon diagnostic for MON87701, is within the art. A diagnostic amplicon comprises a DNA molecule

- 38 -

homologous or complementary to at least one transgene/genomic junction DNA (SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2), or a substantial portion thereof.

[00117] An analysis for event MON87701 plant tissue sample should include a positive tissue control from event MON87701, a negative control from a soybean plant that is not event MON87701, for example, but not limited to A5547, and a negative control that contains no soybean genomic DNA. A primer pair that will amplify an endogenous soybean DNA molecule will serve as an internal control for the DNA amplification conditions. Additional primer sequences can be selected from SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, or SEQ ID NO:5 by those skilled in the art of DNA amplification methods, and conditions selected for the production of an amplicon by the methods shown in Table 5 and Table 6 may differ, but result in an amplicon diagnostic for event MON87701 DNA. The use of these DNA primer sequences with modifications to the methods of Table 5 and Table 6 are within the scope of the invention. The amplicon produced by at least one DNA primer sequence derived from SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, or SEQ ID NO:5 that is diagnostic for MON87701 is an aspect of the invention.

[00118] DNA detection kits that contain at least one DNA primer derived from SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, or SEQ ID NO:5, that when used in a DNA amplification method, produces a diagnostic amplicon for MON87701 or its progeny is an aspect of the invention. A soybean plant or seed, wherein its genome will produce an amplicon diagnostic for MON87701 when tested in a DNA amplification method is an aspect of the invention. The assay for the MON87701 amplicon can be performed by using an Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700 or Stratagene Robocycler, or MJ Engine, or Perkin-Elmer 9700, or Eppendorf Mastercycler Gradient thermocycler or any other amplification system that can be used to produce an amplicon diagnostic of MON87701 as shown in Table 6.

Table 5. Soybean MON87701 Event Specific PCR Assay

Step	Reagent	Volume	Comments
1	18 megohm water	adjust for final volume of 10 μ l	
2	2X Universal Master Mix (Contains dNTPs, enzyme and buffer)	5.0 μ l	1X final concentration of dNTPs, enzyme and buffer

Step	Reagent	Volume	Comments
3	Primer-1 and Primer-2 Mix (resuspended in 18 megohm water to a concentration of 20 uM for each primer) Example: In a microcentrifuge tube, the following should be added to achieve 500 ul at a final concentration of 20uM: 100 ul of Primer 1 at a concentration of 100 uM 100 ul of Primer 2 at a concentration of 100 uM 300 ul of 18 megohm water	0.5 µl	1.0 µM final concentration
5	Extracted DNA (template) 50 ng of genomic DNA: Leaf Samples to be analyzed Negative control (non-transgenic DNA) Negative water control (no template control) Positive control MON88701 DNA	3.0 µl	

Table 6 Soybean MON87701 Event Thermocycler Conditions

Cycle No.	Settings
1	50°C 2 minutes
1	95°C 10 minutes
10	95°C 15 seconds 64°C 1 minute -1°C/cycle
30	95°C 15 seconds 54°C 1 minute
1	10°C Forever

[00119] A deposit of the soybean event MON87701 seed disclosed above and recited in the claims, has been made under the Budapest Treaty with the American Type Culture Collection

- 40 -

(ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA. 20110. The ATCC accession number is PTA-8194. The deposit will be maintained in the depository for a period of 30 years, or 5 years after the last request, or for the effective life of the patent, whichever is longer, and will be replaced as necessary during that period.

[00120] Having illustrated and described the principles of the present invention, it should be apparent to persons skilled in the art that the invention can be modified in arrangement and detail without departing from such principles. We claim all modifications that are within the spirit and scope of the appended claims.

000052

- 41 -

Claims:

1. A DNA molecule comprising a nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, or complement thereof.
2. The DNA molecule of claim 1, comprising a nucleotide sequence of SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 or complement thereof.
3. The DNA molecule of claim 2, consisting essentially of the nucleotide sequence of SEQ ID NO:3 from positions 1 to 5757, the nucleotide sequence of SEQ ID NO:5 from positions 1 to 6426, and the nucleotide sequence of SEQ ID NO:4 from positions 379 to 2611, or complement thereof.
4. The DNA molecule of claim 2, consisting essentially of the nucleotide sequence of SEQ ID NO:6 or complement thereof.
5. A soybean plant, or parts thereof, comprising the DNA molecule of any one of claims 1 to 4.
6. Seed of the soybean plant of claim 5, wherein said seed comprises said DNA molecule.
7. A composition derived from the soybean plant, or parts thereof, as set forth in claim 5, wherein said composition comprises a detectable amount of said DNA molecule, and wherein said composition is a commodity product selected from the group consisting of soybean meal, soy flour, soy protein concentrate, soy protein isolates, texturized soy protein concentrate, hydrolyzed soy protein, soybean oil and whipped topping.
8. A method of producing an insect resistant soybean plant comprising:
 - (a) crossing the soybean plant of claim 5 with another soybean plant;
 - (b) obtaining at least one progeny plant derived from the cross of (a); and
 - (c) selecting progeny that comprises nucleotide sequences of SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2, wherein said selected progeny is an insect resistant soybean plant.
9. The method of claim 8, wherein said selecting step (c) includes subjecting said at least one progeny plant obtained from (b) to a nucleic acid amplification reaction, wherein progeny that produces an amplicon comprising at least one nucleotide sequence of SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 or SEQ ID NO:6 is selected, or subjecting said at least one progeny plant obtained from (b) to a nucleic acid hybridization reaction,

- 42 -

- wherein progeny hybridizing to a probe that hybridizes under stringent conditions with one or more DNA sequence selected from SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2 is selected.
10. A method for protecting a soybean plant from insect infestation, comprising providing in the diet of a Lepidopteran pest of soybean an insecticidally effective amount of cell(s) or tissue(s) of the soybean plant, or parts thereof, of claim 5.
 11. The method of claim 10, wherein said Lepidopteran pest is selected from the group consisting of *Anticarsia*, *Pseudoplusia*, *Epinotia*, *Spilosoma*, *Helicoverpa*, *Spodoptera* and *Rachiplusia*.
 12. A pair of DNA molecules comprising: a first DNA molecule and a second DNA molecule, wherein the DNA molecules are of sufficient length of contiguous nucleotides of SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:5 or its complement to function as DNA primers or probes diagnostic for DNA extracted from soybean plant MON87701 or progeny thereof.
 13. A pair of DNA molecules comprising: a first DNA molecule and a second DNA molecule, wherein the DNA molecules are of sufficient length of contiguous nucleotides of SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:5 or its complement to function as DNA primers or probes diagnostic for DNA extracted from soybean plant MON87701 or progeny thereof.
 14. A pair of DNA molecules comprising: a first DNA molecule and a second DNA molecule, wherein the DNA molecules are of sufficient length of contiguous nucleotides of SEQ ID NO:6 or its complement to function as DNA primers or probes diagnostic for DNA extracted from soybean plant MON87701 or progeny thereof.
 15. The pair of DNA molecules of any one of claims 12 to 14, wherein said first DNA molecule comprises 11 or more contiguous nucleotides of any portion of the transgene region of SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:5, or complement thereof, and said second DNA molecule comprises a similar length of a 5' flanking soybean genomic DNA region of SEQ ID NO:3, or complement thereof.
 16. The pair of DNA molecules of claim 15, wherein said first DNA molecule comprises SEQ ID NO:9 and said second DNA molecule comprises SEQ ID NO:10.
 17. The pair of DNA molecules of any one of claims 12 to 14, wherein said first DNA molecule comprises 11 or more contiguous nucleotides of any portion of the transgene region of SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:5, or complement thereof, and said second DNA

- 43 -

- molecule comprises a similar length of a 3' flanking soybean genomic DNA region of SEQ ID NO:4, or complement thereof.
18. The pair of DNA molecules of claim 17, wherein said first DNA molecule comprises SEQ ID NO:12 and said second DNA molecule comprises SEQ ID NO:13.
 19. A method of detecting the presence of a DNA molecule selected from the group consisting of SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 and SEQ ID NO:6 in a biological sample, the method comprising:
 - (a) contacting said biological sample with a DNA primer pair comprising DNA primer molecules of sufficient length of contiguous nucleotides of SEQ ID NO:3 or its complement, SEQ ID NO:4 or its complement, SEQ ID NO:5 or its complement, or SEQ ID NO:6 or its complement, to function as DNA primers or probes diagnostic for DNA extracted from soybean plant MON87701 or progeny thereof;
 - (b) providing a nucleic acid amplification reaction condition;
 - (c) performing said nucleic acid amplification reaction, thereby producing a DNA amplicon molecule; and
 - (d) detecting said DNA amplicon molecule, wherein detection of an amplicon comprising at least one of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 and complement thereof is indicative of the presence of said DNA molecule in said biological sample.
 20. The method of claim 19, wherein said biological sample is a DNA sample extracted from a soybean plant.
 21. A method of detecting the presence of a DNA molecule selected from the group consisting of SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 and SEQ ID NO:6 in a biological sample, the method comprising:
 - (a) contacting said biological sample with a DNA probe that hybridizes under stringent conditions with said DNA molecule, and does not hybridize under the stringent conditions with a biological sample not containing said DNA molecule;
 - (b) subjecting said biological sample and DNA probe to stringent hybridization conditions; and

- (c) detecting hybridization of said DNA probe to said biological sample, wherein detection of hybridization is indicative of the presence of said DNA molecule in said biological sample.
22. The method of claim 21, wherein said biological sample is a DNA sample extracted from a soybean plant.
23. The method of claim 21 or 22, wherein said DNA probe comprises SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2 or complement thereof.
24. The method of claim 21 or 22, wherein said DNA probe comprises SEQ ID NO:11 or SEQ ID NO:15.
25. The method of claims 21 to 24, wherein said DNA probe is labeled with at least one fluorophore.
26. The method of claim 19 or 21, wherein said biological sample is selected from the group consisting of soybean meal, soy flour, soy protein concentrate, soy protein isolates, texturized soy protein concentrate, hydrolyzed soy protein and whipped topping.
27. A DNA detection kit comprising: at least one DNA molecule of sufficient length of contiguous nucleotides homologous or complementary to SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, or SEQ ID NO:6 to function as a DNA primer or probe specific for soybean event MON87701 and/or its progeny.
28. The DNA detection kit of claim 27, wherein said at least one DNA molecule comprises SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, or complement thereof.
29. The DNA detection kit of claim 28, wherein said at least one DNA molecule is SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, or complement thereof.
30. A method of determining zygosity of DNA of a soybean plant genome comprising soybean event MON87701 in a soybean sample comprising:
- (a) contacting said sample with a first primer pair of SEQ ID NO:12 and SEQ ID NO:13, that when used together in a nucleic acid amplification reaction with soybean event MON87701 DNA, produces an amplicon that is diagnostic for soybean event MON87701;
 - (b) performing a nucleic acid amplification reaction;
 - (c) detecting a first amplicon produced;

- (d) contacting said sample with a second primer pair of SEQ ID NO:13 and SEQ ID NO:14, that when used together in a nucleic acid amplification reaction with soybean genomic DNA other than soybean event MON87701 DNA, produces an amplicon that is diagnostic for soybean genomic DNA other than soybean event MON87701 DNA;
 - (e) performing a nucleic acid amplification reaction; and
 - (f) detecting a second amplicon produced; wherein detection of both the amplicon that is diagnostic for soybean event MON87701 and the amplicon that is diagnostic for soybean genomic DNA other than soybean event MON87701 DNA indicates that said sample is heterozygous for soybean event MON87701 DNA.
31. The method of claim 30, wherein said first primer pair is further used together with probe of SEQ ID NO:15, and/or wherein said second primer pair is further used with probe of SEQ ID NO:16.

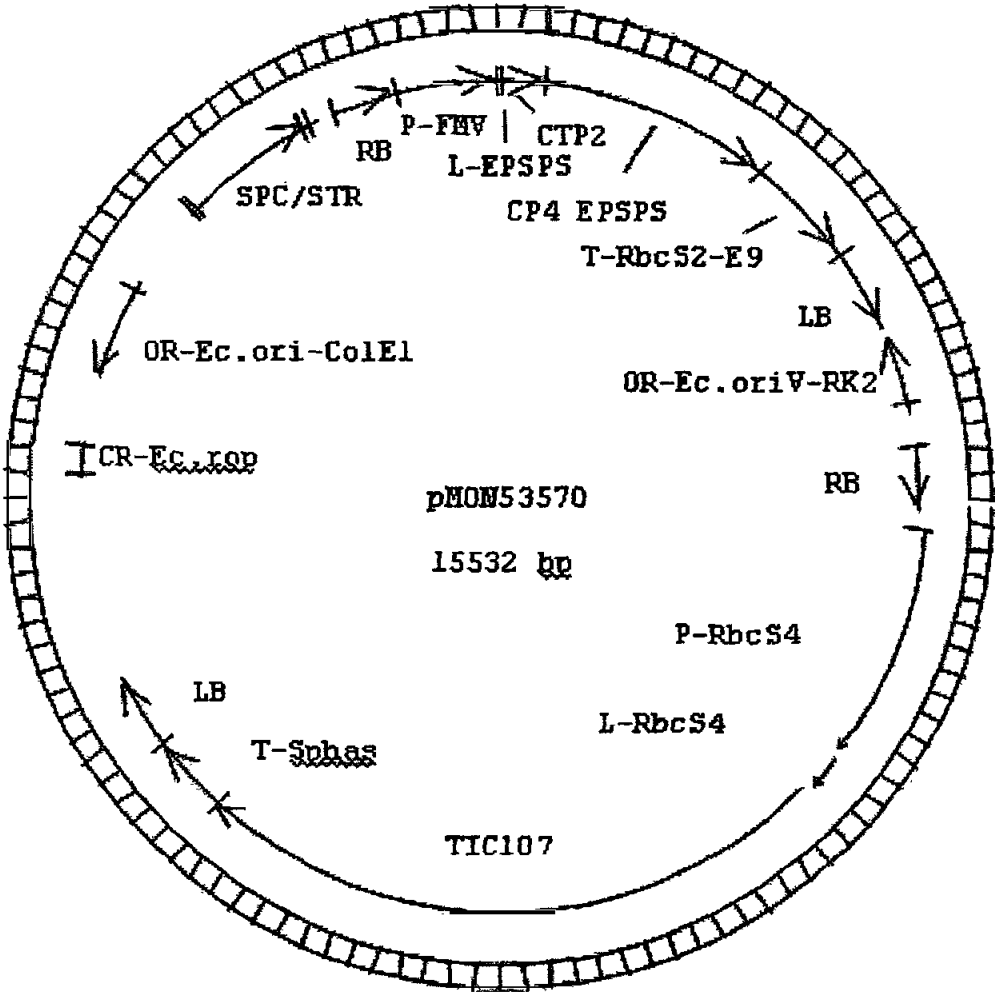


FIG. 1

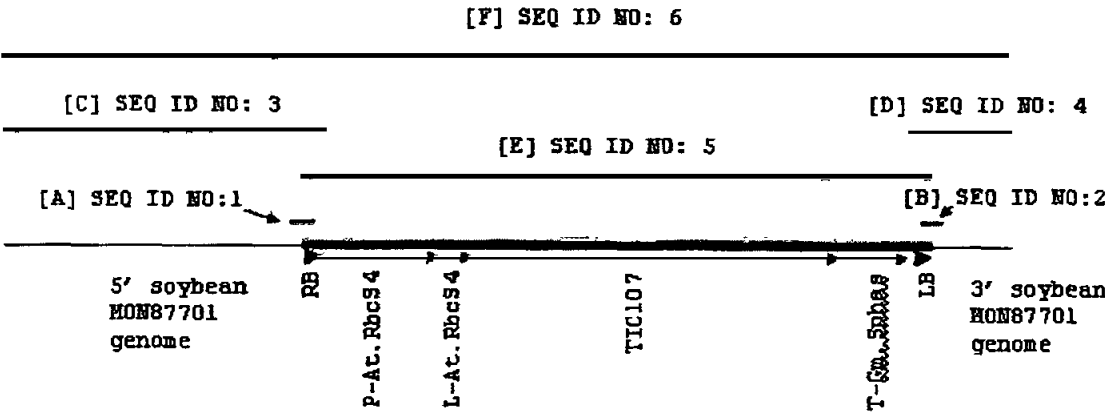


FIG. 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/082590

000059

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N15/82 A01H5/00 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MIKLOS JOHN A ET AL: "Characterization of soybean exhibiting high expression of a synthetic Bacillus thuringiensis cryIA transgene that confers a high degree of resistance to lepidopteran pests" CROP SCIENCE, vol. 47, no. 1, January 2007 (2007-01), pages 148-157, XP002512729 ISSN: 0011-183X	21,22,27
Y	* abstract, p. 149-151, 154, fig. 1-3, table 7 *	1-20, 23-26, 28-31
X	US 6 893 826 B1 (HILLYARD JEANNA R [US] ET AL) 17 May 2005 (2005-05-17)	21
Y	* p. 2:24 - 18:61, 21:20 - 23:38, example 1-5, fig. 1-4, claims *	1-20, 22-31
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 February 2009

Date of mailing of the international search report

13/02/2009

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Puonti-Kaerlas, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2008/082590

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2006/130436 A (MONSANTO TECHNOLOGY LLC [US]; MALVEN MARIANNE [US]; RINEHART JENNIFER) 7 December 2006 (2006-12-07) * p. 3:3 - 7:4, 11:29 - 17:2, example 1,2, fig. 1,2 *	1-31
Y	MACRAE TED C ET AL: "Laboratory and field evaluations of transgenic soybean exhibiting high-dose expression of a synthetic <i>Bacillus thuringiensis</i> cryIA gene for control of Lepidoptera" JOURNAL OF ECONOMIC ENTOMOLOGY, ENTOMOLOGICAL SOCIETY OF AMERICA, LANDHAM, MD, US, vol. 98, no. 2, 1 April 2005 (2005-04-01), pages 577-587, XP001538794 ISSN: 0022-0493 * abstract, p. 578,579,584 *	1-31
A	YANG LITAO ET AL: "Qualitative and quantitative PCR methods for event-specific detection of genetically modified cotton Mon1445 and Mon531" TRANSGENIC RESEARCH, vol. 14, no. 6, December 2005 (2005-12), pages 817-831, XP002512731 ISSN: 0962-8819	
A	WO 02/100163 A (MONSANTO TECHNOLOGY LLC [US]; HUBER SCOTT A [US]; ROBERTS JAMES K [US]) 19 December 2002 (2002-12-19)	
A	WO 02/40677 A (MONSANTO TECHNOLOGY LLC [US]; BEAZLEY KIM A [US]; HILLYARD JEANNA R [U]) 23 May 2002 (2002-05-23)	
A	YANG LITAO ET AL: "Event-specific quantitative detection of nine genetically modified maizes using one novel standard reference molecule" JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY, vol. 55, no. 1, January 2007 (2007-01), pages 15-24, XP002512732 ISSN: 0021-8561	
	-/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/082590

0000061

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YANG LITAO ET AL: "Event specific qualitative and quantitative polymerase chain reaction detection of genetically modified MON863 maize based on the 5'-transgene integration sequence" JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. WASHINGTON, US, vol. 53, no. 24, 1 November 2005 (2005-11-01), pages 9312-9318, XP002389695 ISSN: 0021-8561	
A	HOLCK ASKILD ET AL: "5'-Nuclease PCR for quantitative event-specific detection of the genetically modified Mon810 MaisGard maize" EUROPEAN FOOD RESEARCH AND TECHNOLOGY, vol. 214, no. 5, May 2002 (2002-05), pages 449-453, XP002512733 ISSN: 1438-2377	
A	PAN ET AL: "Event-specific qualitative and quantitative PCR detection of MON863 maize based upon the 3'-transgene integration sequence" JOURNAL OF CEREAL SCIENCE, ACADEMIC PRESS LTD, XX, vol. 43, no. 2, 1 March 2006 (2006-03-01), pages 250-257, XP005265859 ISSN: 0733-5210	
A	EP 0 385 962 A (MONSANTO CO [US] MONSANTO TECHNOLOGY LLC [US]) 5 September 1990 (1990-09-05)	
A	US 2007/061919 A1 (BAUM JAMES A [US] ET AL) 15 March 2007 (2007-03-15)	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2008/082590

000062

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the International application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - a. type of material
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material
 - ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing
 - ☒ contained in the international application as filed
 - ☒ filed together with the international application in electronic form
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2008/082590

000063

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6893826	B1	17-05-2005	US 2003024005 A1	30-01-2003
WO 2006130436	A	07-12-2006	AR 053496 A1	09-05-2007
			AR 054052 A1	30-05-2007
			AR 053497 A1	09-05-2007
			AU 2006252680 A1	07-12-2006
			CA 2609418 A1	07-12-2006
			CA 2609777 A1	07-12-2006
			CA 2609854 A1	30-11-2006
			CN 101252831 A	27-08-2008
			CN 101253268 A	27-08-2008
			CN 101316513 A	03-12-2008
			EP 1885861 A2	13-02-2008
			EP 1885176 A2	13-02-2008
			EP 1883303 A2	06-02-2008
			JP 2008545413 T	18-12-2008
			KR 20080050548 A	09-06-2008
			WO 2006130494 A2	07-12-2006
			WO 2006128095 A2	30-11-2006
			UY 29570 A1	29-12-2006
WO 02100163	A	19-12-2002	BR 0210345 A	19-04-2005
			CN 1463175 A	24-12-2003
			EP 1406482 A2	14-04-2004
			MX PA03011476 A	05-04-2004
			UY 27332 A1	30-04-2003
			ZA 200308733 A	19-11-2004
WO 0240677	A	23-05-2002	AU 3644202 A	27-05-2002
EP 0385962	A	05-09-1990	AR 243234 A1	30-07-1993
			AT 206462 T	15-10-2001
			AU 638438 B2	01-07-1993
			AU 5163090 A	26-09-1990
			BR 9007159 A	10-12-1991
			CA 2024811 A1	25-08-1990
			DE 69033816 D1	08-11-2001
			DE 69033816 T2	08-08-2002
			DK 0413019 T3	12-11-2001
			EP 1103616 A2	30-05-2001
			EP 0413019 A1	20-02-1991
			ES 2164633 T3	01-03-2002
			FI 107430 B1	15-08-2001
			GR 3036762 T3	31-12-2001
			IL 93513 A	14-11-1995
			JP 3504333 T	26-09-1991
			JP 3364616 B2	08-01-2003
			NO 904585 A	27-12-1990
			NZ 232654 A	23-12-1991
			WO 9010076 A1	07-09-1990
			US 5500365 A	19-03-1996
US 2007061919	A1	15-03-2007	NONE	

SEQUENCE LISTING

<110> Gao, Ai-Guo
 Kolacz, Kathryn H.
 MacRae, Ted C.
 Miklos, John A.
 Paradise, Mark S.
 Perlak, Frederick J.
 Toedebusch, Andrea S.

<120> SOYBEAN PLANT AND SEED CORRESPONDING TO TRANSGENIC EVENT MON87701
 AND METHODS FOR DETECTION THEREOF

<130> 11899.0261.00PC00

<150> 60/988,349

<151> 2007-11-15

<160> 16

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(20)

<223> 5' Junction Sequence

<400> 1

ttagtgtgtg tgtcaaacac

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(20)

<223> 3' Junction sequence

<400> 2

atgaagccat caaaaagtag

20

<210> 3
<211> 6285
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(6285)
<223> 5' Flanking Sequence Plus Junction

<400> 3
gggaaaatcc ctcttccata ttaagaacat aaaaatcaac aggaaaaata agttcaccaa 60
cccgaaccag cacatcctct atgaaacctg cggggtaage agcacttcta ttttccaaat 120
gaatcaccac atctgtagat tgcaaaggct caagagataa agaattgaaa atggacagag 180
gggtgacact aactgatgct cctagatcta gcattgtatt atcaaattta ctgttcccaa 240
taatgcaagg tatacagaaa gtacctgggt ccttacattt ctcaggaatg taaggaacaa 300
atttacctat caatgctgac acatttctgc ccatgctaatt cctttcattg cctttgagct 360
tccttttctg ggtgcacaac tccttttagaa acttgacaca tcttggaatc tgcttgatgg 420
catctagcag aggtatgttc acctctactt tcctgaagggt ctccaagatc tccttttctg 480
cttcttccat tttttttggt tggaattgct caagggttga atggaagagg gataagaggc 540
tgcggttaagt cagaattact agaagaagggt ccacctgcat gaaaattttt gttaggaagc 600
tttctctttt gtgcaactat ctcacacctt ttttcagggt tagaatgaag cttgacaggt 660
tcagggtcgg gtgctgctac tgggtggagg acttgaattt ggttgtcaga cctcaagggt 720
atgacactca catttttcgg attttgcaca gtttgtgaag gcaatttgc agaattttgg 780
gaatgagctt ggttcaactg agtagccatc cgccccatct gatttgtcag actctgaatg 840
aaggctcttg tctcttgctg aaattgcata ttctggatgg tcatttgcct cactaactct 900
tctaaggaag gttaaggagg agtctcagtt gcttggtgtc tttgttgta ctgttggtgt 960
tggtgctgct gtattggagg aggaacatat ggtttgcttg gaccagcaac attctggaaa 1020
ggagggacag actgttggtt ttgtgaagga cttgcccac tcataatttg atgatttctc 1080
caacctggat tgtatctgtt gcttggaaga tcataattat tttgctattg ttggttttgc 1140
tggtgagggg gtctattata aatgtttgca gcataagctt caggttggtc attgactcca 1200
gattactgca aagaaggaca aagatctgta tggatgctg cagaagaaca tataccacag 1260

actcttgtaa caggtgcaaa tttctgattc atggcaagct gagttactag gttgaccaag	1320
gcatcaagtt ttcctcaag ctttttattt tcagtagata aagatgaatc tgtggccacc	1380
tcategactc ctctaaggac aatagcatca tttcttgac tgaattgttg ggagttggaa	1440
gccttcttct caatcaaatt cctagcctca gcaggggtca tatcacgaag agctccacca	1500
ctggcagcat caatcatact cctctccatg ttgctaagtc cctcatagaa atattgaaga	1560
aggagttgct cagaaatctg gtggtgagga cagcttgac acaatttctt gaatcttct	1620
cagtactcat acaagctctc tccactaagt tgctgatgc ctgaaatttc tttctgatg	1680
gcagtggctc tagatgcagg gaagaatttc tccaagaaca cctctttaag gtcacccag	1740
ctgaaaatgg acctgggagc aaggtagtag agccaatctt ttgtcactac ctccagagaa	1800
tgaggaaaag cctttagaaa gatatgatct tcttgacat cagggggctt catggtggaa	1860
caaacaatat ggaactcctt aagatgctta tgaggatctt cacctagaag accatgaaac	1920
ttgggtagca aatgtattag tccagtcttg agaacatatg gaacaccctc atcaggatat	1980
tgaatgcaca agttttcata agtgaaatca ggtgcagcca tctccctaag agtcctctca	2040
cgaggtggag gtttagccat gttctcagta tgaaaattag tagttgaatg ctcaaatca	2100
gaatattcag aatcaccaga aacaaaatac tcagaatgct caaatgctc aaaatgcaca	2160
taatgattag gatgcacact atgcctaact aatctatgaa aggttctatc tatttcagga	2220
tcgaagggtt ataaatcacc tagattgccc ctagtcatgc actatatgta gcaaataatg	2280
tgttctcaaa caagcaccaa gggagggtta aaactacaac tatagtcaaa tgatatcaa	2340
atgagttgaa attttgtgag cagcaccta aaatcatgaa aagatagcac aaaaaatttc	2400
aaacgaaaat tcaaagtcta actatgaaaa ctacttaaga aaagtttaga aaaataggac	2460
aataatactt gaaaaataaa aaaaaacata gtaaacagct gatttttcga gtttgggaga	2520
ctccaaccgg ctaaacggg ttgccacaat atgagaaatt ttttctacc ccaaatgcca	2580
caatatgaga aagttttgct aaaatctagt tccaaaatt tttgtctctc tcaaattcaa	2640
ccacaccaag tgctcctagt atttttcaca caaaaaatca gccaaaaata acaactctaa	2700
ctatcaaac aaaaacagct aattaaattg caaatcagt cgctaattcc tagtcactaa	2760
tcactgttca cagcaaaaca ccaactgaat cagtcgctaa acagtcgcta aacaggagac	2820
gcaactgaaa tgcaaacag aatgtacac aaacaaaaac aactaaacac tattatgaac	2880
ctttggccca ctgctccccg acaacggcgc caaatctgat cgaggtcgta cccgaatcaa	2940

000067

ataaacatta aaaatgcagt atctaggaag tgatcctagg tcatctccca acgagcaatg	3000
gtcaaccaat gttcataata gatagtgata aaacaataac gaattggggg ggggggggtat	3060
ttgtttttgt aatttaaaca acaagcaa at ttaattaga aaataacaga attaaaacat	3120
gttattttccc cttgattcat aagcaagtct cttatcctag gttaggagga tttatcccta	3180
accagttcaa ccacttaatc caaccctaaa ttaaattact aagcgaaaat taacataagg	3240
ttgtctttat atgattaagc aacacataca ccaattaatc atgaacaaaa tcgatcatta	3300
agcatcaaca taaattaagc gcaaagataa ttaatcaagc actaagcatg catggattag	3360
tagcaacaaa tacagagtaa ttggtggaga tgaaaaactg atcaatattc aatagtaata	3420
acaaaacctc aaagagagtt gtgcttgatt ctcaagagaa aacaacgctg gagacttagc	3480
cttccattaa tcagtagaaa acgaaattgt agaaaacgaa ttttattcta tgtgaacaat	3540
gtgcatgaac agtaataaaa actggaattg caaaacccta aaattattct tctctccaaa	3600
aaaactccct aaactaaaac cctggtgcta ttatataggt cctcagcccc aaagcttaca	3660
aatctatttt cagtccaaac ccataaacga aataaaaataa aatctggaca agataagata	3720
agattggatg aaataaaatc tggacgaaat aaaatctgga taagataaga tttgataaaa	3780
taaaattgtc tgctcttttc aagtccaagc ccaattccgg attcaagccc aattttttat	3840
aattcttctg aaattaaatt aaaaatacga aattagtcaa gtaggcccaa atgataaaac	3900
tgcataatta atttgacaat taaggcta at cagtaattaa aatagtgaca aaaagggtta	3960
agaaatagga gaataatgac acatcaccca tatggggagc aattctaaaa tgcatttgag	4020
ttctttaacc tgagacacag tgcagtagag tctccaagga ttcattgtgc cttttatttt	4080
atatgatggg gtcactacat tggccttgtc aaagaaactg aatttggggg attaaagaaa	4140
cacaaaataa aaacaaatga aactagttaa tagaaatgtt gcctattgct tcttgaaaaa	4200
agtccaacca tttgtgattt ggataaaatt catattaccc acttgtagct tgttcaatca	4260
aacactagat ttggataaaa tctcactcct agatatacct caagggataa tatgaccaac	4320
attagtcatt tttagaaagt aaagtggaca aatttgagat ttcattcctt aatgacatta	4380
taaacatgta ttttttccat gacccttttt caatgtaagt acaatttata ccttagttta	4440
gatactctat atatgcatgt tacgtagttg atgaaaacat acctaagttg ttgtgtatgg	4500
ttaagtttgc gactacctct gatatcaaac tctcatctc caatctcata caaaagatac	4560
ttgtcacttg gtacctgaac cttgtcagtt tgcagttgtg agtttcttct gaagccacac	4620
gcttgatatag taaccagaag ccaggaggga gtctctaaag gctctaactc gtattttccg	4680

tggaagtaca ttttttttct taaagaaaac agagatagtt taccaatgat aatattttctt 4740
tagccaaata ggaccatcat agaaaacaaa actcttcttc taagtattta atgcaactac 4800
atatttaggg tgcgtttgat tcgctaaaaa ataaggggtct agacaacaca aaaatatttt 4860
tccaacgttt gatttttaaaa atggctgaga gacaatacaa aataaagaat gatgaactgg 4920
acaaaaacct aaaaacttgt aactcactga atctcataca actttttgtt cagtgtctaa 4980
aaaaagtaaa aatacaatat tattcctatt ttttactttg attatctcac accttcttctc 5040
tactcatttg tttcacttca cctctccagt gggcaccttg gtttgctggc gagagtcgta 5100
tggacttttg ttgtttcctt tttgctcatt atttctttct tttcattggt aatttattca 5160
aatgttccca tcatcatctt actccttctt gttatgtttt ttttctttgg ccaactccaa 5220
cgaggccgtg ccgcgaccac catcatcacg accttatggc ggctcacgc cgcaaggccc 5280
tgcaccagtg ggcacaggg gtcatgcctc cttcttaaag gtgtctctct tttgttatgt 5340
cgtcaaagtg ttgctaattc acctagaatt tttcaatgaa tccctttact tgtgggtag 5400
tctaggtcgc tctgcccgtt tccaacccta gcccaaaaaa aaatgaaatg ggtaggaaag 5460
gcgggcctag tttgaattaa aataaatcat gctaagatat tgataactgc tatgtatagg 5520
tatatttttg gattaaatta tataggaatt agtaattttt ctctcttatt tcttctttt 5580
tgttcaaata attggaattc taacatcatt taagttttta tgtagaaaat attaaaagtt 5640
gatgaattta tgatacttag tgaataatta gagtagaaaa ataaagtaaa gcccaaaaaa 5700
gaaaattggg gatatgaaga tacatgctta gcatgcccc ggcacgctta gtgtgtgtgt 5760
caaacactga tagtttaaac tgaaggcggg aaacgacaat ctgatcccca tcaagcttga 5820
tatcgaattc ctgcagcccg ggggatccac tagttctaga gcggccgct taactgcagg 5880
tcgacggatc cccgggtacc gagctcgaat tcaaatttat tatgtgtttt ttttccgtgg 5940
tcgagattgt gtattattct ttagttatta caagactttt agctaaaatt tgaaagaatt 6000
tactttaaga aaatcttaac atctgagata atttcagcaa tagattatat ttttcattac 6060
tctagcagta tttttgcaga tcaatcgcaa catatatggg tgttagaaaa aatgcactat 6120
atatatatat attatttttt caattaaaag tgcattgat ataatatata tatatatata 6180
tatgtgtgtg tgtatatggg caaagaaatt cttatacaaa tatacacgaa cacatatatt 6240
tgacaaaatc aaagtattac actaaacaat gagttgggtgc atggc 6285

<211> 2611
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2611)
 <223> 3' Flanking Sequence Plus Junction

<400> 4
 gactgacaag atcgatctga agtctaaaca attctaagag gtatcatgta gcaatgtcct 60
 gccacaatat tgaattgacc tgcagcccg ggcgcgcgat cgatcgtgaa gtttctcatc 120
 taagccccc tttggacgtg aatgtagaca cgtcgaaata aagatttccg aattagaata 180
 atttgtttat tgctttcgcc tataaatacg acggatcgta atttgtcgtt ttatcaaaat 240
 gtactttcat ttataataa cgctgcggac atctacattt ttgaattgaa aaaaaattgg 300
 taattactct ttctttttct ccatattgac catcatactc attgctgac catgtagatt 360
 tcccgacat gaagccatca aaaagtagga ctaatttagg aaagcaagct aattcaagaa 420
 agtgaaggca cgcttagtgt gagacacgtg ttgagcgcga ttactgccac tcactaacca 480
 cacaagtgca ctcaagtgcga aggttgctta aaaattaagt tgattcgcac ttataaaaga 540
 aggatagaga tgaaggaaaa aacacagaaa atacaattcc ttatagaaga caaaggctag 600
 aagaagcaaa cgcaaacatt agaagtcatt ccttccctca attccctttt tcaatttccc 660
 cttttactaa atattctcct cttgcaatta taaagcctcc tatgacaatg acaagctaaa 720
 ctctcctttg ttgggaactt atcagtcaac tgctcttaat ataatttctc ttctatctta 780
 ttatgaatat tcactacaag aaatatgccc atttgccagg gatttttgac aggacatta 840
 acccctggca aatttcccag ggactaagcc aaggaaaccc ctggcaaaat gacatttgag 900
 aaggctggga ccacttacat ttacacaggg gtttgtccct cgcaaaaata caaaagcctt 960
 ggcaaaaaaa agagcgggaa atgaatttta aaacagcatg ttgttttcac acagccaaac 1020
 acacgggtat gccctcgttt tctgtaaagc tgacggaatc ttcccataag tcaacacgac 1080
 atgaccatgc actgcaaaaa gctgtgcggc ccagacgtga caggggtgtt acccctcgga 1140
 aatggcttgc agccctggc aaaaaggaat ccctgctttc ctagctacac cgttctgctc 1200
 atatagctga agctaggagg ttagcctttg actctgttgt tttgcgaggg gcattccgtg 1260
 agttattccc tgggtttttt tacactatat agccaaaccg cgtgtttatc ctcatgctca 1320

gtgttggtgtt ttgaaactt agaaaaattt tcggtttcca ttccatcct caccagttca 1380
ttttcagtcc attatcatte agttcataca cttgttctat aatttggtaa cactcttttc 1440
acttattata tttttctgtt tttatttgtt actacttatt aacataaata ttttttattg 1500
tatcagtgc caaatgtgc tcctcctgct gctccttgct ctctgaattt gttctcttaa 1560
gcttcaacaa gttagtaatt tttctactta taattttaga tatatgatgt ttatatatat 1620
gatgttataa ttttgcata tctgtcaaag aaaatatgat gtttctactt gcatgatgtg 1680
ttataatata tgatgtttat atatatctcg aattttgttg ttaataaaac tgtttaatta 1740
gaaactgtat aatttttttg ttttaaaaaa ctgtttaatt ttgcatgac tgtttaataa 1800
aactgtttat ataaaactgt ttatatataa tatatgatgt taacattttt aaaactgttt 1860
ataaaacagt ttagttagaa aaaatgttaa aactagagaa aaaaatgtat aataaaactg 1920
tgtcagtaca gcagcgcgtc agaaaagtgt gcagatgcgt cagtgagaag acaggggcta 1980
agacagggat tttgacaggg aattttgccg gggattttgc cagggtcagc ccctcgtttt 2040
tttgccaggg gtgaaatccc tggcaaaactg atttgcgatg ggcgtttttc ccagggatc 2100
agccctggc aaaatccctg gcaaaactgc atttcccagg gctttttgtt cttttcccag 2160
ggaatccgc cctggcaaac gagcttggtt cttgtagtga ttacttttgc attagttttt 2220
cctgtattta attttattgt ttatggcttg attaccatt tgcattataa gttttagggg 2280
tagcgttgaa aagtgttatt ctctaataga actggaaaag agtattttaa taacttcac 2340
actagggata cattgatatt atttagctta ttatatatct ctattattaa tgtaatttaa 2400
ctattttatc tctgcaaagt gatttgggag agaagataga taagttagac tctttcactc 2460
gaggctgagt acaaccttga gagagcccag aaggctgtga acgcccctctt tacctccacc 2520
aatcagcttg gcttgaaaac taacgttact gactatcaca ttgaccaagt gtccaacttg 2580
gtcacctacc ttagcgatga gttctgaagg g 2611

<210> 5
<211> 6426
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic

<220>
<221> misc_feature

<222> (1)..(6426)

<223> Inserted DNA Sequence

<400> 5

tgtcaaacac tgatagttta aactgaagggc gggaaacgac aatctgatcc ccatcaagct	60
tgatatcgaa ttcctgcagc ccgggggagc cactagttct agagcggcgc cgttaactgc	120
aggctcgacgg atccccgggt accgagctcg aattcaaatt tattatgtgt tttttttccg	180
tggtcgagat tgtgtattat tctttagtta ttacaagact tttagctaaa atttgaaaga	240
atttacttta agaaaatctt aacatctgag ataatttcag caatagatta tttttttcat	300
tactctagca gtatttttgc agatcaatcg caacatatat ggttggttaga aaaaatgcac	360
tatatatata tatattatit tttcaattaa aagtgcata tatataatat atatatatat	420
atatatgtgt gtgtgtatat ggtcaaagaa attctttatac aaatatacac gaacacatat	480
atttgacaaa atcaaagtat tacactaaac aatgagttgg tgcattggcca aaacaaatat	540
gtagattaaa aattccagcc tccaaaaaaa aatccaagtg ttgtaaagca ttatatatat	600
atagtagatc ccaaattttt gtacaattcc aactgatcg aattttttaa gttgaatatc	660
tgacgtagga tttttttaat gtcttacctg accatttact aataacattc atacgttttc	720
atttgaaata tcctctataa ttatattgaa tttggcacat aataagaaac ctaattggtg	780
atttatttta ctagtaaat tctggtgatg ggctttctac tagaaagctc tcggaaaatc	840
ttggaccaaa tccatattcc atgacttcga ttgttaaccc tattagtttt cacaacata	900
ctatcaatat cattgcaacg gaaaaggtag aagtaaaaca ttcaatccga tagggaagt	960
atgtaggagg ttgggaagac aggccagaa agagatttat ctgacttgtt ttgtgtatag	1020
ttttcaatgt tcataaagga agatggagac ttgagaagtt ttttttggac tttgtttagc	1080
tttgttgggc gttttttttt ttgatcaata actttgttgg gcttatgatt tgtaatattt	1140
tcgtggactc ttttagttat ttagacgtgc taactttgtt gggcttatga cttgttgtaa	1200
catattgtaa cagatgactt gatgtgcgac taatctttac acattaaaca tagttctgtt	1260
ttttgaaagt tcttattttc atttttatit gaatgttata tttttttcta tttttataat	1320
tctagtaaaa ggcaaatttt gcttttaaat gaaaaaata tatattccac agtttcacct	1380
aatcttatgc atttagcagt acaaattcaa aaatttccca tttttattca tgaatcatal	1440
cattatatat taactaaatc caaggtaaaa aaaaggtag aaagctctat agtaagtaaa	1500
atataaatc cccataagga aagggccaaag tccaccaggc aagtaaaatg agcaagcacc	1560
actccaccat cacacaattt cactcataga taacgataag attcatggaa ttatcttcca	1620

cgtggcatta ttccagcggg tcaagccgat aaggggtctca acacctctcc ttaggccttt	1680
gtggccggtta ccaagtaaaa ttaacctcac acatatccac actcaaaatc caacgggtgta	1740
gatcctagtc cacttgaatc tcatgtatcc tagaccctcc gatcactcca aagcttggtc	1800
tcattgttgt taticattata tatagatgac caaagcacta gaccaaacct cagtcacaca	1860
aagagtaaag aagaacaatg gcttcctcta tgetctcttc cgctactatg gttgcctctc	1920
cggctcagge cactatgggc gctcctttca acggacttaa gtctctcgct gccttcccag	1980
ccaccgcgaa ggctaacaac gacattactt ccatcacaaag caacggcgga agagttaact	2040
gcatgcagggt gtggcctccg attggaaaga agaagtttga gactctctct taccttcctg	2100
accttaccga ttccgggtgg cgcgtcaact gcatgcaggc catggacaac aacccaaaca	2160
tcaacgaatg cattccatac aactgcttga gtaaccacaga agttgaagta cttggtggag	2220
aacgcattga aaccgggttac actcccatcg acatctcctt gtcccttgaca cagtttctgc	2280
tcagcgagtt cgtgccagggt gctgggttcg ttctcggaact agttgacatc atctggggta	2340
tctttggtcc atctcaatgg gatgcattcc tgggtgcaaat tgagcagttg atcaaccaga	2400
ggatcgaaga gttcgccagg aaccaggcca tctctagggtt ggaaggattg agcaatctct	2460
accaaatacta tgcagagagc ttccagagagt ggggaagccga tcctactaac ccagctctcc	2520
gcgaggaaat gcgtattcaa ttcaacgaca tgaacagcgc cttgaccaca gctatcccat	2580
tgttcgcagt ccagaactac caagttcctc tcttgtccgt gtacgttcaa gcagctaac	2640
ttcacctcag cgtgcttcga gacgttagcg tgtttgggca aaggtgggga ttcgatgctg	2700
caaccatcaa tagccggttac aacgacctta ctaggctgat tggaaactac accgaccag	2760
ctgttcggtg gtacaacact ggcttgagc gtgtctgggg tcctgattct agagattgga	2820
ttagatacaa ccagttcagg agagaattga cctcacagt tttggacatt gtgtctctct	2880
tcccgaacta tgactccaga acctacccta tccgtacagt gtcccaactt accagagaaa	2940
tctataactaa cccagttctt gagaacttcg acggtagctt ccgtgggtct gcccaaggta	3000
tcgaaggctc catcaggagc ccacacttga tggacatctt gaacagcata actatctaca	3060
ccgatgctca cagaggagag tattactggg ctggacacca gatcatggcc tctccagttg	3120
gattcagcgg gcccgagttt acctttcctc tctatggaac tatgggaaac gccgctccac	3180
aacaacgtat cgttgetcaa ctaggtcagg gtgtctacag aaccttgtct tccaccttgt	3240
acagaagacc cttcaatatc ggtatcaaca accagcaact ttccgttctt gacggaacag	3300

agttcgcccta tggaaacctct tctaacttgc catccgctgt ttacagaaag agcggaaaccg	3360
ttgattcctt ggacgaaatc ccaccacaga acaacaatgt gccacccagg caaggattct	3420
cccacaggtt gagccacgtg tccatgttcc gttccggatt cagcaacagt tccgtgagca	3480
tcacagagc tcctatgttc tcttggatac atcgtagtgc tgagttcaac aacatcatcg	3540
catccgatag tattactcaa atccctgcag tgaagggaaa ctttctcttc aacggttctg	3600
tcatttcagg accaggattc actggtggag acctcgttag actcaacagc agtggaaata	3660
acattcagaa tagaggggat attgaagttc caattcaatt cccatccaca tctaccagat	3720
atagagttcg tgtgaggatg gcttctgtga cccctattca cctcaacgtt aattggggta	3780
attcatccat cttctccaat acagttccag ctacagctac ctccttggat aatctccaat	3840
ccagcgattt cggttacttt gaaagtgcc atgcttttac atcttcactc ggtaacatcg	3900
tgggtgtag aaactttagt gggactgcag gagtgattat cgacagattc gagttcattc	3960
cagttactgc aacactcgag gctgagtaca accttgagag agcccagaag gctgtgaacg	4020
ccctctttac ctccaccaat cagcttggct tgaaaactaa cgttactgac tatcacattg	4080
accaagtgtc caacttggtc acctacctta gcgatgagtt ctgcctcgac gagaagcgtg	4140
aactctccga gaaagttaaa cacgccaaag gtctcagcga cgagaggaat ctcttgcaag	4200
actccaactt caaagacatc aacaggcagc cagaacgtgg ttgggggtgga agcaccggga	4260
tcaccatcca aggaggcgac gatgtgttca aggagaacta cgtcacctc tccggaactt	4320
tcgacgagtg ctaccctacc tacttgtacc agaagatcga tgagtccaaa ctcaaagcct	4380
tcaccaggta tcaacttaga ggctacatcg aagacagcca agaccttgaa atctactcga	4440
tcaggtagaa tgccaagcac gagaccgtga atgtcccagg tactgggttc ctctggccac	4500
tttctgcca atctccatt gggaaagtgtg gagagcctaa cagatgcgct ccacaccttg	4560
agtggaatcc tgacttggac tgctcctgca gggatggcga gaagtgtgcc caccattctc	4620
atcaattctc cttggacatc gatgtgggat gtactgacct gaatgaggac ctcgaggtct	4680
gggtcatctt caagatcaag acccaagacg gacacgcaag acttggcaac cttgagtttc	4740
tcgaagagaa accattggtc ggtgaagctc tcgctcgtgt gaagagagca gagaagaagt	4800
ggagggacaa acgtgagaaa ctcgaaatggg aaactaacat cgtttacaag gaggccaaag	4860
agtccgtgga tgctttgttc gtgaactccc aatatgatca gttgcaagcc gacaccaaca	4920
tcgccatgat ccacgccga gacaaaogtg tgcacagcat tcgtgaggct tacttgccctg	4980
agttgtccgt gatccctggg gtgaacgctg ccatcttcga ggaacttgag ggacgtatct	5040

ttaccgcatt ctccttgtag gatgccagaa acgtcatcaa gaacgggtgac ttcaacaatg 5100
gcctcagctg ctggaatgtg aaagggtcatg tggacgtgga ggaacagaaac aatcagcggtt 5160
ccgtcctgggt tgtgcctgag tgggaagctg aagtgtccca agagggttaga gtctgtccag 5220
gtagaggcta cattctccgt gtgaccgctt acaaggaggg atacgggtgag gggtgcgtga 5280
ccatccacga gatcgagaac aacaccgacg agcttaagtt ctccaactgc gtcgaggaag 5340
aaatctatcc caacaacacc gttacttgca acgactacac tgtgaatcag gaagagtacg 5400
gaggtgccta cactagccgt aacagagggtt acaacgaagc tccttccggtt cctgctgact 5460
atgcctccgt gtacgaggag aaatcctaca cagatggcag acgtgagaac ccttgcgagt 5520
tcaacagagg ttacaggagc tacacaccac ttccagttgg ctatgttacc aaggagcttg 5580
agtactttcc tgagaccgac aaagtgtgga tcgagatcgg tgaaaccgag ggaaccttca 5640
tcgtggacag cgtggagctt ctcttgatgg aggaataatg agatcccgtc ctttgtcttc 5700
aattttgagg gctttttact gaataagtat gtagtactaa aatgtatgct gtaatagctc 5760
atagtgaagc aggaaagtat cgggctatct aactatgact tgagctccat ctatgaataa 5820
ataaatcagc atatgatgct tttgttttgt gtacttcaac tgtctgctta gctaatttga 5880
tatggttgge acttggcacg tataaatatg ctgaagtaat ttactctgaa gctaaattaa 5940
ctagattaga tgagtgtatt atatacaaaa ggcattaaat cagatacatc ttagacaaat 6000
tgtcacggtc taccagaaaa gaaattgcat ttgttttttg gtctttcaga ctgacaagat 6060
cgatctgaag tctaaacaat tctaagagggt atcatgtagc aatgtcctgc cacaatattg 6120
aattgacctg cagcccgggc ggcgcgcatc atcgtgaagt ttctcatcta agccccatt 6180
tggacgtgaa tgtagacacg tcgaaataaa gatttccgaa ttagaataat ttgtttattg 6240
ctttcgcta taaatacgac ggatcgtaat ttgtcgtttt atcaaaatgt actttcattt 6300
tataataacg ctgcggacat ctacatTTTT gaattgaaaa aaaattggta attactcttt 6360
ctttttctcc atattgacca tcatactcat tgctgatcca tgtagatttc ccggacatga 6420
agccat 6426

<210> 6
<211> 14416
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(14416)
<223> Contig of 5' flanking sequence, inserted DNA and 3' Flanking
Sequence

<400> 6
gggaaaatcc ctcttcata ttaagaacat aaaaatcaac aggaaaaata agttcaccaa 60
cccgaaccag cacatcctct atgaaacctg cggggtaagc agcacttcta ttttccaaat 120
gaatcaccac atctgtagat tgcaaaggtc caagagataa agaattgaaa atggacagag 180
gggtgacact aactgatgct cctagatcta gcattgtatt atcaaattta ctgttcccaa 240
taatgcaagg tatacagaaa gtacctgggt ccttacattt ctcaaggaatg taaggaacaa 300
atttacctat caatgctgac acatttctgc ccatgctaatt cctttcattg cctttgagct 360
tccttttgtg ggtgcacaac tcctttagaa acttgacaca tcttggaaatc tgcttgatgg 420
catctagcag aggtatgttc acctctactt tcctgaaggc ctccaagatc tccttttctg 480
cttcttccat tttttttgtt tggaattgct caagggtgga atggaagagg gataagaggc 540
tgcggttaagt cagaattact agaagaaggc ccacctgcat gaaaattttt gttaggaagc 600
tttctctttt gtgcaactat ctcatcctct ttttcagggtg tagaatgaag cttgacaggt 660
tcagggtgagg gtgctgctac tgggtggaggc acttgaattt gggtgtcaga cctcaagggtg 720
atgacactca cttttttcgg attttgcaca gtttgtgaag gcaatttgtc agaattttgg 780
gaatgagctt ggttcaactg agttagccatc cgtcccatct gatttgtcag actctgaatg 840
aaggetcttg tctcttgctg aaattgcata ttctggatgg tcatttgcct cactaactct 900
tctaaggaag gttaaggagg agtctcagtt gcttgttgtc tttgttgtga ctgttgttgt 960
tgttgctgct gtattggagg aggaacatat ggtttgcttg gaccagcaac attctggaaa 1020
ggagggacag actgttgttg ttgtgaagga cttgcccata tcatatttgg atgatttctc 1080
caacctggat tgtatctgtt gcttgggaaga tcataattat tttgctattg ttggttttgc 1140
tgttgagggg gtctattata aatgtttgca gcataagctt cagggtgttc attgactcca 1200
gattactgca aagaaggaca aagatctgta tggatgatctg cagaagaaca tataccacag 1260
actcttgtaa cagggtgcaa tttctgattc atggcaagct gagttactag gttgaccaag 1320
gcatcaagtt ttccctcaag ctttttattt tcagtagata aagatgaatc tgtggccacc 1380
tcacgactc ctctaaggac aatagcatca tttcttgcac tgaattgttg ggagttggaa 1440

gcctttcttct caatcaaatt cctagcctca gcaggggtca tatcacgaag agctccacca	1500
ctggcagcat caatcatact cctctccatg ttgctaagtc cctcatagaa atattgaaga	1560
aggagttgct cagaaatctg gtggtgagga cagcttgac acaatttctt gaatctttct	1620
cagtactcat acaagctctc tccactaagt tgcctgatgc ctgaaatttc tttctgatg	1680
gcagtgggtcc tagatgcagg gaagaatttc tccaagaaca cctctttaag gtcatcccag	1740
ctgaaaatgg acctgggagc aaggtagtag agccaatctt ttgtcactac ctccagagaa	1800
tgaggaaaag ccttttagaaa gatatgatct tcttgacat caggggggtt catggtggaa	1860
caaacaatat ggaactcctt aagatgctta tgaggatctt cacctagaag accatgaaac	1920
ttgggtagca aatgtattag tccagtcttg agaacatatg gaacaccctc atcaggatat	1980
tgaatgcaca agttttcata agtgaaatca ggtgcagcca tctccctaag agtctctca	2040
cgaggtggag gtttagccat gttctcagta tgaaaattag tagttgaatg ctcaaaatca	2100
gaatattcag aatcaccaga aacaaaatac tcagaatgct caaatgctc aaaatgcaca	2160
taatgattag gatgcacact atgcctaact aatctatgaa aggttctatc tatttcagga	2220
tcgaagggtt ataaatcacc tagattgccc ctagtcatgc actatatgta gcaaataatg	2280
tgttctcaaa caagcaccaa gggagggtta aaactacaac tatagtcaaa tgatatccaa	2340
atgagttgaa attttgtgag cagcacccta aaatcatgaa aagatagcac aaaaaatttc	2400
aaacgaaaat tcaaagtcta actatgaaaa ctacttaaga aaagtttaga aaaataggac	2460
aataatactt gaaaaataaa aaaaaacata gtaaacagct gatttttcga gtttgggaga	2520
ctccaaccgg ctaaaacggg ttgccacaat atgagaaatt ttttctacc ccaaatgcca	2580
caatatgaga aagttttgct aaaatctagt tcccaaaatt tttgtctctc tcaaattcaa	2640
ccacaccaag tgctcctagt atttttcaca caaaaaatca gccaaaaata acaactctaa	2700
ctatcaaaac aaaaacagct aattaaattg caaatcagt cgctaattcc tagtcactaa	2760
tcactgttca cagcaaaaca ccaactgaat cagtgcgtaa acagtgcgta aacaggagac	2820
gcaactgaaa tgcaaaacag aatgctacac aaacaaaac aactaaacac tattatgaac	2880
ctttggccca ctgctccccg acaacggcgc caaatttgat cgaggtcgta cccgaatcaa	2940
ataaacatta aaaatgcagt atctaggaag tgatcctagg tcatctccca acgagcaatg	3000
gtcaaccaat gttcataata gatagtgata aaacaataac gaattggggg gggggggtat	3060
ttgtttttgt aatttaaaca acaagcaaat ttttaattaga aaataacaga attaaaacat	3120
gttatttccc cttgattcat aagcaagtct cttatcctag gttaggagga tttatcccta	3180

accagttcaa ccacttaatc caaccctaaa tttaaattact aagcgaaaat taacataagg	3240
ttgtctttat atgattaagc aacacataca ccaattaatc atgaacaaaa tcgatacatta	3300
agcatcaaca taaattaagc gcaaagataa ttaatcaagc actaagcatg catggattag	3360
tagcaacaaa tacagagtaa ttggtggaga tgaaaaactg atcaatattc aatagtaata	3420
acaaaacctc aaagagagtt gtgcttgatt ctcaagagaa aacaacgctg gagacttagc	3480
cttccattaa tcagtagaaa acgaaattgt agaaaacgaa ttttattcta tgtgaacaat	3540
gtgcatgaac agtaataaaa actggaattg caaaacccta aaattattct tctctccaaa	3600
aaaactccct aaactaaaac cctggtgcta ttatataggt cctcagcccc aaagcttaca	3660
aatctatttt cagtccaaac ccataaacga aataaaataa aatctggaca agataagata	3720
agattggatg aaataaaatc tggacgaaat aaaatctgga taagataaga tttgataaaa	3780
taaaattgtc tgctcttttc aagtccaagc ccaattccgg attcaagccc aattttttat	3840
aattcttctg aaattaaatt aaaaatacga aattagtcaa gtaggcccaa atgataaaac	3900
tgcataatta atttgacaat taaggctaat cagtaattaa aatagtgaca aaaagggtta	3960
agaaatagga gaataatgac acatcaccca tatggggagc aattctaaaa tgcatttgag	4020
ttctttaacc tgagacacag tgcagtagag tctccaagga ttcatgtgc cttttatttt	4080
atatgatggg gtcactacat tggccttgtc aaagaaactg aatttggggg attaaagaaa	4140
cacaaaataa aaacaaatga aactagttaa tagaaatggt gcctattgct tcttggaaaa	4200
agtccaacca tttgtgattt ggataaaatt catattaccc acttgtagct tgttcaatca	4260
aacactagat ttggataaaa tctcactcct agatatacct caagggataa tatgaccaac	4320
attagtcatt tttagaaagt aaagtggaca aatttgagat ttcatctctt aatgacatta	4380
taaacatgta ttttttccat gacccttttt caatgtaagt acaatttata ccttagttta	4440
gatactctat atatgcatgt taegtgttg atgaaaacat acctaagttg ttgtgtatgg	4500
ttaagtttgc gactacctct gatatcaaac tctcatctc caatctcata caaaagatac	4560
ttgtcacttg gtacctgaac cttgtcagtt tgcagttgtg agtttcttct gaagccacac	4620
gcttgtatag taaccagaag ccaggaggga gtcctctaag gctctaactc gtattttccg	4680
tggaagtaca ttttttttct taaagaaaac agagatagtt taccaatgat aatatttctt	4740
tagccaaata ggaccatcat agaaaacaaa actcttcttc taagtattta atgcaactac	4800
atatttaggg tgcgtttgat tgcgtaaaaa ataaggtct agacaacaca aaaatatttt	4860

tccaacgttt gatttttaaaa atggctgaga gacaatacaa aataaagaat gatgaactgg	4920
acaaaaacct aaaaacttgt aactcactga atctcataca acttttttgtt cagtgtctaa	4980
aaaaagtaaa aatacaatat tattcctatt ttttactttg attatctcac accttctttc	5040
tactcatttg tttcacttca cctctccagt gggcaccttg gtttgtcggc gagagtcgta	5100
tggacttttg ttgtttcctt tttgttcatt atttctttct tttcattgtt aatttattca	5160
aatgttccca tcatcatctt actccttctt gttatgtttt ttttctttgg ccaactccaa	5220
cgaggccgtg ccgcgaccac catcatcacg accttatggc ggcctcacgc cgcaaggccc	5280
tgcaccagtg ggcacaggg gtcacgctc cttctttaaag gtgtctctct tttgttatgt	5340
cgtcaaagtg ttgctaattc acctagaatt tttcaatgaa tccctttact tgtggggttag	5400
tctaggtcgc tctgcccgtt tccaacctta gcccaaaaaa aatgaaatg ggtaggaaag	5460
gcgggcctag tttgaattaa aataaatcat gctaagatat tgataactgc tatgtatagg	5520
tatatatttg gattaaatta tataggaatt agtaattttt ctctcttatt tcttctttt	5580
tgttcaaata attggaattc taacatcatt taagttttta tgtagaaaat attaaaagtt	5640
gatgaattta tgatacttag tgaataatta gagtagaaaa ataaagtaaa gcccaaaaaa	5700
gaaaatttgt gatatgaaga tacatgctta gcatgcccc ggcacgctta gtgtgtgtgt	5760
caaacactga tagttttaaac tgaaggcggg aaacgacaat ctgatcccca tcaagcttga	5820
tatcgaattc ctgcagcccc ggggatccac tagttctaga gcggccgctt taactgcagg	5880
tcgacggatc cccgggtacc gagctcgaat tcaaatttat tatgtgtttt ttttccgtgg	5940
tcgagattgt gtattattct ttagttatta caagactttt agctaaaatt tgaaagaatt	6000
tactttaaga aaatcttaac atctgagata atttcagcaa tagattatat ttttcattac	6060
tctagcagta tttttgcaga tcaatcgcaa catatatggt tgttagaaaa aatgcactat	6120
atatatatat attatttttt caattaaaag tgcacgatat ataatatata tatatatata	6180
tatgtgtgtg tgtatatggt caaagaaatt cttatacaaa tatacacgaa cacatatatt	6240
tgacaaaatc aaagtattac actaaacaat gagttggtgc atggccaaaa caaatatgta	6300
gattaaaaat tccagcctcc aaaaaaaaaat ccaagtgttg taaagcatta tatatatata	6360
gtagatccca aatttttgta caattccaca ctgatcgaat ttttaaagtt gaatatctga	6420
cgtaggattt ttttaatgtc ttacctgacc atttactaat aacattcata cgttttcatt	6480
tgaaatatcc tctataatta tattgaattt ggcacataat aagaaacctt attggtgatt	6540
tattttacta gtaaatttct ggtgatgggc tttctactag aaagctctcg gaaaatcttg	6600

gaccaaatecc atattccatg acttcgattg ttaaccctat tagttttcac aaacatacta	6660
tcaatatcat tgcaacggaa aagggtacaag taaaacattc aatccgatag ggaagtgatg	6720
taggaggttg ggaagacagg cccagaaaga gatttatctg acttgttttg tgtatagttt	6780
tcaatgttca taaaggaaga tggagacttg agaagttttt tttggacttt gtttagcttt	6840
gttgggcgtt tttttttttg atcaataact ttgttgggct tatgatttgt aatattttcg	6900
tggactcttt agttttattta gacgtgctaa ctttgttggg cttatgactt gttgtaacat	6960
attgtaacag atgacttgat gtgcgactaa tctttacaca ttaaacaatag ttctgttttt	7020
tgaaagttct tatttttcatt tttatttgaa tggtatatat ttttctatat ttataattct	7080
agtaaaaggc aaattttgct tttaaatgaa aaaaatatat attccacagt ttcacctaata	7140
cttatgcatt tagcagtaca aattcaaaaa tttcccatth ttattcatga atcataccat	7200
tatatattaa ctaaatecaa ggtaaaaaaa aggtatgaaa gctctatagt aagtaaaata	7260
taaattcccc ataaggaaaag ggccaagtcc accaggcaag taaatgagc aagcaccact	7320
ccaccatcac acaatttcac tcatagataa cgataagatt catggaatta tcttcacgt	7380
ggcattattc cagcgggttca agccgataag ggtctcaaca cctctcctta ggcctttgtg	7440
gccgttacca agtaaaatta acctcacaca tatccacact caaaatccaa cgggtgtagat	7500
cctagtccac ttgaatctca tgtatcctag acctccgat cactccaaag cttgtttctca	7560
ttgttggtat cattatatat agatgaccaa agcactagac caaacctcag tcacacaaag	7620
agtaaaagaag aacaatggct tcctctatgc tctcttccgc tactatgggt gcctctccgg	7680
ctcaggccac tatggtcgct cttttcaacg gacttaagtc ctccgctgcc ttcccagcca	7740
cccgcaaggc taacaacgac attacttcca tcacaagcaa cggcggaaga gtttaactgca	7800
tgcaggtgtg gcctccgatt ggaaagaaga agtttgagac tctctcttac cttcctgacc	7860
ttaccgattc cggtggtcgc gtcaactgca tgcaggccat ggacaacaac ccaaacaatca	7920
acgaatgcat tccatacaac tgcttgagta acccagaagt tgaagtactt ggtggagaac	7980
gcattgaaac cggttacact cccatcgaca tctccttgtc cttgacacag tttctgctca	8040
gcgagttcgt gccagggtgct ggggttcgttc tcggactagt tgacatcctc tgggggtatct	8100
ttggtccatc tcaatgggat gcattcctgg tgcaaatga gcagttgatc aaccagagga	8160
tcgaagagtt cgccaggaac caggccatct ctaggttgga aggattgagc aatctctacc	8220
aaatctatgc agagagcttc agagagtggg aagccgatcc tactaaccce gctctccgcg	8280

aggaaatgcg tattcaattc aacgacatga acagcgctt gaccacagct atcccattgt	8340
tcgcagtcca gaactaccaa gtccctctct tgtccgtgta cgttcaagca gctaattctc	8400
acctcagcgt gcttcgagac gttagcgtgt ttgggcaaag gtggggattc gatgctgcaa	8460
ccatcaatag ccgttacaac gaccttacta ggctgattgg aaactacacc gaccacgctg	8520
ttcgttggtta caaactggc ttggagcgtg tctggggctc tgattctaga gattggatta	8580
gatacaacca gttcaggaga gaattgaccc tcacagtttt ggacattgtg tctctcttcc	8640
cgaactatga ctccagaacc taccctatcc gtacagtgtc ccaacttacc agagaaatct	8700
atactaacc agttcttgag aacttcgacg gtagcttccg tggttctgcc caaggatatc	8760
aaggtccat caggagccca cacttgatgg acatcttgaa cagcataact atctacaccg	8820
atgctcacag aggagagtat tactggctctg gacaccagat catggcctct ccagttggat	8880
tcagcgggcc cgagtttacc tttcctctct atggaactat gggaaacgcc gctccacaac	8940
aacgtatcgt tgctcaacta ggtcaggggtg tctacagaac cttgtcttcc accttgata	9000
gaagaccctt caatatcggg atcaacaacc agcaactttc cgttcttgac ggaacagagt	9060
tcgcctatgg aacctcttct aacttgccat ccgctgttta cagaaagagc ggaaccgttg	9120
attccttgga cgaaatccca ccacagaaca acaatgtgcc acccaggcaa ggattctccc	9180
acaggttgag ccacgtgtcc atgttccgtt ccggattcag caacagttcc gtgagcatca	9240
tcagagctcc tatgttctct tggatacatc gtagtgctga gttcaacaac atcatcgc	9300
ccgatagtat tactcaaacc cctgcagtga agggaaactt tctcttcaac ggttctgtca	9360
tttcaggacc aggattcact ggtggagacc tcggttagact caacagcagt ggaaataaca	9420
ttcagaatag agggatatatt gaagttccaa ttcacttccc atccacatct accagatata	9480
gagttcgtgt gaggtatgct tctgtgacct ctattcacct caacgttaat tggggaatt	9540
catccatctt ctccaataca gttccagcta cagctacctc cttggataat ctccaatcca	9600
gcgatttcgg ttactttgaa agtgccaatg cttttacatc ttcactcggg aacatcgtgg	9660
gtgttagaaa ctttagtggg actgcaggag tgattatcga cagattcgag ttcattccag	9720
ttactgcaac actcgaggct gagtacaacc ttgagagagc ccagaaggct gtgaacgccc	9780
tctttacctc caccaatcag cttggcttga aaactaacgt tactgactat cacattgacc	9840
aagtgtccaa cttggtcacc taccttagcg atgagttctg cctcgacgag aagegtgaac	9900
tctccgagaa agttaaacac gccaaagcgtc tcagcgacga gaggaatctc ttgcaagact	9960
ccaacttcaa agacatcaac aggcagccag aacgtggttg gggtggaagc accgggatca	10020

ccatccaagg aggcgacgat gtgttcaagg agaactacgt caccctctcc ggaactttcg	10080
acgagtgcta ccctacctac ttgtaccaga agatcgatga gtccaaactc aaagccttca	10140
ccaggtatca acttagaggc tacatcgaag acagccaaga ccttgaaatc tactcgatca	10200
ggtacaatgc caagcacgag accgtgaatg tcccaggtag tggttccctc tggccacttt	10260
ctgcccattc tcccattggg aagtgtggag agcctaacag atgcgctcca caccttgagt	10320
ggaatcctga cttggactgc tcctgcaggg atggcgagaa gtgtgcccac cattctcatc	10380
acttctcctt ggacatcgat gtgggatgta ctgacctgaa tgaggacctc ggagtctggg	10440
tcattcttcaa gatcaagacc caagacggac acgcaagact tggcaacctt gagtttctcg	10500
aagagaaacc attggctcgt gaagctctcg ctggtgtgaa gagagcagag aagaagtgga	10560
gggacaaacg tgagaaactc gaatgggaaa ctaacatcgt ttacaaggag gccaaagagt	10620
ccgtggatgc tttgttcgtg aactcccaat atgatcagtt gcaagccgac accaaccatcg	10680
ccatgatcca cgcgcgagac aaacgtgtgc acagcattcg tgaggcttac ttgcctgagt	10740
tgctcgtgat ccctggtgtg aacgctgcca tcttcgagga acttgaggga cgtatcttta	10800
ccgcattctc cttgtacgat gccagaaacg tcatcaagaa cggtgacttc aacaatggcc	10860
tcagctgctg gaatgtgaaa ggtcatgtgg acgtggagga acagaacaat cagcgttccg	10920
tcctggttgt gcctgagtgg gaagctgaag tgtcccaaga ggttagagtc tgtccaggta	10980
gaggctacat tctccgtgtg accgcttaca aggagggata cggtgagggg tgcgtgacca	11040
tccacgagat cgagaacaac accgacgagc ttaagttctc caactgcgtc gaggaagaaa	11100
tctatcccaa caacaccgtt acttgcaacg actacactgt gaatcaggaa gagtacggag	11160
gtgcctacac tagccgtaac agaggttaca acgaagctcc ttccgttcct gctgactatg	11220
cctccgtgta cgaggagaaa tcttacacag atggcagacg tgagaaccct tgcgagttca	11280
acagaggtta cagggactac acaccacttc cagttggcta tgttaccaag gagcttgagt	11340
actttcctga gaccgacaaa gtgtggatcg agatcgggta aaccgaggga accttcatcg	11400
tggacagcgt ggagcttctc ttgatggagg aataatgaga tcccgctcct tgtcttcaat	11460
tttgagggct ttttactgaa taagtatgta gtactaaaat gtatgctgta atagctcata	11520
gtgagcgagg aaagtatcgg gctattttaac tatgacttga gctccatcta tgaataaata	11580
aatcagcata tgatgctttt gttttgtgta cttcaactgt ctgcttagct aatttgatat	11640
ggttggcact tggcacgtat aaatatgctg aagtaattta ctctgaagct aaattaacta	11700

gattagatga gtgtattata tacaaaaggc attaaatcag atacatctta gacaaattgt	11760
cacggtctac cagaaaagaa attgcatttg tttttgggtc tttcagactg acaagatcga	11820
tctgaagtct aaacaattct aagaggatc atgtagcaat gtcctgccac aatattgaat	11880
tgacctgcag cccgggcggc cgcacgac gtgaagtttc tcatctaagc cccatttgg	11940
acgtgaatgt agacacgtcg aaataaagat ttccgaatta gaataatttg tttattgctt	12000
tcgcctataa atacgacgga tcgtaatttg tcgttttacc aaaatgtact ttcattttat	12060
aataacgctg cggacatcta catttttgaa ttgaaaaaaa attggttaatt actctttctt	12120
tttctccata ttgacctca tactcattgc tgatccatgt agatttcccg gacatgaagc	12180
catcaaaaag taggactaat ttaggaaagc aagctaattc aagaaagtga aggcacgctt	12240
agtgtgagac acgtgttgag cgcgattact gccactcact aaccacacaa gtgcactcag	12300
tgcaagggtt gcttaaaaaat taagttgatt cgcacttata aaagaaggat agagatgaag	12360
gaaaaaacac agaaaataca attccttata gaagacaaag gctagaagaa gcaaacgcaa	12420
acattagaag tcattccttc cctcaattcc ctttttcaat ttcccctttt actaaatatt	12480
ctcctcttgc aattataaag cctcctatga caatgacaag ctaaactctc ctttgttggg	12540
aacttatcag tcaactgtc ttaatataat ttctcttctt atctattatg aatattcact	12600
acaagaaata tgccatttg ccagggtatt ttgacagggg cattaacccc tggcaaattt	12660
cccagggact aagccaagga aaccctggc aaaatgacat ttgagaaggc tgggaccact	12720
tacatttaca caggggtttg tccctcgcaa aaatacaaaa gccttggcaa aaaaaagagc	12780
gggaaatgaa ttttaaaaca gcatgttgtt ttcacacagc caaacacacg ggtatgccct	12840
cgttttctgt aaagctgacg gaatcttccc ataagtcaac acgacatgac catgcactgc	12900
aaaaagctgt gcggcccaga cgtgacaggg gtgttaccct tcggaaatgg cttgcagccc	12960
ctggcaaaaa ggaatccctg ctttcctagc tacaccgttc tgctcatata gctgaagcta	13020
ggagggttagc ctttgactct gttgttttgc gaggggcatt ccgtgagtta ttccctgggt	13080
ttttttacac tatatagcca aaccgcgtgt ttatcctcat gctcagtgtt gtgtttttga	13140
aacttagaaa aattttcggt ttccatttcc atcctcacca gttcattttc agtccattat	13200
cattcagttc atacacttgt tctataattt ggtaacactc ttttacttta ttatattttt	13260
ctgtttttat ttgttactac ttattaacat aaatattttt tattgtatca gtgtccaaat	13320
ttgcctctc ctgctgctcc ttgctctctg aatttgttct ctttaagcttc aacaagttag	13380
taatttttct acttataatt ttagatatat gatgtttata tatatgatgt tataattttg	13440

catgatctgt caaagaaaat atgatgttct tacttgcatg atgtgttata atatatgatg 13500
tttatatata tttcgaattt tgttgtaaat aaaactgttt aattagaaac tgtataattt 13560
ttttgtttta taaaactgtt taattttgca tgatctgttt aataaaaactg tttatataaa 13620
actgtttata tataatatat gatgttaaca tttttaaactg tgtttataaa acagtttagt 13680
tagaaaaaat gttaaaacta gagaaaaaaa tgtataataa aactgtgtca gtacagcagc 13740
gcgtcagaaa agtgtgcaga tgcgtcagtg agaagacagg ggctaagaca gggattttga 13800
caggaattt tgccagggat tttgccaggg tcagccctc gtttttttgc caggggtgaa 13860
atccctggca aactgatttg cgatggcggt ttttccagg gattcagccc ctggcaaat 13920
ccctggcaaa cgtccatttc ccagggttt ttgttctttt ccagggaat ccgcccctgg 13980
caaacgagct tgtttcttgt agtgattact tttgcattag ttttctctgt atttaatttt 14040
attgtttatg gcttgattac ccatttgcac tataagtttt aggggtagcg ttgaaaagtg 14100
ttattctcta atagaactgg aaaagagtat ttaaataact tcatcactag ggatacattg 14160
atattattta gcttattata tatctctatt attaatgtaa tttactatt ttatctctgc 14220
aaagtgattt gggagagaag atagataagt tagactcttt cactcgaggc tgagtacaac 14280
cttgagagag ccagaaggc tgtgaacgcc ctctttacct ccaccaatca gcttggttg 14340
aaaactaacg ttactgacta tcacattgac caagtgtcca acttggtcac ctaccttagc 14400
gatgagttct gaaggg 14416

<210> 7
<211> 6916
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(6916)
<223> TIC107 expression cassette with full right and left borders

<400> 7
aggatttttc ggcgctgcgc tacgtccgcg accgcgttga gggatcaagc cacagcagcc 60
cactcgacct tctagccgac ccagacgagc caagggatct ttttggaatg ctgctccgtc 120
gtcaggcttt ccgacgtttg ggtggttgaa cagaagtcac tatcgcacgg aatgccaagc 180

actcccgagg ggaaccctgt ggttggcatg cacatacaaa tggacgaacg gataaacctt	240
ttcacgccct tttaaatata cgattattct aataaacgct cttttctctt aggtttaccc	300
gccaatatat cctgtcaaac actgatagtt taaactgaag gcgggaaacg acaatctgat	360
ccccatcaag cttgatatac aattcctgca gcccggggga tccactagtt ctagagcggc	420
cgcgttaact gcaggtcgac ggatccccgg gtaccgagct cgaattcaaa tttattatgt	480
gttttttttc cgtggtcgag atttgtgtatt attctttagt tattacaaga ctttttagcta	540
aaatttgaaa gaatttactt taagaaaata ttaacatctg agataatttc agcaatagat	600
tatatatttc attactctag cagtattttt gcagatcaat cgcaacatat atggttgtta	660
gaaaaaatgc actatatata tatatattat tttttcaatt aaaagtgcac gatataata	720
atatatatat atatatatgt gtgtgtgtat atgggtcaaag aaattcttat acaaatatac	780
acgaacacat atatttgaca aaatcaaagt attacactaa acaatgagtt ggtgcacggc	840
caaaacaaat atgtagatta aaaattccag cctccaaaaa aaaatccaag tgttgtaaag	900
cattatatat atatagtaga tcccaaattt ttgtacaatt ccacactgat cgaattttta	960
aagttgaata tctgacgtag gattttttta atgtcttacc tgaccattta ctaataacat	1020
tcatacgttt tcatttgaaa tatcctctat aattatattg aatttggcac ataataagaa	1080
acctaattgg tgatttatit tactagtaaa tttctggtga tgggctttct actagaaagc	1140
tctcgaaaaa tcttggacca aatccatatt ccatgacttc gattgttaac cctattagtt	1200
ttcacaaaca tactatcaat atcattgcaa cggaaaagggt acaagtaaaa cattcaatcc	1260
gatagggaaag tgatgtagga ggttgggaag acaggccdag aaagagattt atctgacttg	1320
ttttgtgtat agttttcaat gttcataaag gaagatggag acttgagaag ttttttttgg	1380
actttgttta gctttgttgg gcgttttttt ttttgatcaa taactttggt gggcttatga	1440
tttgtaatat tttcgtggac tcttttagttt atttagacgt gctaactttg ttgggcttat	1500
gacttgttgt aacatattgt aacagatgac ttgatgtgcg actaatcttt acacattaaa	1560
catagtcttg ttttttgaaa gttcttatit tcatttttat ttgaatgtta tatatttttc	1620
tatatattata attctagtaa aaggcaaatt ttgcttttaa atgaaaaaaa tatatattcc	1680
acagtttcac ctaatcttat gcatttagca gtacaaattc aaaaatttcc catttttatt	1740
catgaatcat accattatat attaaactaaa tccaaggtaa aaaaaaggta tgaaagctct	1800
atagtaagta aaatataaat tccccataag gaaagggcca agtccaccag gcaagtaaaa	1860
tgagcaagca ccactccacc atcacacaat ttcactcata gataacgata agattcatgg	1920

aattatcttc cacgtggcat tattccagcg gttcaagccg ataagggctct caacacctct	1980
ccttaggcct ttgtggccgt taccaagtaa aattaacctc acacatatcc acactcaaaa	2040
tccaacggtg tagatcctag tccacttgaa tctcatgtat cctagaccct ccgatcactc	2100
caaagcttgt tctcattgtt gttatcatta tatatagatg accaaagcac tagaccaaac	2160
ctcagtcaca caaagagtaa agaagaacaa tggcttcctc tatgctctct tccgctacta	2220
tggttgcttc tccggctcag gccactatgg tgcctccttt caacggactt aagtcctccg	2280
ctgccttccc agccaccgc aaggctaaca acgacattac ttccatcaca agcaacggcg	2340
gaagagttaa ctgcatgcag gtgtggcctc cgattggaaa gaagaagttt gagactctct	2400
cttaccttcc tgaccttacc gattccggtg gtcgcgtcaa ctgcatgcag gccatggaca	2460
acaacccaaa catcaacgaa tgcattccat acaactgctt gagtaacca gaagttgaag	2520
tacttggtgg agaacgcatt gaaaccggtt acactcccat cgacatctcc ttgtccttga	2580
cacagtttct gctcagcgag ttcgtgccag gtgctgggtt cgttctcgga ctagttgaca	2640
tcatctgggg tatctttggt ccatctcaat gggatgcatt cctggtgcaa attgagcagt	2700
tgatcaacca gaggatcgaa gagtcgcca ggaaccaggc catctctagg ttggaaggat	2760
tgagcaatct ctaccaaate tatgcagaga gcttcagaga gtgggaagcc gatcctacta	2820
accagctct ccgcgaggaa atgcgtattc aattcaacga catgaacagc gccttgacca	2880
cagctatccc attgttcgca gtccagaact accaagttcc tctcttgtec gtgtacgttc	2940
aagcagctaa tcttcacctc agegtgcttc gagacgttag cgtggttggg caaaggtggg	3000
gattcgatgc tgcaaccatc aatagccgtt acaacgacct tactaggetg attggaaact	3060
acaccgacca cgctgttcgt tggtaacaac ctggcttgga gcgtgtctgg ggtcctgatt	3120
ctagagattg gattagatac aaccagttca ggagagaatt gacctcaca gttttggaca	3180
ttgtgtctct ctccccgaac tatgactcca gaacctaccc tatccgtaca gtgtcccaac	3240
ttaccagaga aatctatact aaccagttc ttgagaactt cgacggtagc ttccgtgggt	3300
ctgccaagg tatcgaaggc tccatcagga gccacactt gatggacatc ttgaacagca	3360
taactatcta caccgatgct cacagaggag agtattactg gtctggacac cagatcatgg	3420
cctctccagt tggattcagc gggcccgagt ttacctttcc tctctatgga actatgggaa	3480
acgccgctcc acaacaacgt atcgttgctc aactaggtca ggggtgtctac agaaccttgt	3540
cttccacett gtacagaaga cccttcaata tcggtatcaa caaccagcaa ctttccgttc	3600

ttgacggaac agagttcgcc tatggaacct cttctaactt gccatccgct gtttacagaa	3660
agagcggaac cgttgattcc ttggacgaaa tcccaccaca gaacaacaat gtgccaccca	3720
ggcaaggatt ctcccacagg ttgagccacg tgtccatgtt ccgttcgga ttcagcaaca	3780
gttccgtgag catcatcaga gctcctatgt tctcttggat acatcgtagt gctgagttca	3840
acaacatcat cgcattccgat agtattactc aaatccctgc agtgaaggga aactttctct	3900
tcaacggttc tgtcatttca ggaccaggat tcaactggtg agacctcggt agactcaaca	3960
gcagtggaaa taacattcag aatagagggt atattgaagt tccaattcac ttcccatcca	4020
catctaccag atatagagtt cgtgtgaggt atgcttctgt gacctctatt cacctcaacg	4080
ttaattgggg taattcatcc atcttctcca atacagttcc agctacagct acctccttgg	4140
ataatctcca atccagcgat ttcggttact ttgaaagtgc caatgctttt acatcttcac	4200
tcggtaacat cgtgggtgtt agaaacttta gtgggactgc aggagtgatt atcgacagat	4260
tcgagttcat tccagttact gcaacactcg aggctgagta caaccttgag agagcccaga	4320
aggctgtgaa cgccctcttt acctccacca atcagcttgg cttgaaaact aacgttactg	4380
actatcacat tgaccaagtg tccaacttgg tcacctacct tagcgatgag ttctgcctcg	4440
acgagaagcg tgaactctcc gagaaagtta aacacgcaa gcgtctcagc gacgagagga	4500
atctcttgca agactccaac ttcaaagaca tcaacaggca gccagaacgt ggttgggggtg	4560
gaagcaccgg gatcaccatc caaggaggcg acgatgtgtt caaggagaac tacgtcaccc	4620
tctccggaac ttctgacgag tgetacccta cctacttgta ccagaagatc gatgagtcca	4680
aactcaaagc cttcaccagg tatcaactta gaggtacat cgaagacagc caagaccttg	4740
aaatctactc gatcaggtac aatgccaaagc acgagaccgt gaatgtccca ggtactgggt	4800
ccctctggcc actttctgcc caatctccca ttgggaagtg tggagagcct aacagatgcg	4860
ctccacacct tgagtggaat cctgacttgg actgctcctg cagggatggc gagaagtgtg	4920
cccaccattc tcatcattc tccttggaca tcgatgtggg atgtactgac ctgaatgagg	4980
acctcgaggt ctgggtcacc ttcaagatca agaccaaga cggacacgca agacttggca	5040
accttgagtt tctcgaagag aaaccattgg tcggtgaagc tctcgctcgt gtgaagagag	5100
cagagaagaa gtggaggggac aaacgtgaga aactcgaatg ggaaactaac atcgtttaca	5160
aggaggccaa agagtccgtg gatgctttgt tcgtgaactc ccaatatgat cagttgcaag	5220
ccgacaccaa catcgccatg atccacgccg cagacaaacg tgtgcacagc attcgtgagg	5280
cttacttgcc tgagttgtcc gtgatccctg gtgtgaacgc tgccatcttc gaggaacttg	5340

agggacgtat ctttaccgca ttctccttgt acgatgccag aaacgtcatc aagaacggtg 5400
 atttcaacaa tggcctcagc tgctggaatg tgaaagggtca tgtggacgtg gaggaacaga 5460
 acaatcagcg ttccgtcctg gttgtgcctg agtgggaagc tgaagtgtcc caagagggtta 5520
 gagtctgtcc aggtagaggc tacattctcc gtgtgacgc ttacaaggag ggatacgggtg 5580
 aggggttgctg gaccatccac gagatcgaga acaacaccga cgagcttaag ttctccaact 5640
 gcgtcgagga agaaatctat cccaacaaca cgttacttg caacgactac actgtgaatc 5700
 aggaagagta cggaggtgcc tacactagcc gtaacagagg ttacaacgaa gctccttccg 5760
 ttctgtctga ctatgcctcc gtgtacgagg agaaatccta cacagatggc agacgtgaga 5820
 acccttgcca gttcaacaga ggttacaggg actacacacc acttccagtt ggctatgtta 5880
 ccaaggagct tgagtacttt cctgagaccg acaaagtgtg gatcgagatc ggtgaaaccg 5940
 agggaaacctt catcgtggac agcgtggagc ttctcttgat ggaggaataa tgagatcccg 6000
 tcctttgtct tcaattttga gggcttttta ctgaataagt atgtagtact aaaatgtatg 6060
 ctgtaatagc tcatagttag cgaggaaagt atcgggctat ttaactatga cttgagctcc 6120
 atctatgaat aaataaatca gcatatgatg cttttgtttt gtgtacttca actgtctgct 6180
 tagctaattt gatatggttg gcacttggca cgtataaata tgctgaagta atttactctg 6240
 aagctaaatt aactagatta gatgagtgtt ttatatacaa aaggcattaa atcagataca 6300
 tcttagacaa attgtcacgg tctaccagaa aagaaattgc atttgttttt gggctcttca 6360
 gactgacaag atcgatctga agtctaaaca attctaagag gtatcatgta gcaatgtcct 6420
 gccacaatat tgaattgacc tgcagcccg gggcccgcat cgatcgtgaa gtttctcatc 6480
 taagccccc tttggacgtg aatgtagaca cgtcgaaata aagatttccg aattagaata 6540
 atttgtttat tgctttcgcc tataaatagc acggatcgta atttgctggt ttatcaaaat 6600
 gtactttcat ttataataa cgctgcggac atctacattt ttgaattgaa aaaaaattgg 6660
 taattactct ttctttttct ccatattgac catcatactc attgctgac catgtagatt 6720
 tcccgacat gaagccattt acaattgaat atatcctgcc gccgctgccg ctttgacccc 6780
 ggtggagctt gcatgttggg ttctacgcag aactgagccg gttaggcaga taatttccat 6840
 tgagaactga gccatgtgca ccttcccccc aacacgggtga gcgacggggc aacggagtga 6900
 tccacatggg actttt 6916

<210> 8

DM_US:21564765_1

<211> 3801
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(3801)
<223> DNA encoding the TIC107 insect toxin including the chloroplast transit peptide encoding sequence

<400> 8
atggcttcct ctatgctctc ttccgctact atggttgcct ctccggctca ggccactatg 60
gtcgtctcctt tcaacggact taagtccctc gctgccttcc cagccaccog caaggctaac 120
aacgacatta cttccatcac aagcaacggc ggaagagtta actgcatgca ggtgtggcct 180
ccgattggaa agaagaagtt tgagactctc tcttaccttc ctgaccttac cgattccggt 240
ggtcgcgtca actgcatgca ggccatggac aacaacccaa acatcaacga atgcattcca 300
tacaactgct tgagtaaccc agaagttgaa gtacttgggtg gagaacgcat tgaaaccggt 360
tacactccca tcgacatctc cttgtccttg acacagtttc tgctcagcga gttcgtgcca 420
ggtgctgggt tcgttctcgg actagttgac atcatctggg gtatctttgg tccatctcaa 480
tgggatgcat tcctggtgca aattgagcag ttgatcaacc agaggatcga agagtccgcc 540
aggaaccagg ccatctctag gttggaagga ttgagcaatc tctaccaaat ctatgcagag 600
agcttcagag agtggaagc cgatcctact aaccagctc tccgcgagga aatgcgtatt 660
caattcaacg acatgaacag cgccttgacc acagctatcc cattgttcgc agtccagaac 720
taccaagttc ctctcttgtc cgtgtacgtt caagcagcta atcttcacct cagcgtgctt 780
cgagacgtta gcgtgtttgg gcaaagggtg ggattcgatg ctgcaaccat caatagccgt 840
tacaacgacc ttactaggct gattggaaac tacaccgacc acgctgttcg ttggtacaac 900
actggcttgg agcgtgtctg gggtcctgat tctagagatt ggattagata caaccagttc 960
aggagagaat tgaccctcac agttttggac attgtgtctc tcttcccgaa ctatgactcc 1020
agaacctacc ctatccgtac agtgtcccaa cttaccagag aaatctatac taaccagtt 1080
cttgagaact tcgacggtag cttccgtggg tctgccaag gtatcgaagg ctccatcagg 1140
agcccacact tgatggacat cttgaacagc ataactatct acaccgatgc tcacagagga 1200
gagtattact ggtctggaca ccagatcatg gcctctccag ttggattcag cgggcccag 1260

tttacctttc ctctctatgg aactatggga aacgccgctc cacaacaacg tatcgttgct	1320
caactagggtc aggggtgtcta cagaaccttg tcttccacct tgtacagaag acccttcaat	1380
atcggatatca acaaccagca actttccggt cttgacggaa cagagtccgc ctatggaacc	1440
tcttctaact tgccatccgc tgtttacaga aagagcggaa ccgttgattc cttggacgaa	1500
atcccaccac agaacaacaa tgtgccaccc aggcaaggat tctcccacag gttgagccac	1560
gtgtccatgt tccgttccgg attcagcaac agttccgtga gcatcatcag agtcctatg	1620
ttctcttgga tacatcgtag tgctgagttc aacaacatca tcgcatccga tagtattact	1680
caaatccctg cagtgaaggg aaactttctc ttcaacgggt ctgtcatttc aggaccagga	1740
ttcactggtg gagacctcgt tagactcaac agcagtggaa ataacattca gaatagaggg	1800
tatattgaag ttccaattca cttcccatcc acatctacca gatatagagt tcgtgtgagg	1860
tatgcttctg tgaccctat tcacctcaac gttaattggg gtaattcatc catcttctcc	1920
aatacagttc cagctacagc tacctccttg gataatctcc aatccagcga tttcggttac	1980
tttgaaagtg ccaatgcttt tacatcttca ctcggtaaca tcgtgggtgt tagaaacttt	2040
agtgggactg caggagtgat tatcgacaga ttcgagttca ttccagttac tgcaaacctc	2100
gaggctgagt acaaccttga gagagcccag aaggctgtga acgccctctt tacctccacc	2160
aatcagcttg gcttgaaaac taacgttact gactatcaca ttgaccaagt gtccaacttg	2220
gtcacctacc ttagcgatga gttctgcctc gacgagaagc gtgaactctc cgagaaagtt	2280
aaacacgcca agcgtctcag cgacgagagg aatctcttgc aagactccaa cttcaaagac	2340
atcaacaggc agccagaacg tggttggggg ggaagcaccg ggatcaccat ccaaggaggc	2400
gacgatgtgt tcaaggagaa ctacgtcacc ctctccggaa ctttcgacga gtgctaccct	2460
acctacttgt accagaagat cgatgagtc aaactcaaag ctttcaccag gtatcaactt	2520
agaggctaca tcgaagacag ccaagacctt gaaatctact cgatcaggta caatgccaag	2580
cacgagaccg tgaatgtccc aggtactggt tccctctggc cactttctgc ccaatctccc	2640
attgggaagt gtggagagcc taacagatgc gctccacacc ttgagtggaa tcctgacttg	2700
gactgtcct gcagggatgg cgagaagtgt gccaccatt ctcactactt ctccctggac	2760
atcgatgtgg gatgtactga cctgaatgag gacctcggag tctgggtcat cttcaagatc	2820
aagaccaag acggacacgc aagacttggc aaccttgagt ttctcgaaga gaaaccattg	2880
gtcgggtgaag ctctcgctcg tgtgaagaga gcagagaaga agtggaggga caaacgtgag	2940
aaactcgaat gggaaactaa catcgtttac aaggaggcca aagagtccgt ggatgctttg	3000

```

ttcgtgaact cccaatatga tcagttgcaa gccgacacca acatcgccat gatccacgcc 3060
gcagacaaac gtgtgcacag cattcgtgag gcttacttgc ctgagttgtc cgtgatccct 3120
gggtgtgaacg ctgccatctt cgaggaactt gagggacgta tctttaccgc attctccttg 3180
tacgatgcca gaaacgtcat caagaacggt gacttcaaca atggcctcag ctgctggaat 3240
gtgaaaggtc atgtggacgt ggaggaacag aacaatcagc gttccgtcct ggttgtgcct 3300
gagtgggaag ctgaagtgtc ccaagagggt agagtctgtc caggtagagg ctacattctc 3360
cgtgtgaccg cttacaagga gggatacggg gaggggtgctg tgaccatcca cgagatcgag 3420
aacaacaccg acgagcttaa gttctccaac tgcgtcgagg aagaaatcta tccaacaac 3480
accgttactt gcaacgacta cactgtgaat caggaagagt acggaggtgc ctacactagc 3540
cgtaacagag gttacaacga agctccttcc gttcctgctg actatgcctc cgtgtacgag 3600
gagaaatcct acacagatgg cagacgtgag aacccttgct agttcaacag aggttacagg 3660
gactacacac cacttccagt tggctatggt accaaggagc ttgagtactt tcttgagacc 3720
gacaaagtgt ggatcgagat cggtgaaacc gagggaaact tcatcgtgga cagcgtggag 3780
cttctcttga tggaggaata a 3801

```

```

<210> 9
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial sequence

```

```

<220>
<223> Synthetic

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(25)
<223> oligonucleotide primer SQ1135

```

```

<400> 9
cccgccttca gtttaaacta tcagt

```

25

```

<210> 10
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial sequence

```

```

<220>
<223> Synthetic

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(28)
<223> Oligonucleotide primer SQ1136

<400> 10
attggtgata tgaagataca tgcttagc

28

<210> 11
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(16)
<223> 6FAM-labeled oligonucleotide probe PB63

<400> 11
ttgacacaca cactaa

16

<210> 12
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(24)
<223> Oligonucleotide primer SQ3443

<400> 12
cattgctgat ccatgtagat ttcc

24

<210> 13
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(28)

<223> Oligonucleotide primer SQ3445

<400> 13
agcttgcttt cctaaattag tcctactt

28

<210> 14
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(18)
<223> Oligonucleotide primer SQ3446

<400> 14
ggcgctctgc acgatgta

18

<210> 15
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(16)
<223> 6FAM-labeled oligonucleotide probe PB1111

<400> 15
acatgaagcc atcaaa

16

<210> 16
<211> 14
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(14)
<223> VIC-labeled oligonucleotide probe PB1112

<400> 16

aggctcagtg gcgc

14 000093

**PLANTAS Y SEMILLAS DE SOJA CORRESPONDIENTES AL EVENTO
TRANSGÉNICO MON87701 Y MÉTODOS DE DETECCIÓN DEL MISMO**

[0001] Esta solicitud invoca el beneficio de prioridad de la Solicitud Provisional de Patente de EE.UU. N°: 60/988.349, presentada el 15 de noviembre, 2007,
5 incorporada por completo en este documento a modo de referencia.

CAMPO DE LA INVENCION

[0002] La presente invención se relaciona con el evento transgénico de soja MON87701, y con partes de plantas y semillas del mismo. El evento presenta resistencia a infestaciones de insectos del orden Lepidóptera. La presente invención
10 también se relaciona con métodos para detectar la presencia de dicho evento de soja en una muestra biológica, y provee secuencias de nucleótidos que son únicas para el evento.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0003] La soja es un cultivo importante y una fuente de alimento primaria en
15 muchas áreas del mundo. Se han aplicado métodos de biotecnología a la soja para mejorar las características agronómicas y la calidad del producto. Una característica agronómica tal es la resistencia a insectos.

[0004] Sería ventajoso poder detectar la presencia de ADN transgénico/genómico de una planta particular para determinar si la progenie de un
20 cruzamiento sexual contiene un ADN transgénico/genómico de interés. Además, un método para detectar una planta particular será de utilidad cuando se desea cumplir con las regulaciones que requieren de una aprobación previa a la comercialización, al igual que la rotulación de los productos derivados de plantas de cultivo recombinantes.

[0005] Los cultivos transgénicos que expresan δ -endotoxinas de *B.*
25 *thuringiensis* permiten a los cultivadores reducir significativamente el tiempo y el costo

asociados con la aplicación de insecticidas químicos así como incrementar los rendimientos de los cultivos en plantas transgénicas cultivadas bajo una presión pesada de insectos en comparación con rendimientos muy reducidos en las variedades comerciales de plantas no transgénicas. A pesar de este éxito, aún se
5 prevé que los insectos pueden desarrollar resistencia a las δ -endotoxinas de *B. thuringiensis* expresadas en las plantas transgénicas. Dicha resistencia, en el caso que se dispersara, limitaría claramente el valor comercial del germoplasma que contiene a los genes que codifican algunas δ -endotoxinas de *B. thuringiensis*.

[0006] Una manera posible de incrementar la eficacia de los insecticidas
10 transgénicos contra las plagas blanco y reducir al mismo tiempo el desarrollo de plantas resistentes a insecticidas sería asegurar que los cultivos transgénicos expresaran niveles altos de las δ -endotoxinas de *B. thuringiensis* (McGaughey y Whalon (1992), *Science* 258:1451-55; Roush Roush (1994), *Biocontrol. Sci. Technol.* 4:501-516). Entre las numerosas proteínas insecticidas identificadas en *Bacillus*
15 *thuringiensis*, relativamente pocas proteínas insecticidas individuales, tales como las Cry1's, Cry3's, VIP3A, Cry34, Cry35 y Cry2Ab, han sido evaluadas por su expresión en plantas. En el caso de Cry2Ab, con el fin de alcanzar niveles altos de expresión *in planta*, esta proteína insecticida (Cry2Ab) debía ser dirigida a los cloroplastos para evitar efectos fitotóxicos indeseados.

20 [0007] Se sabe que la expresión de genes extraños en plantas es afectada por su posición cromosómica, tal vez debido a la estructura de la cromatina (por ejemplo, la heterocromatina) o la proximidad de elementos reguladores de la transcripción (por ejemplo, potenciadores) cercanos al sitio de integración (Weising *et al.* (1988) Ann. Rev. Genet. 22:421-477. Por este motivo, comúnmente es necesario analizar una
25 gran cantidad de eventos para identificar un evento caracterizado por la expresión

óptima de un gen introducido de interés. Por ejemplo, en plantas y otros organismos se ha observado que puede haber una amplia variación entre eventos en los niveles de expresión de un gen introducido. También pueden haber diferencias en los patrones de expresión espaciales o temporales, por ejemplo, diferencias en la expresión relativa de un transgen en diversos tejidos vegetales, que pueden no corresponder a los patrones esperados a partir de los elementos reguladores de la transcripción presentes en la construcción genética introducida. Por esta razón, es común producir entre cientos y miles de eventos diferentes, y analizar estos eventos en busca de un único evento que tenga los niveles y los patrones de expresión transgénicos deseados para fines comerciales. Un evento que tiene los niveles o los patrones de expresión transgénica deseados es útil para introducir el transgen en otros antecedentes genéticos por exocruza sexual, usando métodos de cruzamiento convencionales. La progenie de estos cruzamientos mantiene las características de expresión transgénica de la transformante original. Esta estrategia se usa para asegurar una expresión genética confiable en una cantidad de variedades que están bien adaptadas a las condiciones de cultivo locales.

[0008] Es posible detectar la presencia de un transgen empleando un método conocido para la detección de ácidos nucleicos, tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o la hibridación de ADN usando sondas de ácidos nucleicos. Estos métodos de detección generalmente se centran en elementos genéticos de uso común, tales como promotores, terminadores, genes marcadores, etcétera. Como resultado, dichos métodos pueden no ser útiles para discriminar entre distintos eventos, particularmente aquellos producidos usando las mismas construcciones de ADN, a menos que se conozca la secuencia del ADN cromosómico adyacente al ADN insertado ("ADN circundante"). Un ensayo de PCR específico del evento se describe,

por ejemplo, en Taverniers et al. (J. Agric. Food Chem., 53: 3041-3052, 2005) en donde se muestra un sistema de rastreo específico del evento para las líneas transgénicas de maíz Bt11, Bt176, y GA21 y para el evento GT73 de canola. En este estudio, se diseñaron cebadores y sondas específicos del evento basado en las
5 secuencias de las uniones del genoma/transgen para cada evento. Los métodos de detección de ADN específico del evento transgénico de plantas también se describieron en las Patentes de los EE.UU. N°: 6.893.826; 6.825.400; 6.740.488; 6.733.974; 6.689.880; 6.900.014 y 6.818.807.

RESUMEN DE LA INVENCION

10 [0009] La presente invención se relaciona con la planta de soja transgénica denominada MON87701 cuyas semillas fueron depositadas con *American Type Culture Collection* (ATCC) con el N° Acceso PTA-8194. Otro aspecto de la invención comprende plantas de la progenie, o semillas, o partes de las plantas y de semillas, del evento de soja MON87701. Las partes de planta incluyen, pero en un sentido no
15 limitativo, polen, óvulos, flores, brotes, raíces, tallos, hojas, vainas, semillas y tejidos meristemáticos. La planta de soja MON87701 es particularmente resistente a insectos de familias de Lepidóptera tales como la oruga de las leguminosas (*Anticarsia gemmatalis*), falso medidor de la soja (*Pseudoplusia includens*), barrenador del brote de soja (*Epinotia aporema*), gata peluda amarilla (*Spilosoma virginica*), gusano de la
20 mazorca de maíz (*Helicoverpa zea*), oruga militar tardía (*Spodoptera frugiperda*) y falso medidor de girasol (*Rachiplusia nu*) entre otros, todos los cuales son plagas de insectos de importancia agronómica.

25 [0010] La presente invención también se relaciona con la construcción de ADN de la planta de soja MON87701 y con la detección de la región de inserción del transgen/genómica en MON87701 de soja y la progenie de la misma.

[0011] Las composiciones genéticas contenidas en el genoma de MON87701 y los productos de MON87701, tal como fécula, harina, productos alimenticios, suplementos de proteínas y biomásas, que permanecen en un campo de donde se ha cosechado plantas de soja correspondientes a MON87701 constituyen aspectos
5 adicionales de esta invención.

[0012] De acuerdo con un aspecto de la invención, se proveen composiciones y métodos para detectar la presencia de la región de inserción del transgen/genómica de una planta de soja novedosa denominada MON87701. Se proveen secuencias de ADN que comprenden al menos una secuencia de unión de MON87701 seleccionada
10 del grupo que consiste de la SEQ ID N°:1 ([A] correspondiente a las posiciones 5748 a 5767 de la SEQ ID N°:6 [F], Figura 2) y la SEQ ID N°:2 ([B] correspondiente a las posiciones 12.174 a 12.193 de la SEQ ID N°:6 [F], Figura 2) y complementos de las mismas. La secuencia de unión es una secuencia de nucleótidos que abarca el punto en el cual el ADN heterólogo insertado en el genoma está ligado al ADN genómico de
15 la célula de soja. La detección de esta secuencia en una muestra biológica que contiene ADN de soja es diagnóstica de la presencia del ADN del evento de soja MON87701 en dicha muestra. Un evento de soja MON87701 y una semilla de soja que comprende estas moléculas de ADN constituyen un aspecto de esta invención.

[0013] Las secuencias de ADN que comprenden la región de inserción del transgen/genómica novedosa, SEQ ID N°:3 [C], SEQ ID N°:4 [D] y SEQ ID N°:5 [E] o
20 SEQ ID N°:1 [A], SEQ ID N°:2 [B] y SEQ ID N°:5 [E] (véase la Figura 2) de evento de soja MON87701 también son aspectos de esta invención. La planta y la semilla de soja que comprenden estas moléculas también son aspectos de esta invención.

[0014] De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proveen dos moléculas
25 de ADN para su uso en un método de detección de ADN. Las moléculas de ADN son

de una longitud de nucleótidos contiguos suficiente de la SEQ ID N°:3 o la SEQ ID N°:5 o su complemento como para funcionar como cebadores o sondas de ADN diagnósticos del ADN extraído de la planta de soja MON87701 o de la progenie de la misma. Por ejemplo, la primera molécula de ADN comprende 11 o más polinucleótidos contiguos de cualquier porción de la región del transgen de la SEQ ID N°:3 o de la SEQ ID N°:5, o un complemento de la misma, y una segunda molécula de ADN de similar longitud de cualquier porción de una región de ADN genómico flanqueadora 5' de soja de la SEQ ID N°:3, o un complemento de la misma, donde estas moléculas de ADN, cuando se usan juntos, son de utilidad como cebadores de ADN en un método de amplificación de ADN que produce un amplicón. El amplicón producido usando estos cebadores de ADN en el método de amplificación de ADN sirve para diagnosticar la presencia del evento de soja MON87701 cuando el amplicón contiene a la SEQ ID N° 1. Todos los amplicones producidos con cebadores de ADN homólogos o complementarios de cualquier porción de la SEQ ID N° 3 y de la SEQ ID N° 5, y todos los amplicones que comprenden a la SEQ ID N° 1 constituyen un aspecto de la invención.

[0015] De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proveen dos moléculas de ADN para su uso en un método de detección de ADN. Las moléculas de ADN son de una longitud de nucleótidos contiguos suficiente de la SEQ ID N°:4 o la SEQ ID N°:5 o su complemento como para funcionar como cebadores o sondas de ADN diagnósticos del ADN extraído de la planta de soja MON87701 o de la progenie de la misma. Por ejemplo, la primera molécula de ADN comprende 11 o más polinucleótidos contiguos de cualquier porción de la región del transgen de la molécula de ADN de la SEQ ID N°:4 o de la SEQ ID N°:5, o un complemento de la misma, y una segunda molécula de ADN de similar longitud de cualquier porción de un ADN

genómico flanqueador 3' de soja de la SEQ ID N°:4 o un complemento de la misma, donde estas moléculas de ADN, cuando se usan juntas, son de utilidad como cebadores de ADN en un método de amplificación de ADN. El amplicón producido usando estos cebadores de ADN en el método de amplificación de ADN sirve para diagnosticar la presencia del evento de soja MON87701 cuando el amplicón contiene a la SEQ ID N° 2. Todos los amplicones producidos con cebadores de ADN homólogos o complementarios de cualquier porción de la SEQ ID N° 4 y de la SEQ ID N° 5, y todos los amplicones que comprenden a la SEQ ID N° 2 constituyen un aspecto de la invención.

- 10 [0016] De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proveen dos moléculas de ADN para su uso en un método de detección de ADN. Las moléculas de ADN son de una longitud de nucleótidos contiguos suficiente de la SEQ ID N°:6, o su complemento, como para funcionar como cebadores o sondas de ADN diagnósticos del ADN extraído de la planta de soja MON87701, o de la progenie de la misma.
- 15 Cuando se usan juntos como cebadores de ADN en un método de amplificación de ADN, se produce un amplicón que comprende a la SEQ ID N°:1 y/o a la SEQ ID N°:2. El amplicón producido es diagnóstico del evento de soja MON87701. Cualquiera de los amplicones producidos por cebadores de ADN homólogos o complementarios de cualquier porción de la SEQ ID N°:6, y cualquier amplicón que comprenda a la SEQ ID
- 20 N°:1 y/o a la SEQ ID N°:2 constituye un aspecto de la invención.

- [0017] De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proveen métodos para detectar la presencia de ADN que corresponde al evento de soja MON87701 en una muestra biológica. Dichos métodos comprenden: (a) poner la muestra biológica en contacto con un juego de cebadores que, cuando se usa en una reacción de
- 25 amplificación de ácido nucleico con ADN genómico del evento de soja MON87701,

produce un amplicón que es diagnóstico del evento de soja MON87701; (b) conducir una reacción de amplificación de ácidos nucleicos, produciendo así el amplicón; y (c) detectar el amplicón en donde dicho amplicón comprende a la SEQ ID N°:1 y/o a la SEQ ID N°:2, en donde la detección de dicho amplicón es indicativo de la presencia
5 del ADN correspondiente al evento de soja MON87701.

[0018] De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proveen métodos para detectar la presencia de ADN que corresponde al evento MON87701 en una muestra biológica, donde dichos métodos comprenden: (a) poner la muestra biológica en contacto con una sonda que se hibridiza bajo condiciones de hibridación severas con
10 el ADN genómico del evento de soja MON87701 y no se hibridiza bajo las condiciones de hibridación severas con una planta de soja control; (b) someter la muestra biológica y la sonda a condiciones de hibridación severas; y (c) detectar la hibridación de la sonda con el ADN del evento de soja MON87701, en donde la detección de dicha hibridación es indicativa de la presencia del ADN correspondiente en el evento
15 MON87701. Preferentemente, la sonda se selecciona del grupo que consiste de la SEQ ID N°:1, la SEQ ID N°:2 y un complemento de la misma.

[0019] Una muestra biológica puede comprender cualquier material orgánico derivado de células o tejido de soja, incluyendo tallos, raíces, hojas, flores o partes de flores, semillas o vainas de semillas, y semejantes, que contiene una cantidad
20 detectable de una secuencia de nucleótidos correspondiente a dicho material orgánico. Una muestra biológica derivada del evento de soja MON87701 comprende a las regiones de inserción del transgen/genoma de la presente invención, y en particular las que se muestran en el Listado de Secuencias como se muestra en la SEQ ID N°:1 hasta la SEQ ID N°:6, y los complementos de las mismas.

- [0020] Se proveen conjuntos de elementos para la detección del evento de soja MON87701 que emplean cebadores diseñados a partir de la SEQ ID N°:3, SEQ ID N°:4, SEQ ID N°:5 o SEQ ID N°:6. Un amplicón producido usando dicho conjunto de elementos es diagnóstico de MON87701 cuando el amplicón (1) contiene cualquiera de las secuencias de nucleótidos indicadas como SEQ ID N°:1 o SEQ ID N°:2 o (2) contiene ambas SEQ ID N°:1 y SEQ ID N°:2. El conjunto de elementos se puede proveer como un medio para detectar específicamente sólo el ADN del presente evento MON87701 en una muestra biológica, o el conjunto de elementos se puede proveer como un medio para detectar una multiplicidad de diferentes eventos transgénicos de cualquier número de diferentes muestras biológicas. En este último caso, es decir, un conjunto de elementos para detectar una multiplicidad de diferentes eventos transgénicos, el conjunto de elementos puede proveer sondas o cebadores en la forma de un microordenamiento, o cualquier tipo de ordenamiento que le provea al usuario de dicho conjunto de elementos la capacidad para distinguir diferencias entre muestras transgénicas y no transgénicas, la cigosidad de eventos transgénicos, y aún la presencia o ausencia de eventos, ya sean aprobadas o no aprobadas para su comercialización. La detección o calificación de la presencia o ausencia de determinados eventos usando dichos conjuntos de elementos puede ser mediante medios fluorométricos, colorimétricos, isotópicos o luminescentes.
- [0021] Otro aspecto de la invención es una planta o una semilla o un producto derivado de la planta o semilla de MON87701, en donde el ADN genómico, cuando se aísla de la planta, o semilla, o producto de soja, comprende una molécula de ADN que ha incorporado la SEQ ID N°:1 y/o la SEQ ID N°:2. Preferentemente, el ADN genómico comprende una molécula de ADN que consiste esencialmente de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°:3 entre las posiciones 1 a 5757

aproximadamente, la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°:5 entre las posiciones 1 a 6426 aproximadamente y la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°:4 entre las posiciones 379 a 2611 aproximadamente (cuyo contig se presenta como la SEQ ID N°:6).

5 [0022] Un aspecto adicional de la invención es una planta o semilla de soja o un producto derivado de la planta o semillas de MON87701, en donde el ADN genómico comprende una molécula de ADN que consiste esencialmente de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°:6 entre las posiciones 1 y 14.416 aproximadamente.

10 [0023] Otro aspecto de la invención es una planta, o semilla, de soja o un producto derivado de la planta o semilla de MON87701, en donde el ADN genómico, cuando se aísla de la planta, o semilla, o de un producto de soja produce un amplicón en un método de amplificación de ADN, en donde dicho amplicón comprende la SEQ ID N°:1 y/o la SEQ ID N°:2.

15 [0024] Otro aspecto de la invención es un método para producir una planta de soja resistente a insectos. Este método comprende: (a) cruzar la planta de soja de MON87701 con otra planta de soja; (b) obtener al menos una planta de la progenie derivada del cruzamiento de (a); y (c) seleccionar una progenie que comprende las secuencias de nucleótidos de la SEQ ID N°:1 y la SEQ ID N°:2. Dicha selección
20 incluye someter dicha al menos una planta de la progenie obtenida en (b) a una reacción de amplificación de ácidos nucleicos, en donde se selecciona la progenie que produce un amplicón que comprende al menos una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°:3, SEQ ID N°:4, SEQ ID N°:5 o SEQ ID N°:6, o someter dicha al menos una planta de la progenie obtenida en (b) a una reacción de hibridación de ácido
25 nucleico, en donde se selecciona la progenie que se hibridiza con una sonda que se

hibridiza bajo condiciones severas con una o más secuencias de ADN seleccionadas entre la SEQ ID N°:1 y la SEQ ID N°:2. La progenie así seleccionada es una planta de soja resistente a insectos.

[0025] Otro aspecto de la invención es un método para proteger una planta de soja contra una infestación de insectos. Este método comprende proveer en la dieta de una plaga de Lepidópteros de soja una cantidad eficaz como insecticida de célula(s) o tejido(s) de la planta de soja MON87701. La plaga de Lepidópteros se selecciona del grupo que consiste de *Anticarsia*, *Pseudoplusia*, *Epinotia*, *Spilosoma*, *Helicoverpa*, *Spodoptera* y *Rachiplusia*.

10 [0026] Otro aspecto de la invención es un producto comercial derivado de una planta, o una semilla, o la progenie de una semilla de una de soja MON87701. Dichos productos comerciales incluyen, pero en un sentido no limitativo, semillas de soja completas o procesadas, pienso de proteínas de animales, aceite vegetal, fécula, harina, plásticos no tóxicos, tintas de impresión, lubricantes, ceras, líquidos
15 hidráulicos, líquidos para transformadores eléctricos, solventes, productos cosméticos, productos para el cuidado del cabello, leche de soja, manteca de nuez de soja, natto, tempeh, concentrado de proteínas de soja, formas aisladas de proteínas de soja, concentrado texturizado de proteínas de soja, proteína hidrolizada de soja, coberturas batidas, aceite para cocinar, aceite para ensalada, manteca vegetal, lecitina, porotos
20 de soja enteros comestibles (crudos, tostados o como edamame), leche de soja, yogur de soja, queso de soja, tofu, yuba y biodiesel.

[0027] Otro aspecto de la invención es un método para determinar la cigosidad de la progenie del evento de soja MON87701. El método comprende (a) poner una muestra de soja en contacto con el par de cebadores SQ3443 (SEQ ID N°:12) y
25 SQ3445 (SEQ ID N°:13), que cuando se usa en una reacción de amplificación de

ácidos nucleicos con ADN genómico del evento de soja MON87701, produce un amplicón a partir de la combinación de cebadores SQ3443 y SQ3445 que es diagnóstico del evento de soja MON87701; (b) conducir una reacción de amplificación de ácidos nucleicos; (c) detectar un primer amplicón producido; (d) poner la misma muestra en contacto con el par de cebadores SQ3445 (SEQ ID N°:13) y SQ3446 (SEQ ID N°:14), que cuando se usa en una reacción de amplificación de ácidos nucleicos con ADN genómico de plantas de soja produce un amplicón a partir de la combinación de los cebadores SQ3445 y SQ3446 que es diagnóstico de los homólogos de ADN genómico de soja de tipo salvaje con la región genómica de soja de una inserción de transgen identificada como el evento de soja MON87701; (e) conducir una reacción de amplificación de ácidos nucleicos, y (f) detectar un segundo amplicón producido; en donde la detección de ambos amplicones indica que la muestra de soja es heterocigota para el ADN del evento de soja MON87701.

[0028] Otro aspecto de la invención es un método para determinar la cigosidad de la progenie del evento de soja MON87701 usando además sondas marcadas con fluoróforo(s). Dicho método comprende (a) poner una muestra de soja en contacto con el par de cebadores SQ3443 (SEQ ID N°:12), SQ3445 (SEQ ID N°:13), y la sonda PB1111 marcada con 6FAMTM (SEQ ID N°:15), que cuando se usa en una reacción de amplificación de ácidos nucleicos con ADN genómico del evento de soja MON87701, produce un amplicón que es diagnóstico del evento de soja MON87701, liberando una señal fluorescente a partir de la combinación de los cebadores SQ3443 y SQ3445 y la sonda PB1111 marcada con 6FAMTM; (b) conducir una reacción de amplificación de ácidos nucleicos; (c) detectar un primer amplicón producido; (d) poner la misma muestra en contacto con el par de cebadores SQ3445 (SEQ ID N°:13) y SQ3446 (SEQ ID N°:14) y una PB1112 marcada con VICTM (SEQ ID N°:16), que cuando se usa en

una reacción de amplificación de ácidos nucleicos con ADN genómico de las plantas de soja, produce un amplicón que es diagnóstico del ADN genómico de homólogos de soja de tipo salvaje con la región genómica de soja de una inserción de transgen identificada como el evento de soja MON87701, liberando una señal fluorescente a partir de la combinación de cebadores SQ3445 y SQ3446 y la sonda PB1112 marcada con VICTM; (e) conducir una reacción de amplificación de ácidos nucleicos; y (f) detectar un segundo amplicón producido; en donde la detección de ambos amplicones indica que la muestra de soja que comprende al ADN que es heterocigota para la inserción del transgen identificado como el evento de soja MON87701.

10 [0029] El aspecto anterior y otros aspectos de la invención resultarán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

 [0030] La Figura 1 ilustra el mapa del vector de transformación binario, pMON53570, que se usó para generar la planta de soja MON87701.

15 [0031] La Figura 2 ilustra la organización del inserto transgénico en el genoma del evento de soja MON87701: [A] corresponde a la posición relativa de la SEQ ID N°:1 que forma la unión entre la SEQ ID N°:3 y la SEQ ID N°:5; [B] corresponde a la posición relativa de la SEQ ID N°:2 que forma la unión entre la SEQ ID N°:4 y la SEQ ID N°:5; [C] corresponde a la posición relativa de la SEQ ID N°:3, la secuencia del
20 genoma de soja que flanquea al extremo 5' asignada/designada arbitrariamente del casete de expresión integrado en el genoma en el evento MON87701; [D] corresponde a la posición relativa de la SEQ ID N°:4, la secuencia del genoma de soja que flanquea al extremo 3' asignado/designado arbitrariamente del casete de expresión integrado en el genoma en el evento MON87701; [E] representa los diversos elementos que
25 comprenden a la SEQ ID N°:5 y es la secuencia del casete de expresión insertada en

el genoma del evento MON87701; y [F] representa la secuencia contigua que comprende, representado en la figura de izquierda a derecha, la SEQ ID N°:3, la SEQ ID N°:5 y la SEQ ID N°:4, en donde la SEQ ID N°:1 y la SEQ ID N°:2 se han incorporado como se indicó previamente, ya que estas secuencias están presentes en el genoma del evento MON87701.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

- [0032] SEQ ID N°:1: Una secuencia de 20 nucleótidos que representa la unión entre el ADN genómico de soja y el casete de expresión integrado (véase la Figura 2). Esta secuencia corresponde a las posiciones 5748 a 5767 de la SEQ ID N°:6.
- 10 Además, la SEQ ID N°:1 ([A]) es una secuencia de nucleótidos correspondiente a las posiciones 5748 a 5757 de la SEQ ID N°:3 ([C]) y el borde derecho integrado del casete de expresión TIC107 correspondiente a las posiciones 1 a 10 de la SEQ ID N°:5 ([E]). SEQ ID N°:1 también corresponde a las posiciones 5748 a 5767 de la secuencia flanqueadora 5', SEQ ID N°:3 ([C]).
- 15 [0033] SEQ ID N°:2: Una secuencia de 20 nucleótidos que representa la unión entre el casete de expresión integrado y el ADN genómico de soja (véase la Figura 2). Esta secuencia corresponde a las posiciones 12174 a 12193 de la SEQ ID N°:6 ([F]). Además, la SEQ ID N°:2 ([B]) es una secuencia de nucleótidos correspondiente a las posiciones 6417 a 6426 de la SEQ ID N°:5 ([E]) y la secuencia flanqueadora 3' correspondiente a las posiciones 379 a 388 de la SEQ ID N°:4 ([D]).
- 20 SEQ ID N°:2 ([B]) también corresponde a las posiciones 369 a 388 de la secuencia flanqueadora 3', SEQ ID N°:4 ([D]).
- [0034] SEQ ID N°:3 ([C] de la Figura 2): La secuencia flanqueadora 5' del ADN insertado de MON87701 hasta e incluyendo una región de inserción de ADN de transformación (ADN-T).
- 25

[0035] SEQ ID N°:4 ([D] de la Figura 2): La secuencia flanqueadora 3' del ADN insertado de MON87701 hasta e incluyendo una región de inserción de ADN-T.

[0036] SEQ ID N°:5 ([E] de la Figura 2): La secuencia del casete de expresión integrado TIC107, que incluye la secuencia del borde derecho e izquierdo después de la integración.

[0037] SEQ ID N°:6 ([F] de la Figura 2): Una secuencia de nucleótidos de 14.416 bp que representa el contig de la secuencia flanqueadora 5' del ADN insertado de MON87701 (SEQ ID N°:3), la secuencia del casete de expresión integrado (SEQ ID N°:5) y la secuencia flanqueadora 3' del ADN insertado de MON87701 (SEQ ID N°: 4).

10 [0038] SEQ ID N°:7: El casete de expresión TIC107 de pMON53570.

[0039] SEQ ID N°:8: La secuencia del ADN que codifica TIC107, incluyendo nucleótidos que codifican el péptido de tránsito a cloroplastos.

[0040] SEQ ID N°:9: Cebador SQ1135 usado para identificar los eventos MON87701. El cebador SQ1135 es complementario de la región 5' del casete de expresión insertado, próximo al borde derecho de la inserción de ADN-T correspondiente a las posiciones 5790 a 5766 de la SEQ ID N°:6 y a las posiciones 33 a 9 de la SEQ ID N°:5.

[0041] SEQ ID N°:10: Cebador SQ1136 usado para identificar los eventos MON87701. El cebador SQ1136 corresponde a una región 5' que flanquea al casete de expresión insertado próximo al borde derecho de la inserción de ADN-T correspondiente a las posiciones 5705 a 5732 de la SEQ ID N°:6 y a las posiciones 5705 a 5732 de la SEQ ID N°:3. Un amplicón de PCR de aproximadamente 86 bp producido usando la combinación de cebadores SQ1135 y SQ1136 es positivo para la presencia del evento MON87701.

[0042] SEQ ID N°:11: Sonda PB63 usado para identificar los eventos MON87701. Esta sonda es un oligonucleótido sintético marcado con 6FAMTM cuya secuencia es complementario de las posiciones 5763 a 5748 de la SEQ ID N°:6. La liberación de una señal fluorescente en una reacción de amplificación usando los
5 cebadores SQ1135 y SQ1136 en combinación con la sonda PB63 marcada con 6FAMTM es diagnóstico del evento MON87701.

[0043] SEQ ID N°:12: Cebador SQ3443 usado para determinar la cigosidad de los eventos MON87701. El cebador SQ3443 corresponde a una región del casete de expresión insertado, próximo al borde izquierdo del ADN-T, correspondiente a las
10 posiciones 12145 a 12168 de la SEQ ID N°:6 y a las posiciones 6388 a 6411 de la SEQ ID N°:5.

[0044] SEQ ID N°:13: Cebador SQ3445 usado para determinar la cigosidad de los eventos MON87701. El cebador SQ3445 es complementario de la región 3' que flanquea al casete de expresión insertado, próximo al ADN-T izquierdo
15 correspondiente a las posiciones 12215 a 12188 de la SEQ ID N°:6 y a las posiciones 410 a 383 de la SEQ ID N°:4. La detección de un amplicón de PCR usando los cebadores SQ3443 y SQ3445 con o sin la sonda PB1111 marcada con 6FAMTM es positiva para la presencia del evento MON87701 en un ensayo de cigosidad.

[0045] SEQ ID N°:14: Cebador SQ3446 usado para determinar la cigosidad de
20 los eventos MON87701. El cebador SQ3446 corresponde a una región del ADN genómico de tipo salvaje en donde se produjo la inserción del casete de expresión para MON87701. La detección de un amplicón de PCR usando los cebadores SQ3445 y SQ3446 con o sin la sonda PB1112 marcada con VICTM es positiva para la presencia del alelo de tipo salvaje.

[0046] SEQ ID N°:15: Sonda PB1111 usada para determinar la cigosidad de los eventos MON87701. Esta sonda es un oligonucleótido sintético marcado con 6FAM™ cuya secuencia corresponde a las posiciones 12172 a 12187 de la SEQ ID N°:6. Un amplicón de PCR producido usando los cebadores SQ3443 y SQ3445 causa la liberación de una señal fluorescente usando la sonda PB1111, que es positiva para la presencia del evento MON87701 en un ensayo de cigosidad para el evento MON87701.

[0047] SEQ ID N°:16: Sonda PB1112 usada para determinar la cigosidad de los eventos MON87701. Esta sonda es un oligonucleótido sintético marcado con VIC™ cuya secuencia corresponde a una región del ADN genómico de tipo salvaje inmediatamente después de la región de homología con el cebador SQ3446 en el punto de inserción del casete de expresión para el evento MON87701. Un amplicón de PCR producido usando los cebadores SQ3445 y SQ3446 causa la liberación de una señal fluorescente usando la sonda PB1112, que es positivo para la presencia del alelo de tipo salvaje en un ensayo de cigosidad para el evento MON87701. La heterocigosidad del evento MON87701 se demuestra mediante la detección fluorescente de dos amplicones diferentes usando las sondas PB1111 y PB1112 en una reacción de amplificación usando los cebadores SQ3443, SQ3445 y SQ3446.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

[0048] Las siguientes definiciones y métodos se proveen para definir mejor la presente invención y guiar a los especialistas en la técnica en la práctica de la presente invención. A menos que se indique lo contrario, los términos se interpretarán de acuerdo con el uso convencional que le dan los especialistas en la técnica relevante. Las definiciones de términos comunes de biología molecular también se pueden hallar en Rieger *et al.*, *Glossary of Genetics: Classical and Molecular*, 5ª

edición, Springer-Verlag: Nueva York, 1991; y Lewin, *Genes IX*, Oxford University Press: Nueva York, 1994).

[0049] Según se utiliza en la presente, el término “soja” significa *Glycine max* e incluye todas las variedades de plantas que se pueden criar con soja, incluyendo especies de soja salvaje así como las plantas que pertenecen *Glycine soja* que permiten el desarrollo entre especies.

[0050] Según se usa en la presente, el término “que comprende” denota “que incluye, pero en un sentido no limitativo”.

[0051] El término “glifosato” se refiere a N-fosfonometilglicina y sus sales. La N-fosfonometilglicina es un herbicida bien conocido que presenta actividad para un amplio espectro de especies vegetales.

[0052] Un “producto comercial” se refiere a cualquier producto compuesto de un material derivado de soja o aceite de soja y es vendido a los consumidores. La soja procesada constituye la mayor fuente de alimento de proteínas y aceite vegetal en todo el mundo. La planta de soja MON87701 se puede usar para elaborar los productos comerciales que típicamente se obtienen a partir de soja. Los porotos de soja de MON87701 se pueden procesar en fécula, harina, así como se pueden usar como una fuente de proteínas en alimentos para animales terrestres y acuáticos. Los porotos de soja y los aceites de soja de MON87701 se pueden usar en la elaboración de muchos productos diferentes, en un sentido no limitativo, plásticos no tóxicos, tintas de impresión, lubricantes, ceras, líquidos hidráulicos, líquidos para transformadores eléctricos, solventes, cosméticos y productos para el cuidado del cabello. Las sojas y los aceites de soja de MON87701 son adecuados para usar en diversos alimentos de soja elaborados a partir de soja entera, tales como leche de soja, manteca de soja, natto y tempeh, y alimentos de soja elaborados a partir de soja

procesada y aceite de soja, incluyendo harina de soja, harina de soja, concentrado de proteínas de soja, formas aisladas de proteínas de soja, concentrado de proteínas de soja texturizados, proteínas de soja hidrolizadas, coberturas batidas, aceite para cocinar, aceite para ensalada, manteca vegetal y lecitina. Los porotos de soja enteros
5 también son comestibles y se comercializan típicamente a los consumidores en su forma cruda, tostada o como edamamé. La leche de soja, que se produce típicamente mediante el remojo y la molienda de soja entera, se puede consumir sin otro procesamiento, se puede secar por aspersión o se puede procesar para elaborar yogur de soja, queso de soja, tofu o yuba.

10 [0053] Los aceites de soja de MON87701 se pueden usar para elaborar biodiesel. El uso de biodiesel en las máquinas diesel convencionales da como resultado una reducción sustancial de los agentes de polución, tal como sulfatos, monóxido de carbono y particulados, en comparación con el combustible diesel de petróleo, y el uso en transportes escolares puede reducir en gran medida la exposición
15 a los escapes tóxicos del diesel. El biodiesel se obtiene típicamente mediante extracción, filtración y refinamiento del aceite de soja para eliminar grasas y fosfolípidos libres, y luego transesterificación del aceite con metanol para formar metil ésteres de ácidos grasos (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N°: 5.891.203). Los metilésteres de soja resultantes se conocen comúnmente como
20 "biodiesel". El aceite derivado de MON87701 también se puede usar como combustible diesel sin la formación de metilésteres, tal como, por ejemplo, mediante la mezcla de acetales con el aceite (véase por ejemplo la Patente de los EE.UU. N°: 6.013.114). Las semillas de MON87701 usadas para elaborar dichos aceites se pueden identificar mediante los métodos de la presente invención. Se espera que el
25 aceite purificado de semillas del evento MON87701 o mezclas de semillas, de las

cuales parte o todos son MON87701, van a contener relativamente nada de ADN disponible para efectuar pruebas. Sin embargo, las semillas a partir de las cuales se extraen los aceites se pueden caracterizar con el método de la presente invención para identificar la presencia del evento MON87701 en la población de semillas usada para elaborar dichos aceites. Además, los desechos vegetales del proceso usado para elaborar dichos aceites se pueden usar en los métodos de la presente invención para identificar la presencia de los eventos MON87701 en una mezcla de semillas procesadas para obtener dichos aceites. Asimismo, los desechos vegetales planta que quedan después de elaborar un producto comercial, o que quedan después de cosechar las semillas de soja, se pueden caracterizar mediante los métodos de la presente invención para identificar los eventos MON87701 en los materiales crudos usados para elaborar dichos productos comerciales.

[0054] Un "evento" transgénico se produce por transformación de células vegetales con un ADN heterólogo, es decir, una construcción de ácidos nucleicos que incluye un transgen de interés, la regeneración de una población de plantas que resultan de la inserción del transgen en el genoma de la planta y la selección de una planta particular caracterizada por una inserción en un sitio particular del genoma. El término "evento" hace referencia al transformante original y la progenie del transformante que incluye el ADN heterólogo. El término "evento" también hace referencia a la progenie producida por un cruzamiento sexual entre la transformante y otra variedad que incluye el ADN heterólogo. Aún después de una retrocruza repetida con un progenitor recurrente, el ADN insertado y el ADN circundante del progenitor transformado están presentes en la progenie del cruzamiento, en la misma localización cromosómica. El término "evento" también hace referencia al ADN del transformante original que comprende el ADN insertado y la secuencia genómica circundante

inmediatamente adyacente al ADN insertado, de la que se esperaría que se transfiriera a la progenie que recibiera el ADN insertado que comprende el transgen de interés, como resultado de un cruzamiento sexual de una línea progenitora que incluyera el ADN insertado (por ejemplo, el transformante original y la progenie resultante de la autocruza) y una línea progenitora que no contuviera el ADN insertado. La presente invención se relaciona con ADN del evento MON87701, y con células vegetales, tejidos, semillas y productos procesados derivados de MON87701.

[0055] Se debe tener en cuenta que es posible cruzar dos plantas transgénicas diferentes con el fin de producir una descendencia con dos genes exógenos agregados, de segregación independiente. La autocruza de la progenie apropiada puede producir plantas que son homocigotas para ambas genes exógenos agregados. También se contempla la retrocruza con una planta progenitora y la exocruza con una planta no transgénica, al igual que la propagación vegetativa. Se pueden consultar descripciones de otros métodos de cultivo que se usan comúnmente para diferentes caracteres y cultivos en cualquiera de las diversas referencias, por ejemplo, Fehr, en *Breeding Methods for Cultivar Development*, Wilcox J. editor, Sociedad Americana de Agronomía, Madison WI (1987).

[0056] Según se utiliza en la presente cuando se hace referencia a una "molécula aislada de ADN", se considera que dicha molécula de ADN está presente, sola o en combinación con otras composiciones, pero no en su entorno natural. Por ejemplo, una secuencia codificante, una secuencia de intrón, una secuencia directriz no traducida, una secuencia promotora, una secuencia de terminación de la transcripción, y semejantes, que se observan naturalmente en el ADN de un genoma de soja, no se consideran aisladas del genoma de soja en tanto se encuentren dentro del genoma de soja. Sin embargo, cada uno de estos componentes, y las subpartes

de estos componentes, estarían “aislados” dentro del alcance de esta divulgación siempre y cuando las estructuras y los componentes no se encuentren dentro del genoma de soja. De manera similar, una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína insecticida de *Bacillus thuringiensis* o cualquier variante insecticida de dicha

5 proteína sería una secuencia de nucleótidos aislada siempre de la secuencia de nucleótidos no estuviera dentro del ADN de la bacteria *Bacillus thuringiensis* en donde la estructura se observó por primera vez. Se consideraría que una secuencia de nucleótidos artificial que codifica la misma secuencia de aminoácidos o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la que codifica la secuencia de nucleótidos

10 nativa de *B. thuringiensis* sería aislada a los efectos de esta divulgación. Para los fines de esta divulgación, cualquier secuencia de nucleótidos transgénica, es decir, la secuencia de nucleótidos del ADN insertado en el genoma de las células del evento MON87701 de soja sería considerada como una secuencia de nucleótidos aislada ya sea si está presente en el plásmido usado para transformar las células de soja a partir

15 de donde surgió el evento MON87701, en el genoma del evento MON87701, presente en cantidades detectables en tejidos, progenie, muestras biológicas o productos comerciales derivados del evento MON87701. La secuencia de nucleótidos, o cualquier fragmento derivado de la misma, se consideraría entonces aislada o aislable si es posible extraer la molécula de ADN de las células, o tejidos, o un homogenato de

20 una planta o semilla u órgano vegetal; o se puede producir como un amplicón a partir del ADN o ARN extraído de células, o tejidos, o de un homogenato de una planta o semilla u órgano vegetal, cualquiera de los cuales deriva de dichos materiales derivados del evento MON87701. De hecho, las secuencias de unión que se muestran en la SEQ ID N°:1 y la SEQ ID N°:2, y las secuencias de nucleótidos

25 derivadas del evento MON87701 que también contienen a estas secuencias de unión

se consideran aisladas o aislables, ya sea si estas secuencias están presentes en el genoma de las células del evento MON87701 o presentes en cantidades detectables en tejidos, progenie, muestras biológicas o productos comerciales derivados del evento MON87701.

- 5 [0057] Una "sonda" es un ácido nucleico aislado con el cual se puede unir o conectar una marca convencional o una molécula informante detectable, por ejemplo, un isótopo radiactivo, un ligando, un agente quimioluminiscente o una enzima. Dicha sonda es complementaria de una secuencia en del ácido nucleico blanco, en el caso de la presente invención, con una secuencia de ADN genómico del evento de soja
- 10 MON87701, ya sea de una planta de soja o de una muestra que incluya ADN del evento. Las sondas de acuerdo con la presente invención no solamente incluyen ácidos desoxirribonucleicos o ribonucleicos, sino también poliamidas y otros materiales de sondas que se unen específicamente a la secuencia de ADN blanco y dicha unión se puede usar para detectar la presencia de dicha secuencia de ADN blanco.
- 15 [0058] Los "cebadores" son sondas aisladas de ácidos nucleicos que se alinean con una cadena de ADN blanco complementaria, a través de una hibridación de ácidos nucleicos, para formar un híbrido entre el cebador y la secuencia de ADN blanco, y luego se extienden a lo largo del ADN blanco debido a la acción de una polimerasa, por ejemplo, una ADN polimerasa. Los pares de cebadores de la presente
- 20 invención hacen referencia a dos o más secuencias cebadoras diferentes que se emplean en la amplificación de una secuencia de ácido nucleico deseada, por ejemplo, por medio de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otros métodos de amplificación de ácidos nucleicos convencionales.
- 25 [0059] Las sondas y los cebadores tienen en general aproximadamente 11 nucleótidos o más de largo, preferentemente 18 nucleótidos o más, más

preferentemente 24 nucleótidos o más, y más preferentemente 30 nucleótidos o más. Dichas sondas y cebadores se hibridizan específicamente con una secuencia blanco bajo condiciones de hibridación de alta severidad. Preferentemente, las sondas y los cebadores de acuerdo con la presente invención tienen una similitud de secuencia completa con la secuencia blanco, aunque se pueden diseñar sondas que difieran de la secuencia blanco y retengan la capacidad de unirse a las secuencias blanco empleando métodos convencionales.

[0060] Los métodos para preparar y usar sondas y cebadores se describen, por ejemplo, en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición, vol. 1-3, editado por Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1989 (de aquí en adelante "Sambrook *et al.*, 1989"); *Current Protocols in Molecular Biology*, editado por Ausubel *et al.*, Greene Publishing y Wiley-Interscience, Nueva York, 1992 (con actualizaciones periódicas) (de aquí en adelante "Ausubel *et al.*, 1992"); e Innis *et al.*, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press: San Diego, 1990. Los pares de cebadores para PCR pueden derivar de una secuencia conocida, por ejemplo, usando programas para computadora destinadas para tal fin, tal como Primer (Versión 0.5, © 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA).

[0061] Los cebadores y las sondas basadas en las secuencias de ADN circundantes e insertadas que se describen en la presente se pueden usar para confirmar (y de ser necesario, corregir) las secuencias descritas de acuerdo con métodos convencionales, por ejemplo, clonando y secuenciando una vez más dichas secuencias.

[0062] Las sondas y los cebadores de ácidos nucleicos de la presente invención se hibridizan bajo condiciones severas con una secuencia de ADN blanco.

Es posible usar cualquier método de hibridación o amplificación de ácidos nucleicos convencional para identificar la presencia de ADN de un evento transgénico en una muestra. Las moléculas de ácidos nucleicos, o fragmentos de las mismas, se pueden hibridizar específicamente con otras moléculas de ácido nucleico bajo determinadas

5 circunstancias. Según se lo utiliza en la presente, se dice que dos moléculas de ácidos nucleicos son capaces de hibridarse específicamente entre sí, si las dos moléculas son capaces de formar una estructura antiparalela de ácido nucleico de cadena doble. Se dice que una secuencia de nucleótidos es el "complemento" de otra secuencia de nucleótidos si presenta una complementariedad completa. Según se lo

10 utiliza en la presente, se dice que las moléculas presentan una "complementariedad completa" cuando cada nucleótido de una de las secuencias es complementario de un nucleótido de la otra. Se dice que dos moléculas son "mínimamente complementarias" si se hibridan entre sí con suficiente estabilidad como para permanecer alineadas entre sí bajo al menos condiciones convencionales de "baja severidad". De manera

15 similar, se dice que las moléculas son "complementarias" si se pueden hibridar entre sí con suficiente estabilidad como para permanecer alineadas entre sí bajo al menos condiciones convencionales de "alta severidad". Las condiciones convencionales de severidad fueron descritas por Sambrook *et al.*, 1989, y por Haymes *et al.*, En: *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, DC (1985). Por lo

20 tanto, se permiten alejamientos de la complementariedad completa, siempre y cuando dichos alejamientos no anulen completamente la capacidad de las moléculas de formar una estructura de cadena doble. Para que una molécula de ácido nucleico sirva como cebador o sonda solamente debe ser suficientemente complementaria con una secuencia como para formar una estructura de cadena doble estable, bajo las

25 concentraciones particulares de solvente y sales empleadas.

[0063] Según se usa en la presente, una "secuencia sustancialmente homóloga" es una secuencia de ácido nucleico que se hibridizará específicamente con el complemento de la secuencia de ácido nucleico con la cual está siendo comparada bajo condiciones de gran severidad. Las condiciones de severidad apropiadas que
5 promoverán la hibridación de ADN, por ejemplo, cloruro de sodio 6,0X/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45°C, seguido por un lavado de SSC 2,0X a 50°C, son conocidas por los especialistas en la técnica, o se pueden consultar en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Por ejemplo, se puede seleccionar la concentración de sales en el paso de lavado entre
10 una severidad baja de aproximadamente SSC 2,0X a 50°C y una severidad alta de aproximadamente SSC 0,2X a 50°C. Además, se puede incrementar la temperatura en el paso de lavado desde condiciones de baja severidad a temperatura ambiente, aproximadamente 22°C, hasta condiciones de alta severidad a aproximadamente 65°C. Se puede variar tanto la temperatura como la concentración de sales, o se
15 puede mantener constante la temperatura o la concentración de sales mientras se altera la otra variable. En una realización preferida, un ácido nucleico de la presente invención se hibridizará específicamente con una o más de las moléculas de ácidos nucleicos indicadas en las SEQ ID N° 1 y 2, o complementos o fragmentos de cualquiera de ellas, bajo condiciones de severidad moderada, por ejemplo, a SSC
20 2,0X aproximadamente y 65°C aproximadamente. En una realización particularmente preferida, un ácido nucleico de la presente invención se hibridizará específicamente con una o más de las moléculas de ácido nucleico indicadas en la SEQ ID N° 1 y la SEQ ID N° 2, o complementos o fragmentos de cualquiera de ellas, bajo condiciones de gran severidad. En un aspecto de la presente invención, una molécula de ácido
25 nucleico marcadora preferida de la presente invención tiene la secuencia de ácido

nucleico detallada en la SEQ ID N° 1 y la SEQ ID N° 2, o complementos o fragmentos de cualquiera de ellas. En otro aspecto de la presente invención, una molécula de ácido nucleico marcador preferida de la presente invención comparte un 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 5 97%, 98%, 99% y 100% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico que se muestra en la SEQ ID N°:1 y la SEQ ID N°:2 o un complemento de la misma o fragmentos de cualquiera de ellas. En otro aspecto de la presente invención, una molécula de ácido nucleico marcadora preferida de la presente invención comparte 95% 96%, 97%, 98%, 99% y 100% de identidad de secuencia con la secuencia 10 detallada en la SEQ ID N° 1 y la SEQ ID N° 2, o complementos o fragmentos de cualquiera de ellas. La SEQ ID N° 1 y la SEQ ID N° 2 se pueden usar como marcadores en métodos de cruzamiento de plantas para identificar la progenie de cruzamientos genéticos, similares a los métodos descritos para el análisis de marcadores de repeticiones simples de secuencias de ADN, en "DNA markers: 15 Protocols, applications, and overviews" (1997) 173-185, Cregan, et al., editores, Wiley-Liss NY; que se incorpora en su totalidad en la presente a modo de referencia. La hibridación de la sonda con la molécula de ADN blanco se puede detectar empleando una cantidad de métodos conocidos por los especialistas en la técnica, que pueden incluir, en un sentido no limitativo, marcas fluorescentes, marcas radiactivas, marcas 20 basadas en anticuerpos y marcas quimioluminiscentes.

[0064] Con relación a la amplificación de una secuencia de ácido nucleico blanco (por ejemplo, por PCR) usando un par de cebadores de amplificación particular, las "condiciones severas" son condiciones que permiten que el par de cebadores se hibridice solamente con la secuencia de ácido nucleico blanco con la que se uniría un 25 cebador que tuviera la secuencia de tipo salvaje correspondiente (o su complemento),

y preferentemente producirá un único producto de amplificación, el amplicón, en una reacción de amplificación térmica de ADN.

[0065] El término “específica (para una secuencia blanco)” indica que una sonda o un cebador se hibridiza bajo condiciones de hibridación severas solamente
5 con la secuencia blanco en una muestra que contiene a la secuencia blanco.

[0066] Según se lo utiliza en la presente, un “ADN amplificado” o un “amplicón” hace referencia al producto de la amplificación de ácidos nucleicos de una secuencia de ácido nucleico blanco que forma parte de un templado de ácido nucleico. Por ejemplo, para determinar si la planta de soja que resulta de un cruzamiento sexual
10 contiene un evento transgénico de ADN genómico de la planta de soja de la presente invención, se puede someter al ADN extraído de una muestra de tejido de una planta de soja a un método de amplificación de ácidos nucleicos, usando un par de cebadores que incluye un cebador derivado de la secuencia circundante en el genoma de la planta, adyacente al sitio de inserción del ADN heterólogo insertado, y un
15 segundo cebador derivado del ADN heterólogo insertado, para producir un amplicón que sirve para diagnosticar la presencia del evento ADN. El amplicón tiene una longitud y una secuencia que también sirven para diagnosticar el evento. La longitud del amplicón puede variar entre la longitud combinada del par de cebadores más un par de bases nucleotídicas, preferentemente más aproximadamente cincuenta pares
20 de bases nucleotídicas, más preferentemente doscientos cincuenta pares de bases nucleotídicas aproximadamente y aún más preferentemente cuatrocientos cincuenta pares de bases nucleotídicas aproximadamente. Como alternativa, se puede derivar un par de cebadores de la secuencia circundante a ambos lados del ADN insertado, de modo de producir un amplicón que incluye la secuencia de nucleótidos insertada
25 completa. Uno de los miembros de un par de cebadores derivado de la secuencia

genómica de la planta puede estar localizado a una distancia de la secuencia de ADN insertada, y esta distancia puede variar entre un par de bases nucleotídicas y aproximadamente veinte mil pares de bases nucleotídicas. El uso del término "amplicón" excluye específicamente dímeros de cebadores que pueden formarse en la
5 reacción de amplificación térmica de ADN.

[0067] La amplificación de ácidos nucleicos se puede efectuar empleando cualquiera de los distintos métodos de amplificación de ácidos nucleicos conocidos en la técnica, incluyendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En la técnica se conoce una variedad de métodos de amplificación, y se los describe, entre otros, en
10 las Patentes de los EEUU N°: 4.683.195 y 4.683.202, y en *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, editado por Innis et al., Academic Press, San Diego, 1990. Se han desarrollado métodos de amplificación por PCR para amplificar hasta 22 kb de ADN genómico y hasta 42 kb de ADN de bacteriófago (Cheng et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 91:5695-5699, 1994). Estos métodos se pueden usar en la práctica de la
15 presente invención y también otros métodos conocidos en la técnica de amplificación de ADN. La secuencia del inserto de ADN heterólogo, o la secuencia circundante del evento de soja MON87701 en muestras de semillas depositadas como ATCC PTA-8194, se puede verificar (y corregir, de ser necesario) amplificando dichas secuencias del evento, usando cebadores derivados de las secuencias provistas en la presente, a
20 lo que sigue una secuenciación normal del ADN del amplicón de PCR o el ADN clonado.

[0068] El amplicón producido con estos métodos se puede detectar empleando una pluralidad de técnicas. Uno de dichos métodos es el análisis de fragmentos genéticos (Nikiforov, et al. *Nucleic Acid Res.* 22:4167-4175, 1994), donde se diseña un
25 oligonucleótido de ADN que se superpone con la secuencia de ADN genómico

circundante adyacente y la secuencia de ADN insertada. El oligonucleótido se inmoviliza en las cavidades de una placa de microtitulación. Después de la PCR de la región de interés (usando un cebador de la secuencia insertada y uno para la secuencia genómica circundante adyacente), se puede realizar la hibridación de un producto de PCR de cadena simple con el oligonucleótido inmovilizado, para luego utilizarlo como templado para una reacción de extensión de base única, usando una ADN polimerasa y ddNTP marcados específicos para la siguiente base esperada. La lectura se puede basar en fluorescencia o ELISA. Una señal indica la presencia de la secuencia insertada/circundante debido a la amplificación, la hibridación y la extensión de bases individuales exitosas.

[0069] Otro método es la técnica de pirosecuenciación, como la describe Winge (*Innov. Pharma. Tech.* 00:18-24, 2000). En este método se diseña un oligonucleótido que se superpone con el ADN genómico adyacente y el ADN insertado en la unión. El oligonucleótido se hibridiza con el producto de PCR de cadena simple de la región de interés (un cebador en la secuencia insertada y uno en la secuencia genómica circundante), y se incuba en presencia de ADN polimerasa, ATP, sulfurilasa, luciferasa, apirasa, adenosina 5' fosfosulfato y luciferina. Se agregan dNTP en forma individual, y la incorporación resulta en una señal luminosa que se mide. La señal luminosa indica la presencia del inserto transgénico/la secuencia circundante debido a la amplificación, la hibridación y la extensión de bases individuales exitosas.

[0070] La polarización por fluorescencia, como lo describen Chen, et al., (*Genome Res.* 9: 492-498, 1999), es un método que se puede usar para detectar el amplicón de la presente invención. Usando este método, se diseña un oligonucleótido que superpone el ADN genómico circundante y la unión del ADN insertado. El oligonucleótido se hibridiza con un producto de PCR de cadena simple de la región de

interés (un cebador en el ADN insertado y uno en la secuencia de ADN genómico circundante), y se incuba en presencia de una ADN polimerasa y ddNTP marcados con fluorescencia. La extensión de bases individuales resulta en la incorporación del ddNTP. La incorporación se puede medir como un cambio en la polarización usando un fluorómetro. Un cambio en la polarización indica la presencia del inserto transgénico/la secuencia debido a la amplificación, la hibridación y la extensión de bases individuales exitosas.

[0071] El método TAQMAN® (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) se describe como un método para detectar y cuantificar la presencia de una secuencia de ADN, y es posible comprenderlo por completo en las instrucciones provistas por el fabricante. Brevemente, se diseña una sonda de oligonucleótidos FRET que se superpone con el ADN genómico circundante y el ADN insertado en la unión. La sonda FRET y los cebadores de PCR (un cebador en la secuencia insertada y uno en la secuencia genómica circundante) se ciclan en presencia de una polimerasa termoestable y dNTP. La hibridación de la sonda FRET resulta en la separación y la liberación de la porción fluorescente de la porción de neutralización en la sonda FRET. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia insertada circundante/transgénica debido a la amplificación y la hibridación exitosas.

[0072] Se han descrito marcadores moleculares para su uso en la detección de secuencias, como lo describen Tyangi, *et al.* (Nature Biotech.14:303-308, 1996). Brevemente, se diseña una sonda de oligonucleótidos FRET que se superpone con el ADN genómico circundante y el ADN insertado en la unión. La estructura única de la sonda FRET da como resultado que contenga una estructura secundaria que mantiene las porciones fluorescentes y de neutralización muy próximas entre sí. La sonda FRET y los cebadores de PCR (un cebador en la secuencia insertada y uno en la

secuencia genómica circundante) se ciclan en presencia de una polimerasa termoestable y dNTP. Después de la amplificación exitosa por PCR, la hibridación de la sonda FRET con la secuencia blanco resulta en la remoción de la estructura secundaria de la sonda y la separación espacial de las porciones fluorescente y de neutralización que da como resultado una señal fluorescente. La señal fluorescente indica la presencia del transgen insertado/la secuencia circundante, merced a la amplificación y la hibridación exitosa.

[0073] En otros métodos descritos, tales como los métodos con microfluidos (Publicación de Patente de los EE.UU. N°: 2006068398, Patente de los EE.UU. N°: 6.544.734), ofrecen métodos y dispositivos para separar y amplificar muestras de ADN. Se usan colorantes ópticos para detectar y cuantificar moléculas de ADN específicas (WO/05017181). También es posible emplear dispositivos de nanotubos (WO/06024023), que comprenden un sensor electrónico para la detección de moléculas de ADN, o nanoesferas, que se unen a moléculas de ADN específicas, después de lo cual se puede realizar la detección.

[0074] Es posible desarrollar un conjunto de elementos de detección de ADN usando las composiciones descritas en la presente y los métodos bien conocidos en la técnica de la detección de ADN. Los conjuntos de elementos son útiles en la identificación de ADN del evento de soja MON87701 en una muestra, y se pueden aplicar a los métodos para cruzar plantas de soja que contienen ADN del evento apropiado. Los conjuntos de elementos pueden contener cebadores o sondas de ADN que son homólogos o complementarios de la SEQ ID N°:1 hasta la SEQ ID N°:6 o cebadores o sondas de ADN homólogos o complementarios de la secuencia de ADN de los elementos genéticos contenidos en el inserto transgénico. Estas secuencias de ADN se pueden usar como cebadores en reacciones de amplificación de ADN o como

sondas en un método de hibridación de ADN. Las secuencias del ADN genómico y los elementos genéticos transgénicos contenidos en el en genoma de soja MON87701 que se ilustran en la Figura 2, consisten de una porción de la región del borde derecho (RB) de *Agrobacterium tumefaciens*, una secuencia promotora derivada del gen de la subunidad pequeña de la ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa de *Arabidopsis* (en la presente denominada P-RbcS4 ubicada en las posiciones 155 a 1850 de la SEQ ID N°:5) ligada operativamente a una secuencia directriz no traducida derivada del gen de la subunidad pequeña de la ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa de *Arabidopsis* (en la presente denominada L-RbcS4 ubicada en las posiciones 1851 a 1877 de la SEQ ID N°:5) ligada operativamente a la secuencia codificante de la toxina de insecto, TIC107, compuesta por un péptido de tránsito a cloroplasto derivado de la secuencia del péptido de tránsito del gen de la subunidad pequeña de la ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa de *Arabidopsis* y una toxina de insecto derivada de Cry1Ac (en la presente denominada TIC107 ubicada en las posiciones 1889 a 2141 para el péptido de tránsito y en las posiciones 2142 a 5678 para la secuencia codificante de la toxina, respectivamente, en la SEQ ID N°:5) y está ligada operativamente a una región de terminación 3' derivada del gen de la proteína de almacenamiento 7S alfa' beta conglucina de *Glycine max* (en la presente denominada T-Sphas ubicada en las posiciones 5688 a 6126 de la SEQ ID N°:5) y una porción de la región del borde izquierdo (LB) de *Agrobacterium tumefaciens*. Las moléculas de ADN de utilidad como cebadores en los métodos de amplificación de ADN pueden derivar de las secuencias de los elementos genéticos del inserto transgénico contenido en el evento MON87701. Estas moléculas cebadoras se pueden usar como parte de un juego de cebadores que también incluye una molécula de cebador de ADN derivada del genoma que flanquea

al inserto transgénico del evento MON87701 presentado en la SEQ ID N°:3 de las bases 1 a 5747 y en la SEQ ID N°:4 de las bases 389 a 2611.

[0075] La planta de soja MON87701 se produjo con un proceso de transformación mediada por *Agrobacterium* de una línea de soja endocriada con la construcción plasmídica pMON53570 (como se ilustra en la Figura 1). El método de transformación usado es similar al que se describe en la Patente de los EE.UU. N°: 5.914.451. La construcción del plásmido pMON53570 contiene a los casetes de expresión vegetales ligados con los elementos genéticos reguladores necesarios para la expresión de la proteína TIC107 en las células de plantas de soja. Las células de soja fueron regeneradas en plantas de soja intactas y luego se seleccionaron plantas individuales de la población de plantas que demostrara integridad de los casetes de expresión vegetales y resistencia a los daños ocasionados por la alimentación de larvas de insectos Lepidópteros, así como a la pérdida del casete de selección de resistencia a glifosato no ligado. Una planta de soja que contiene en su genoma a los casetes de expresión vegetales ligados de pMON53570 es un aspecto de la presente invención.

[0076] El ADN de plásmido insertado en el genoma de planta de soja MON87701 fue caracterizado mediante análisis moleculares detallados. Estos análisis incluyeron: el número de insertos (número de sitios de integración en el genoma de soja), el número de copias (el número de copias de ADN-T en un locus) y la integridad de los casetes genéticos insertados. Se usaron sondas moleculares de ADN que incluyeron la región codificante intacta de TIC107 y sus elementos reguladores respectivos, los promotores, los intrones y las secuencias de poliadenilación de los casetes de expresión vegetales, y la región del esqueleto del plásmido pMON53570. Los datos muestran que MON87701 contiene una sola inserción de ADN-T con una

copia del casete de expresión TIC107. No se detectaron elementos adicionales del vector de transformación pMON53570, ligados o no ligados a casetes genéticos intactos, en el genoma de MON87701. Finalmente, se condujeron análisis de PCR inverso y de secuencia de ADN para determinar las uniones de insertos 5' y 3' al
5 genoma vegetal, confirmar la organización de los elementos en el inserto (Figura 2) y determinar la secuencia de ADN completa del inserto en plantas de soja MON87701 (SEQ ID N°:5).

[0077] La presente invención está dirigida a una molécula de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°:1, de la SEQ ID N°:2 o de
10 un complemento de las mismas. La molécula de ADN comprende preferentemente una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°:3, de la SEQ ID N°:4, de la SEQ ID N°:5, de la SEQ ID N°:6 o de un complemento de las mismas. Más preferentemente, la molécula de ADN consiste esencialmente de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°:3 entre las posiciones 1 y 5757, la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°:5
15 entre las posiciones 1 y 6426 y la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°:4 entre las posiciones 379 y 2611, o un complemento de las mismas, o esencialmente de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°:6 o un complemento de la misma.

[0078] La presente invención también está dirigida a una planta de soja, o partes de la misma, o semillas que comprenden a la molécula de ADN.

20 [0079] También se provee una composición derivada de la planta de soja, o partes de la misma, de la presente invención. Dicha composición comprende una cantidad detectable de la molécula de ADN y es un producto comercial seleccionado entre fécula de soja, harina de soja, concentrado de proteínas de soja, formas aisladas de proteínas de soja, concentrado texturizado de proteínas de soja, proteína
25 hidrolizada de soja, aceite de soja y coberturas batidas.

[0080] La presente invención está dirigida además a un método para producir una planta de soja resistente a insectos. Este método comprende: (a) cruzar la planta de soja de MON87701 con otra planta de soja; (b) obtener al menos una planta de la progenie derivada del cruzamiento de (a); y (c) seleccionar una progenie que comprende las secuencias de nucleótidos de la SEQ ID N°:1 y la SEQ ID N°:2. Dicha selección incluye someter dicha al menos una planta de la progenie obtenida en (b) a una reacción de amplificación de ácidos nucleicos, en donde se selecciona la progenie que produce un amplicón que comprende al menos una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°:3, SEQ ID N°:4, SEQ ID N°:5 o SEQ ID N°:6, o someter dicha al menos una planta de la progenie obtenida en (b) a una reacción de hibridación de ácido nucleico, en donde se selecciona la progenie que se hibridiza con una sonda que se hibridiza bajo condiciones severas con una o más secuencias de ADN seleccionadas entre la SEQ ID N°:1 y la SEQ ID N°:2. La progenie así seleccionada es una planta de soja resistente a insectos.

15 [0081] La presente invención está dirigida además a un método para proteger a una planta de soja contra una infestación por insectos. Este método comprende proveer en la dieta de una plaga de Lepidópteros de soja una cantidad eficaz como insecticida de célula(s) o tejido(s) de la planta de soja MON87701. La plaga de Lepidópteros se selecciona del grupo que consiste de *Anticarsia*, *Pseudoplusia*,
20 *Epinotia*, *Spilosoma*, *Helicoverpa*, *Spodoptera* y *Rachiplusia*.

[0082] Además, se provee en la presente invención un par de moléculas de ADN que comprende una primera molécula de ADN y una segunda molécula de ADN, en donde las moléculas de ADN son de una suficiente longitud de nucleótidos contiguos de la SEQ ID N°:3 o SEQ ID N°:5 o su complemento; o de la SEQ ID N°:4 o
25 SEQ ID N°:5 o su complemento; o de la SEQ ID N°:6 o su complemento; como para

funcionar como cebadores o sondas de ADN de diagnóstico para el ADN extraído de plantas de soja MON87701 o la progenie de las mismas.

[0083] Por ejemplo, la primera molécula de ADN del par comprende 11 o más nucleótidos contiguos de cualquier porción de la región del transgen de la SEQ ID N°:3 o de la SEQ ID N°:5, o un complemento de las mismas, y la segunda molécula de ADN del par comprende una longitud similar de una región de ADN genómico flanqueadora 5' de soja de la SEQ ID N°:3, o un complemento de la misma. Un ejemplo específico es que la primera molécula de ADN comprende la SEQ ID N°:9 y la segunda molécula de ADN comprende la SEQ ID N°:10.

10 [0084] Otro ejemplo es que la primera molécula de ADN del par comprende 11 o más nucleótidos contiguos de cualquier porción de la región del transgen de la SEQ ID N°:4 o de la SEQ ID N°:5, o un complemento de las mismas, y la segunda molécula de ADN del par comprende una longitud similar de una región de ADN genómico flanqueadora 3' de soja de la SEQ ID N°:4, o un complemento de la misma. Un
15 ejemplo específico es que la primera molécula de ADN comprende la SEQ ID N°:12 y la segunda molécula de ADN comprende la SEQ ID N°:13.

[0085] La presente invención está dirigida además a un método para detectar la presencia de una molécula de ADN seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID N°:3, la SEQ ID N°:4, la SEQ ID N°:5 y la SEQ ID N°:6 en una muestra biológica.
20 Este método comprende: (a) poner la muestra biológica en contacto con un par de cebadores de ADN que comprende moléculas de ADN cebadoras de suficiente longitud de nucleótidos contiguos de la SEQ ID N°:3 o su complemento, de la SEQ ID N°:4 o su complemento, de la SEQ ID N°:5 o su complemento, o de la SEQ ID N°:6 o su complemento, como para funcionar como cebadores o sondas de ADN de
25 diagnóstico para el ADN extraído de plantas de soja MON87701 o la progenie de las

mismas; (b) proveer las condiciones para una reacción de amplificación de ácidos nucleicos; (c) conducir la reacción de amplificación de ácidos nucleicos, produciendo así una molécula de ADN amplicón; y (d) detectar la molécula de ADN amplicón así producida. La detección de un amplicón que comprende al menos una de las SEQ ID N°:1, SEQ ID N°:2 y un complemento de las mismas es indicativa de la presencia de la molécula de ADN en la muestra biológica.

[0086] La muestra biológica puede comprender cualquier material orgánico derivado de células o tejido de soja, incluyendo tallos, raíces, hojas, flores o partes de flores, semillas o vainas de semillas, y semejantes, que contiene una cantidad detectable de una secuencia de nucleótidos correspondiente a dicho material orgánico. Una muestra biológica derivada del evento de soja MON87701 comprende a las regiones de inserción del transgen/genoma de la presente invención, y en particular las que se muestran en el Listado de secuencias como se muestra en la SEQ ID N°:1 hasta la SEQ ID N°:6, y los complementos de las mismas. Por ejemplo, la muestra biológica adecuada para la presente invención puede ser fécula de soja, harina de soja, concentrado de proteínas de soja, formas aisladas de proteínas de soja, concentrado texturizado de proteínas de soja, proteína hidrolizada de soja y coberturas batidas. La muestra que está siendo evaluada puede ser una muestra de ADN extraída de una planta de soja.

[0087] La presente invención está dirigida además a un método para detectar la presencia de una molécula de ADN seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID N°:3, la SEQ ID N°:4, la SEQ ID N°:5 y la SEQ ID N°:6 en una muestra biológica. Dicho método comprende: (a) poner la muestra biológica en contacto con una sonda de ADN que se hibridiza bajo condiciones severas con dicha molécula de ADN, y no se hibridiza bajo las condiciones severas con una muestra biológica que no contiene a

la molécula de ADN; (b) someter la muestra biológica y la sonda de ADN a condiciones de hibridación severas; y (c) detectar la hibridación de la sonda de ADN con la muestra biológica. La detección de la hibridación es indicativa de la presencia de la molécula de ADN en la muestra biológica. Por ejemplo, la muestra biológica que
5 está siendo evaluada puede ser una muestra de ADN extraída de una planta de soja.

[0088] La sonda usada en el método de detección anterior puede comprender a la SEQ ID N°:1 o a la SEQ ID N°:2 o un complemento de las mismas, o comprende a la SEQ ID N°:11 o a la SEQ ID N°:15. Los ejemplos específicos de dicha sonda incluyen la SEQ ID N°:11 o la SEQ ID N°:15. Dicha sonda se puede marcar además
10 con al menos un fluoróforo.

[0089] La presente invención está dirigida además a un conjunto de elementos para la detección de ADN que comprende: al menos una molécula de ADN de suficiente longitud de nucleótidos contiguos homólogos o complementarios de la SEQ ID N°:3, de la SEQ ID N°:4, de la SEQ ID N°:5 o de la SEQ ID N°:6 como para
15 funcionar como un cebador o sonda de ADN específico del evento de soja MON87701 y/o su progenie. Dicha al menos una molécula de ADN puede comprender a la SEQ ID N°:1, la SEQ ID N°:2 o un complemento de las mismas. Un ejemplo específico de dicha molécula de ADN es la SEQ ID N°:1, la SEQ ID N°:2 o un complemento de las mismas.

20 [0090] La presente invención está dirigida además a un método para determinar la cigosidad del ADN de un genoma de una planta de soja que comprende al evento de soja MON87701 en una muestra de soja. Este método comprende: (a) poner la muestra en contacto con un primer par de cebadores de la SEQ ID N°:12 y la SEQ ID N°:13, que, cuando se usan juntos en una reacción de amplificación de ácidos
25 nucleicos con el ADN del evento de soja MON87701, produce un amplicón que es

- diagnóstico del evento de soja MON87701; (b) conducir una reacción de amplificación de ácidos nucleicos; (c) detectar un primer amplicón así producido; (d) poner la muestra en contacto con un segundo par de cebadores de la SEQ ID N°:13 y de la SEQ ID N°:14, que cuando se usan juntos en una reacción de amplificación de ácidos nucleicos con un ADN genómico de soja distinto del ADN del evento de soja MON87701, produce un amplicón que es diagnóstico del ADN genómico de soja distintos del ADN del evento de soja MON87701; (e) conducir una reacción de amplificación de ácidos nucleicos; y (f) detectar un segundo amplicón así producido. La detección del amplicón que es diagnóstico del evento de soja MON87701 y del amplicón que es diagnóstico de ADN genómico de soja distinto del ADN del evento de soja MON87701 indica que la muestra es heterocigota para el ADN del evento de soja MON87701. Preferentemente, el primer par de cebadores se usa además junto con la sonda de la SEQ ID N°:15 y/o el segundo par de cebadores se usa además con la sonda de la SEQ ID N°:16.
- 15 [0091] Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar ejemplos de determinadas realizaciones preferidas de la invención. Los especialistas en la técnica podrán apreciar que los siguientes ejemplos representan enfoques que los inventores han establecido que funcionan bien en la práctica de la invención, por lo que es posible considerarlos ejemplos constitutivos de modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los especialistas comprenderán, a la luz de la presente divulgación, que es posible efectuar muchos cambios en las realizaciones específicas descritas y aún obtener resultados iguales o similares sin apartarse del espíritu y alcance de la invención.
- 20

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Transformación de soja A5547 con pMON53570 y selección del evento

[0092] La planta de soja transgénica MON87701 se generó mediante una transformación mediada por *Agrobacterium* de células de soja con un fragmento de ADN derivado de pMON53570 (Figura 1). El vector de transformación binario de plantas, pMON53570, contiene dos casetes de transformación de plantas o ADN-T. Cada casete está flanqueado por secuencias del borde derecho y del borde izquierdo por los extremos 5' y 3' del casete de transformación, respectivamente. Se usa un casete de expresión, presentado como la SEQ ID N°:7, para la expresión de una toxina de insecto. El casete de expresión está compuesto por una secuencia promotora y directriz derivada del gen de la subunidad pequeña de la ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa de *Arabidopsis* (P-RbcS4, Krebbers et al., (1988) *Plant Mol. Biol.* 11: 745-759) clonado directamente 5' con respecto de la secuencia codificante de la toxina de insecto, TIC107, que a su vez está clonada directamente 5' con respecto de una secuencia de terminación derivada del gen de la proteína de almacenamiento 7S alfa' beta conglucina de *Glycine max* (T-Sphas, véase por ejemplo, Schuler et al., (1982) *Nucleic Acids Res.* 10: 8225-8244). La secuencia codificante de la toxina de insecto, TIC107 se presenta como la SEQ ID N°:8. La secuencia de ácido nucleico presentada como la SEQ ID N°:8 es una secuencia sintética o artificial que codifica una toxina insecticida derivada de Cry1Ac (Patente de los EE.UU. N°: 5.880.275) con una secuencia codificante de un péptido de tránsito a cloroplasto derivado del gen de la subunidad pequeña de la ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa de *Arabidopsis* clonada directamente 5' con respecto de la secuencia codificante de la toxina de insecto.

[0093] El vector de transformación de plantas, pMON53570, se movilizó en la cepa desarmada ABI de *Agrobacterium tumefaciens* por electroporación y se

seleccionó sobre espectinomicina y cloranfenicol. Se transformaron explantes de la variedad de soja Asgrow A5547 con pMON53570 usando un método similar al que se describe en la Patente de los EE.UU. N°: 5.914.451. Los explantes de soja y *A. tumefaciens* inducida que contiene pMON53570 se mezclaron dentro de las 14 horas desde el momento de inicio de la germinación de las semillas y lesión por sonicación. Después de las lesiones, los explantes se colocaron en cultivo por dos a cinco días después de lo cual fueron transferidos a medio de selección que contiene glifosato para la selección de las células vegetales transformadas y antibióticos.

[0094] Se dejó que avanzaran la selección y formación de brotes transgénicos por un período de seis a ocho semanas. Se tomaron muestras de los brotes en desarrollo y se evaluaron mediante PCR por la presencia del casete TIC107 usando cebadores basados en la secuencia del casete de expresión TIC107. Se produjeron aproximadamente 100 eventos de transformación R0 y fueron evaluados por la presencia de una sola copia del casete transgénico. El análisis Southern usado como prueba de primera pasada empleó una endonucleasa de restricción que clivaba el casete de expresión una vez. Se insertó un solo sitio EcoRV justo dentro del borde derecho del casete de expresión. Esta enzima cliva con suficiente frecuencia el genoma de soja como para habitualmente disociar copias estrechamente ligadas del transgen en eventos de múltiples copias. También se condujo un análisis TAQMAN® para confirmar el número de copias en la generación R0 como se describirá más adelante. En cuarenta y dos de los eventos R0 se demostró la inserción de una sola copia del casete transgénico y se dejó que se autopolinizaran para generar la progenie F1. Se cultivaron 75 plantas F1 a partir de semillas de cada uno de los cuarenta y dos eventos R0 seleccionados. Se aplicó un aerosol no letal de glifosato a toda la progenie F1. Aquella progenie F1 en donde el casete de resistencia a glifosato no

estaba ligado, se volvió amarilla, demostrando así la ausencia del casete de selección con glifosato. Se identificaron 115 plantas como eventos no ligados. Se dejó que las 115 plantas F1 se recuperaran de la aplicación de glifosato y luego fueron evaluadas por su resistencia a la alimentación por insectos contra *Anticarsia gemmatilis* y *Pseudoplusia includens* en las etapas de crecimiento R1 y R7. Todos los eventos pasaron los criterios del bioensayo de menos de un 10% de alimentación contra *Anticarsia* y *Pseudoplusia*.

[0095] Se condujo un análisis Southern con las 115 plantas F1 seleccionadas para confirmar la presencia del casete de expresión y la ausencia de secuencias de nucleótidos indeseadas del vector de transformación. Se seleccionaron 12 eventos de la agrupación de 115 como los eventos más adecuados para una evaluación adicional en F1 del número de copias mediante análisis Southern. También se condujeron ensayos TAQMAN® y de cigosidad con los eventos F1 seleccionados como se describirá más adelante. Entre los 12 eventos F1 seleccionados, nueve demostraron mediante un análisis Southern preliminar la presencia de una sola copia del casete de expresión de la toxina. Varias de las líneas de los nueve eventos se llevaron a la generación F2 y F3 para ensayos adicionales con insectos y caracterización genética. Se seleccionó una sola planta F1 de cada línea para generar semillas para generaciones sucesivas.

[0096] En la generación F3, se condujo un análisis Southern más detallado con cuatro líneas seleccionadas para poder construir un mapa más detallado con enzimas de restricción del casete de expresión insertado. De los nueve eventos, un evento estaba completamente libre de esqueleto, del casete de resistencia a glifosato y del origen de replicación del plásmido. Se descubrió posteriormente que este evento tenía dos casetes de expresión de toxina de insecto no ligados y originó diversas líneas de

progenie. Se seleccionó una línea de progenie, también denominada evento MON87701, en la generación F3 basado en sus características de rendimiento y caracterización molecular. Se generó una secuencia flanqueadora para cada una de las líneas de la generación F3 seleccionada, usando PCR inversa como se describirá más adelante. La selección del evento R0 y el análisis de la cigosidad F1 se efectuaron como se describirá más adelante usando secuencias deducidas por medio de PCR inversa de las líneas transformadas y de tipo salvaje.

Ejemplo 2: Aislamiento de las secuencias flanqueadoras usando PCR inversa

[0097] Las secuencias que flanquean a la inserción de ADN-T en MON87701 fueron determinadas usando PCR inversa como se describe en Ochman et al., 1990 (*PCR Protocols: A guide to Methods and Applications* (Academic Press, Inc.)). Se aisló ADN genómico de las plantas de ambas líneas Asgrow A5547 y transgénica a partir de tejido cultivado bajo condiciones de invernadero para conducir análisis Southern y TAQMAN®. Se combinó aproximadamente 1 gramo de tejido foliar trifoliado joven con nitrógeno líquido y se molió hasta un polvo fino usando un mortero. El ADN se extrajo usando un conjunto de elementos para extracción de ADN vegetal Nucleon (RPN8511, Amersham, Piscataway, NJ) de acuerdo con el protocolo del proveedor. Después del paso de precipitación final, los ADN se volvieron a suspender en 0,5 ml de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM). Este método puede ser modificado por el especialista para extraer ADN de cualquier tejido de soja, incluyendo, en un sentido no limitativo, de semillas.

[0098] Se digirió una alícuota de ADN con endonucleasas de restricción seleccionadas sobre la base del análisis de restricción del ADN-T. Después de auto-ligación de los fragmentos de restricción, se condujo una PCR usando los cebadores diseñados a partir de la secuencia de ADN-T que amplificaría secuencias que se

extienden desde los extremos 5' y 3' del ADN-T. Los productos de la PCR se separaron mediante electroforesis sobre gel de agarosa y se purificaron usando un conjunto de elementos para purificación sobre gel QIAGEN (Qiagen, Valencia, CA). Los productos subsiguientes fueron secuenciados directamente usando protocolos de
5 secuenciación estándar. La secuencia flanqueadora 5' que se extiende dentro de la secuencia del borde derecho del ADN-T del casete de expresión TIC107 se presenta como la SEQ ID N°:3 ([C], véase la Figura 2). La secuencia flanqueadora 3' que se extiende dentro de la secuencia del borde izquierdo del ADN-T del casete de expresión TIC107 se presenta como la SEQ ID N°:4 ([D], véase la Figura 2). La
10 porción del ADN del casete de expresión TIC107 (SEQ ID N°:7) que estaba completamente integrada en el ADN genómico A5547 se presenta como la SEQ ID N°:5 ([E], véase la Figura 2).

[0099] Las secuencias aisladas se compararon con la secuencia de ADN-T para identificar la secuencia flanqueadora y el fragmento de ADN-T co-aislado. La
15 presencia del casete de expresión se confirmó mediante PCR con cebadores diseñados sobre la base de los datos de la secuencia flanqueadora deducida y la secuencia de ADN-T conocida. La secuencia A5547 de tipo salvaje correspondiente a la misma región en la cual se integró el ADN-T en la línea transformada se aisló usando cebadores diseñados a partir de las secuencias flanqueadoras en MON87701.
20 Las reacciones de PCR se condujeron usando el sistema de amplificación Elongase (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las secuencias flanqueadoras en MON87701 y la secuencia A5547 de tipo salvaje fueron analizadas contra numerosas bases de datos de nucleótidos y de proteínas. Esta información se usó para examinar la relación del transgen con el genoma de las plantas y para buscar la integridad del sitio de
25 inserción. La secuencia flanqueadora y las secuencias de tipo salvaje se usaron para

diseñar cebadores para los ensayos finales con TAQMAN® usados para identificar los eventos y determinar la cigosidad como se describe en el ejemplo 3.

Ejemplo 3: Ensayos con TAQMAN® y de cigosidad finales específicos del evento.

- 5 [00100] Los métodos usados para identificar al evento MON87701 en una muestra se describen en una PCR TAQMAN® final específica del evento para los cuales se describen ejemplos de condiciones en la Tabla 1 y Tabla 2. Los cebadores de ADN usados en el ensayo final son los cebadores SQ1135 (SEQ ID N°:9), SQ1136 (SEQ ID N°:10) y el cebador PB63 marcado con 6FAM™ (SEQ ID N°:11). El
- 10 compuesto 6FAM™ es un producto colorante fluorescente de Applied Biosystems (Foster City, CA) unido al cebador de ADN. Para las sondas TAQMAN® MGB, la actividad de la 5'-exonucleasa de la ADN polimerasa Taq corta la sonda desde el extremo 5', entre el fluoróforo y la porción de neutralización. Cuando se hibrida con la cadena de ADN blanco, el neutralizante y el fluoróforo se separan suficientemente
- 15 como para producir una señal fluorescente, liberando así la fluorescencia.

- [00101] Cuando se usan SQ1135 (SEQ ID N°:9) y SQ1136 (SEQ ID N°:10) en estos métodos de reacción con PB63 (SEQ ID N°:11) producen un amplicón de ADN que es diagnóstico del ADN del evento MON87701. Los controles para este análisis deberían incluir un control positivo de soja que contiene al ADN del evento
- 20 MON87701, un control negativo de soja no transgénica y un control negativo que no contiene ADN templado.

 [00102] Estos ensayos están optimizados para su uso con un sistema de PCR Applied Biosystems GeneAmp 9700 o Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700, o un termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient. Los especialistas en la

técnica conocen otros métodos y aparatos para producir amplicones que permiten identificar al ADN del evento MON87701.

[00103] Se procede con la amplificación del ADN en un dispositivo Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700, un termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient, un sistema de PCR Applied Biosystems GeneAmp 9700, o un ciclador térmico MJ Research DNA Engine PTC-225, usando los siguientes parámetros de ciclado. Cuando la PCR se lleva a cabo en los dispositivos Eppendorf Mastercycler Gradient o MJ Engine, el ciclador térmico se opera en la modalidad de calculado. Cuando la PCR se lleva a cabo en el dispositivo Perkin-Elmer 9700, el ciclador térmico se opera con una velocidad de rampa fijada en máximo.

Tabla 1. TAQMAN® PCR final específico del evento de la soja MON87701

Paso	Reactivo	Volumen	Comentarios
1	Agua de 18 megohm	Ajuste para un volumen final de 10 μ l	
2	Mezcla maestra universal 2X (Contiene dNTP, enzima y solución amortiguadora)	5,0 μ l	concentración final 1X de dNTP, enzima y solución amortiguadora
3	Mezcla de Cebador-1 y Cebador-2 (resuspendida en agua de 18 megohm hasta una concentración de 20 uM para cada cebador)	0,5 μ l	1.0 μ M de concentración final

	Ejemplo: En un tubo para microcentrífuga, se debe agregar lo siguiente para obtener 500 ul a una concentración final de 20 uM: 100 ul de Cebador SQ1135 (SEQ ID N°:9) a una concentración de 100 uM 100 ul de Cebador SQ1136 (SEQ ID N°:10) a una concentración de 100 uM 300 ul de agua de 18 megohm		
4	Sonda PB63 6-FAM™ MGB del evento (SEQ ID N°:11) (resuspendida en agua de 18 megohm hasta una concentración de 10 uM)	0,2 µl	0.2 µM de concentración final
5	ADN extraído (templado): 1. Muestras de hoja a analizar 2. Control negativo (ADN no transgénico) 3. Control de agua negativo	3,0 µl	

	(sin control de templado) 4. ADN GM_A19459A de control positivo		
--	--	--	--

Tabla 2. Condiciones del termociclador TAQMAN® final

Ciclo N°	Ajustes
1	50°C 2 minutos
1	95°C 10 minutos
10	95°C 15 segundos 64°C 1 minuto -1°C/ciclo
30	95°C 15 segundos 54°C 1 minuto
1	10°C Siempre

[00104] Se dejó que las plantas R0 que demuestran la presencia del casete de expresión TIC107 se desarrollaran hasta formar plantas completamente maduras. Las plantas R0 fueron evaluadas por la existencia de una unión entre el casete de expresión TIC107 y el casete de expresión de resistencia a glifosato usando análisis Southern con una enzima de restricción de ADN conocido por no cortarse en ambos casetes y la región entre cada casete en el plásmido, *PacI*. Se usaron sondas diseñadas sobre la base de las secuencias del casete de resistencia a glifosato, el casete TIC107 y el origen de replicación (O-Ec.oriV-RK2) que reside entre los dos casetes de expresión en pMON53570 para efectuar pruebas con sondas en transferencias Southern con el fin de determinar el ligamiento. Las plantas R0 también

fueron evaluadas por el número de copias del casete de expresión TIC107 usando una combinación de análisis Southern y TAQMAN® final. Se dejó que las plantas R0 que demuestran una relación no ligada entre el casete de resistencia a glifosato y el casete de expresión TIC107 se autopolinizaran y produjeran la progenie F1.

- 5 [00105] Las plantas F1 fueron evaluadas por la ausencia del casete de resistencia a glifosato debido a la segregación que tiene lugar en la población F1 debido a eventos transformados R0 autopolinizados no ligados. Se aplicó una dosis no letal de glifosato a los individuos F1. Aquellas plantas en donde el casete de resistencia se había perdido debido a la segregación mostraron daños debido a la
- 10 aplicación de glifosato. Se dejó que estas plantas se recuperaran y desarrollaran normalmente. Se condujeron ensayos de cigosidad para el casete de expresión TIC107 con plantas F1 usando un ensayo TAQMAN® final como se describirá más adelante.

- [00106] Los métodos usados para determinar la cigosidad para el evento
- 15 MON87701 en una muestra se describen en una TAQMAN PCR final de cigosidad específico del evento para la cual se describen ejemplos de condiciones en la Tabla 3 y en la Tabla 4. Los cebadores de ADN usados en el ensayo de cigosidad son los cebadores SQ3443 (SEQ ID N°:12), SQ3445 (SEQ ID N°:13), SQ3446 (SEQ ID N°:14), el cebador PB1111 marcado con 6FAM™ (SEQ ID N°:15) y el cebador PB1112
- 20 marcado con VIC™ (SEQ ID N°:16). Los compuestos 6FAM™ y VIC™ son productos colorantes fluorescentes de Applied Biosystems (Foster City, CA) unidos a los cebadores de ADN. Para las sondas TAQMAN MGB, la actividad de la 5'-exonucleasa de la ADN polimerasa Taq corta la sonda desde el extremo 5', entre el fluoróforo y la porción de neutralización. Cuando se hibridiza con la cadena de ADN blanco, en

neutralizante y el fluoróforo se separan suficientemente como para producir una señal fluorescente, liberando así la fluorescencia.

[00107] Cuando se usan SQ3443 (SEQ ID N°:12) y SQ3445 (SEQ ID N°:13) en estos métodos de reacción con PB1111 (SEQ ID N°:15) producen un amplicón de ADN que es diagnóstico del ADN del evento MON87701. Los controles para este análisis deberían incluir un control positivo de soja que contiene al ADN del evento MON87701, un control negativo de soja no transgénica y un control negativo que no contiene ADN templado.

[00108] Cuando se usan SQ3445 (SEQ ID N°:13) y SQ3446 (SEQ ID N°:14) en estos métodos de reacción con PB1112 (SEQ ID N°:16) producen un amplicón de ADN que es diagnóstico del alelo de tipo salvaje.

[00109] La heterocigosidad se determina mediante la presencia de ambos amplicones demostrada por liberación de la señal fluorescente de ambas sondas PB1111 y PB1112.

[00110] Estos ensayos están optimizados para su uso con un sistema de PCR Applied Biosystems GeneAmp 9700 o Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700, o un termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient. Los especialistas en la técnica conocen otros métodos y aparatos para producir amplicones que permiten identificar al ADN del evento MON87701.

[00111] Se procede con la amplificación del ADN en un dispositivo Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700, un termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient, un sistema de PCR Applied Biosystems GeneAmp 9700 o un ciclador térmico MJ Research DNA Engine PTC-225, usando los siguientes parámetros de ciclado. Cuando la PCR se lleva a cabo en los dispositivos Eppendorf Mastercycler Gradient o MJ Engine, el ciclador térmico se opera en la modalidad de calculado.

Cuando la PCR se lleva a cabo en el dispositivo Perkin-Elmer 9700, el ciclador térmico se opera con una velocidad de rampa fijada en máximo.

Tabla 3. TAQMAN® PCR final de cigosidad especifico del evento de la soja MON87701

Paso	Reactivo	Volumen	Comentarios
1	Agua de 18 megohm	Ajuste para un volumen final de 10 μ l	
2	Mezcla maestra universal 2X (Contiene dNTP, enzima y solución amortiguadora)	5,0 μ l	concentración final 1X de dNTP, enzima y solución amortiguadora
3	Mezcla de Cebador-1, Cebador-2 y Cebador-3 para cigosidad (resuspendida en agua de 18 megohm hasta una concentración de 20 μ M para cada cebador) Ejemplo: En un tubo para microcentrífuga, se debe agregar lo siguiente para obtener 500 μ l a una concentración final de 20	0,5 μ l	1.0 μ M de concentración final

	uM: 100 ul de Cebador SQ3443 (SEQ ID N°:12) a una concentración de 100 uM 100 ul de Cebador SQ3445 (SEQ ID N°:13) a una concentración de 100 uM 100 ul de Cebador SQ3446 (SEQ ID N°:14) a una concentración de 100 uM 200 ul de agua de 18 megohm		
4	Sonda PB1111 6-FAM™ MGB del evento (SEQ ID N°:15) (resuspendida en agua de 18 megohm hasta una concentración de 10 uM)	0,2 µl	0.2 µM de concentración final
5	Sonda PB1112 WT VIC™ MGB (SEQ ID N°:16) (resuspendida en agua de 18 megohm hasta una concentración de 10 uM)	0,2 µl	0.2 µM de concentración final

6	ADN extraído (templado): 1. Muestras de hoja a analizar 2. Control negativo (ADN no transgénico) 3. Control de agua negativo (sin control de templado) 4. ADN GM_A19459A homocigota de control positivo 5. ADN GM_A19459A hemicigota de control positivo	3,0 µl	
---	---	--------	--

Tabla 4. Condiciones del termociclador TAQMAN® final para cigosidad

Ciclo Nº	Ajustes
1	50°C 2 minutos
1	95°C 10 minutos
10	95°C 15 segundos 64°C 1 minuto -1°C/ciclo
30	95°C 15 segundos 54°C 1 minuto
1	10°C Siempre

[00112] Las plantas F1 del evento MON87701 también fueron evaluadas por su resistencia a *Anticarsia* y *Pseudoplusia*. La resistencia se definió como menos que un 10% de alimentación en las etapas de crecimiento R1 y R7. Se realizó también un análisis del número de copias con individuos F1 seleccionadas usando análisis Southern y una endonucleasa de restricción conocida por cortar en una sola ubicación dentro del casete de expresión TIC107, *EcoRV*. La expresión de la proteína TIC107 en la población F1 se confirmó usando tiras para pruebas de proteínas (EnviroLogix, conjunto de elementos QuickStix™ para Cry1Ac Cotton Leaf & Seed, N° Cat. AS 003, Portland, Maine 04103) según el protocolo del proveedor. Se condujo un análisis Southern con eventos seleccionados en la población F3 para confirmar la presencia de un solo inserto intacto de ADN-T. La selección de líneas final se basó en las características de rendimiento en pruebas de campo, expresión de proteínas y caracterización molecular.

Ejemplo 4: Identificación del evento MON87701 en cualquier evento de desarrollo MON87701

[00113] El siguiente ejemplo describe la manera en que se puede identificar el evento MON87701 en la progenie de cualquier evento de desarrollo usando soja MON87701.

[00114] Se usan pares de cebadores de ADN del evento para producir un amplicón diagnóstico del evento de soja MON87701. Un amplicón que es diagnóstico para MON87701 comprende al menos una secuencia de unión, SEQ ID N°:1 o SEQ ID N°:2 ([A] y [B], respectivamente, según se ilustra en la Figura 2). La SEQ ID N°:1 ([A] de la Figura 2) es una secuencia de nucleótidos correspondiente a la unión de la secuencia flanqueadora 5' (posiciones 5748 a 5757 de la SEQ ID N°:3 [C], véase la Figura 2) y el borde derecho integrado del casete de expresión TIC107 (posiciones 1 a

10 de la SEQ ID N°:5 [E], véase la Figura 2). La SEQ ID N°:1 también corresponde a las posiciones 5748 a 5767 de la secuencia flanqueadora 5', SEQ ID N°:3 ([C], véase la Figura 2). La SEQ ID N°:2 ([B], véase la Figura 2) es una secuencia de nucleótidos correspondiente a la unión del borde izquierdo integrado del casete de expresión TIC107 (posiciones 6417 a 6426 de la SEQ ID N°:5 [E], véase la Figura 2) y la secuencia flanqueadora 3' (posiciones 379 a 388 de la SEQ ID N°:4 [D], véase la Figura 2). La SEQ ID N°:2 ([C], véase la Figura 2) también corresponde a las posiciones 369 a 388 de la secuencia flanqueadora 3', SEQ ID N°:4 ([D], véase la Figura 2).

- 10 [00115] Los pares de cebadores del evento que producirán un amplicón de diagnóstico para MON87701 incluyen pares de cebadores basados en las secuencias flanqueadoras y el casete de expresión TIC107 insertado. Para adquirir un amplicón de diagnóstico en donde hay al menos 11 nucleótidos de la SEQ ID N°:1, se diseñaría un cebador directo basado en la SEQ ID N°:3 desde las bases 1 a 5747 y un cebador
- 15 inverso basado en el casete de expresión TIC107 insertado, la SEQ ID N°:5 entre las posiciones 10 a 6416. Para adquirir un amplicón de diagnóstico en donde hay al menos 11 nucleótidos de la SEQ ID N°:2, se diseñaría un cebador directo basado en el casete de expresión TIC107 insertado, la SEQ ID N°:5 entre las posiciones 10 y 6416 y un cebador inverso basado en la secuencia flanqueadora 3', la SEQ ID N°:4 desde
- 20 las bases 389 hasta 2611. Por motivos de orden práctico, se debería diseñar cebadores que producen amplicones de un rango de tamaño limitado, preferentemente entre 200 y 1000 bases. Los amplicones de menor tamaño en general se producen de manera más confiable en reacciones de PCR, permiten tiempos de ciclos más breves y se pueden separar y visualizar fácilmente sobre geles de agarosa o adaptar para su
- 25 uso en ensayos finales tipo TAQMAN®. Además, los amplicones producidos usando

dichos pares de cebadores se pueden clonar en vectores, propagar, aislar y secuenciar o se pueden secuenciar directamente con métodos bien establecidos en la técnica. Cualquier par de cebadores derivado de la combinación de la SEQ ID N°:3 y de la SEQ ID N°:5 o la combinación de la SEQ ID N°:4 y la SEQ ID N°:5 que sean de
5 utilidad en un método de amplificación de ADN para producir un amplicón de diagnóstico de MON87701 o la progenie del mismo constituye un aspecto de la presente invención. Cualquier molécula cebadora aislada de polinucleótidos de ADN individual que comprende al menos 11 nucleótidos contiguos de la SEQ ID N°:3, o su complemento, que sea de utilidad en un método de amplificación de ADN para
10 producir un amplicón de diagnóstico para MON87701, o la progenie del mismo, constituye un aspecto de la presente invención. Cualquier molécula cebadora aislada de polinucleótidos de ADN individual que comprende al menos 11 nucleótidos contiguos de la SEQ ID N°:4, o su complemento, que sea de utilidad en un método de amplificación de ADN para producir un amplicón de diagnóstico para MON87701, o la
15 progenie del mismo, constituye un aspecto de la presente invención. Cualquier molécula cebadora aislada de polinucleótidos de ADN individual que comprende al menos 11 nucleótidos contiguos de la SEQ ID N°:5, o su complemento, que sea de utilidad en un método de amplificación de ADN para producir un amplicón de diagnóstico para MON87701, o la progenie del mismo, constituye un aspecto de la
20 presente invención.

[00116] Un ejemplo de las condiciones de amplificación para este análisis se ilustra en la Tabla 5 y en la Tabla 6. Sin embargo, cualquier modificación de estos métodos o el uso de cebadores de ADN homólogos o complementarios de la SEQ ID N°:3 o de la SEQ ID N°:4 o secuencias de ADN de los elementos genéticos contenidos
25 en el inserto del transgen (SEQ ID N°:5) de MON87701 que produce un amplicón de

diagnóstico para MON87701, se encuentra dentro de la técnica. Un amplicón de diagnóstico comprende una molécula de ADN homóloga o complementaria de al menos un ADN de unión transgénica/genómica (SEQ ID N°:1 o SEQ ID N°:2), o una porción sustancial del mismo.

- 5 [00117] Un análisis de una muestra de tejido vegetal del evento MON87701 debería incluir un control de tejido positivo del evento MON87701, un control negativo de una planta de soja que no sea el evento MON87701, por ejemplo, pero en un sentido no limitativo A5547, y un control negativo que no contiene ADN genómico de soja. Un par de cebadores que amplificará una molécula de ADN endógena de soja
- 10 servirá como control interno para las condiciones de amplificación de ADN. Los especialistas en la técnica de métodos de amplificación de ADN pueden seleccionar secuencias cebadoras adicionales de la SEQ ID N°:3, SEQ ID N°:4 o SEQ ID N°:5, y las condiciones seleccionadas para la producción de un amplicón mediante los métodos que se muestran en la Tabla 5 y la Tabla 6 pueden diferir, pero dar como
- 15 resultado un amplicón de diagnóstico para el ADN del evento MON87701. El uso de estas secuencias cebadoras de ADN con modificaciones de los métodos de la Tabla 5 y la Tabla 6 se encuentran dentro del alcance de la invención. El amplicón producido por al menos una secuencia cebadora de ADN derivada de la SEQ ID N°:3, SEQ ID N°:4 o SEQ ID N°:5 que sea diagnóstico de MON87701 constituye un aspecto de la
- 20 invención.

- [00118] Los conjuntos de elementos para detección de ADN que contienen al menos un cebador de ADN derivado de la SEQ ID N°:3, SEQ ID N°:4 o SEQ ID N°:5, que cuando se usan en un método de amplificación de ADN, produce un amplicón de diagnóstico para MON87701 o su progenie, constituye un aspecto de la invención.
- 25 Una planta o semilla de soja, en donde su genoma producirá un amplicón diagnóstico

de MON87701 cuando se evalúa en un método de amplificación de ADN constituye un aspecto de la invención. El ensayo para el amplicón de MON87701 se puede efectuar usando un termociclador Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700 o Stratagene Robocycler o MJ Engine o Perkin-Elmer 9700 o Eppendorf Mastercycler 5 Gradient o cualquier otro sistema de amplificación que se puede usar para producir un amplicón diagnóstico de MON87701 según se muestra en la Tabla 6.

Tabla 5. Ensayo de PCR específico del evento MON87701 de soja

Paso	Reactivo	Volumen	Comentarios
1	Agua de 18 megohm	Ajuste para un volumen final de 10 μ l	
2	Mezcla maestra universal 2X (Contiene dNTP, enzima y solución amortiguadora)	5,0 μ l	concentración final 1X de dNTP, enzima y solución amortiguadora
3	Mezcla de Cebador-1 y Cebador-2 (resuspendida en agua de 18 megohm hasta una concentración de 20 uM para cada cebador) Ejemplo: En un tubo para microcentrífuga, se debe agregar lo siguiente para obtener 500 ul a una	0,5 μ l	1.0 μ M de concentración final

	concentración final de 20 uM: 100 ul de Cebador 1 a una concentración de 100 uM 100 ul de Cebador 2 a una concentración de 100 uM 300 ul de agua de 18 megohm		
5	ADN extraído (templado) 50 ng de ADN genómico: Muestras de hoja a analizar Control negativo (ADN no transgénico) Control de agua negativo (sin control de templado) ADN de control positivo MON88701	3,0 µl	

Tabla 6. Condiciones del termociclador para el evento MON87701 de soja

Ciclo Nº	Ajustes
1	50°C 2 minutos
1	95°C 10 minutos
10	95°C 15 segundos 64°C 1 minuto -1°C/ciclo

30	95°C	15 segundos
	54°C	1 minuto
1	10°C	Siempre

[00119] Se ha efectuado un depósito de semillas del evento de soja MON87701 divulgado precedentemente y descrito en las reivindicaciones, según el Tratado de Budapest con la *American Type Culture Collection* (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA. 20110. El número de acceso de ATCC es PTA-8194. El
5 depósito será mantenido en el depósito por un periodo de 30 años, o 5 años después de la petición más reciente, o por la vida sustentable de la patente, lo que tome más tiempo, y será reemplazado según necesidad durante dicho periodo.

[00120] Habiendo ilustrado y descrito los principios de la presente invención, resultará evidente para los especialistas en la técnica que es posible modificar la
10 disposición y el detalle de la invención sin apartarse de dichos principios. Se reivindican todas las modificaciones que se encuentran dentro del espíritu y alcance de las reivindicaciones adjuntas.

5 <110> Gao, Ai-Guo
Kolacz, Kathryn H.
MacRae, Ted C.
Miklos, John A.
Paradise, Mark S.
Perlak, Frederick J.
Toedebusch, Andrea S.

10 <120> PLANTAS Y SEMILLAS DE SOJA CORRESPONDIENTES AL EVENTO
TRANSGÉNICO MON87701 Y MÉTODOS DE DETECCIÓN DEL MISMO

15 <130> 11899.0261.NPUS01

<150> 60/988.349
<151> 2007-11-15

20 <160> 16

<170> PatentIn versión 3.5

25 <210> 1
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sintética

<220>
<221> caract_misc
<222> (1)..(20)
35 <223> secuencia de unión 5'

<400> 1
ttagtgtgtg tgtcaaacac 20

40 <210> 2
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sintética

<220>
<221> caract_misc
<222> (1)..(20)
5 <223> secuencia de unión 3'

<400> 2
atgaagccat caaaaagtag 20

10 <210> 3
<211> 6285
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Sintética

20 <220>
<221> caract_misc
<222> (1)..(6285)
<223> Secuencia flanqueadora 5' más unión

25 <400> 3
gggaaaatcc ctcctccata ttaagaacat aaaaatcaac aggaaaaata agttcaccaa 60
cccgaaccag cacatcctct atgaaacctg cggggaagc agcacttcta ttcccaaat 120
30 gaatcaccac atctgtagat tgcaaaggtc caagagataa agaattgaaa atggacagag 180
gggtgacact aactgatgct cctagatcta gcattgtatt atcaaattta ctgtcccaa 240
taatgcaagg tatacagaaa gtacctgggt ccttacattt ctcaggaatg taaggaacaa 300
35 atttacctat caatgctgac acatttctgc ccatgctaatt ccttcattg ccttgagct 360
tcctttgtg ggtgcacaac tccttagaa acttgacaca tcttgaatc tgcttgatgg 420
40 catctagcag aggtatgtc acctctactt tcctgaaggt ctccaagatc tcctttctg 480
ctcttccat ttttttgtt tggaattgct caaggttga atggaagagg gataagaggc 540
tgcggtaatg cagaattact agaagaaggt ccacctgcat gaaaatttt gttaggaagc 600
45 ttctctttt gtgcaactat ctatcctct tttcaggtg tagaatgaag cttgacaggt 660
tcaggtgcgg gtgctgtac tggaggaggt acttgaattt ggtgtcaga cctcaagggt 720

atgacactca catttttcgg attttgcaca gtttgaag gcaattgtc agaatttgg 780
 5 gaatgagctt ggttcaactg agtagccalc cgcccatct gatttgcag actctgaatg 840
 aaggctcttg tctctgctg aaattgcata ttctggatgg tcatttgcct cactaactct 900
 tctaaggaag gtaaggagg agtctcagtt gcttgtgtc ttgtgtga ctgtgtgt 960
 10 tgttctgct gatttggagg aggaacatat ggttgcctg gaccagcaac attctgaaa 1020
 ggagggacag actgtgttg ttgtgaagga ctgcccac tcattttgg atgatttctc 1080
 caacctggat tctatctgt gcttgaaga tcataattt ttgctattg ttgttttgc 1140
 15 tttgagggg gtctattata aatgttgc gcataagctt caggtgttc attgactcca 1200
 gattactgca aagaaggaca aagatctgta tggtagctg cagaagaaca tataccacag 1260
 20 actctgtaa caggtgcaa ttctgattc atggcaagct gatttactg gtgaccaag 1320
 gcatcaagtt ttccctcaag cttttattt tcatagata aagatgaatc tgtggccacc 1380
 tcatcgactc cttaaggac aatagcatca ttcttgac tgaattgtg ggagtggaa 1440
 25 gccttctct caatcaaat cctagcctca gcaggggtca tatcacgaag agtccacca 1500
 ctggcagcat caatcatact cctctccatg ttgtaagtc cctcatagaa atattgaaga 1560
 30 aggagtgtc cagaaatctg gtggtgagga cagctgcac acaatttct gaatttct 1620
 cagtactcat acaagctct tccactaagt tgctgatgc ctgaaattc ttctgatg 1680
 gcagtgtcc tagatgcagg gaagaattc tccaagaaca cctcttaag gtcattccag 1740
 35 ctgaaaatgg acctgggagc aaggtagtag agccaatctt ttgtactac ctccagagaa 1800
 tgaggaaaag ctttagaaa gatatgatc tctggacat cagggggctt catgttgaa 1860
 40 caaacaatat ggaactcctt aagatgctta tgaggatctt cacctagaag accatgaaac 1920
 ttgggtagca aatgtattg tccagtctg agaacatag gaacaccctc atcaggatat 1980
 tgaatgcaca agtttcata agtgaaatca ggtgcagcca tctcctaag agtctctca 2040
 45 cgaggtggag gtttagcat gtctcagta tgaaaattg tagttgaatg ctcaaatca 2100
 gaatattcag aatcaccaga aacaaaatac tcagaatgct caaatgctc aaatgcaca 2160

taatgattag gatgcacact atgcctaact aatctatgaa aggttctatc tatttcagga 2220
 tcgaaggggt ataaatcacc tagattgcc ctagtcatgc actatatgta gcaaataatg 2280
 5 ttttctcaaa caagcaccaa gggaggggtta aaactacaac tatagtcaaa tgatatccaa 2340
 atgagttgaa atttgtgag cagcaccta aatcatgaa aagatagcac aaaaaattc 2400
 10 aaacgaaaat tcaaagtcta actatgaaaa ctactaaga aaagtttaga aaaataggac 2460
 aataatactt gaaaaataaa aaaaaacata gtaaacagct gatttttoga gtttgggaga 2520
 ctccaaccgg ctaaaacggg ttgccacaat atgagaaaatt ttttctacc ccaaatgcc 2580
 15 caatatgaga aagttttgct aaaatctagt tcccaaaatt ttgtctctc tcaaattcaa 2640
 ccacaccaag tgctcctagt attttcaca caaaaaatca gccaaaaata acaactctaa 2700
 20 ctatcaaac aaaaacagct aattaaattg caaaatcagt cgtaattcc tagtactaa 2760
 tctctgtca cagcaaaaca ccaactgaat cagtcgcta acagtcgcta aacaggagac 2820
 gcaactgaaa tgcaaacag aatgctacac aaacaaaac aactaaacac tattatgaac 2880
 25 ctttggccca ctgtccccg acaacggcgc caaattgat cgaggtcgta cccgaatcaa 2940
 ataaacatta aaaatgcagt atctaggaag tgatcctagg tcatctcca acgagcaatg 3000
 30 gtcaaccaat gttcataata gatagtata aaacaataac gaattggggg gggggggtat 3060
 ttgttttgt aatttaaaca acaagcaaatt ttaattaga aaataacaga attaaaacat 3120
 gttattccc ctgattcat aagcaagtct ctatcctag gttaggagga ttatcccta 3180
 35 accagttcaa cacttaatc caaccctaaa taaattact aagcgaaaat taacataagg 3240
 ttgtcttat atgattaagc aacacataca ccaattaatc atgaacaaaa tcgatcatta 3300
 40 agcatcaaca taaattaagc gcaaagataa ttaatcaagc actaagcatg catggattag 3360
 tagcaacaaa tacagagtaa ttgtgggaga tgaaaaactg atcaatattc aatagtaata 3420
 acaaacctc aaagagagtt gtgcttgatt ctcaagagaa aacaacgctg gagacttagc 3480
 45 ctccattaa tcagtagaaa acgaaattgt agaaaacgaa ttatttcta tgaacaat 3540
 gtgatgaac agtaataaaa actggaattg caaaccccta aaattattct tctctcaaa 3600

aaaactccct aaactaaaac cctggtgcta ttatataggt cctcagcccc aaagcttaca 3660
 aatctatfff cagtcctaac ccataaacga aataaaataa aatctggaca agataagata 3720
 5 agatgggatg aaataaaatc tggacgaaat aaaatctgga taagataaga ttgataaaa 3780
 taaaattgtc tgctctttc aagtccaagc ccaattccgg attcaagccc aatttttat 3840
 10 aattctctg aaattaaatt aaaaatacga aattagtcaa gtaggcccc aaataaaaac 3900
 tgcataatta attgacaat taaggcta at cagtaattaa aatagtga aaaagggta 3960
 agaaatagga gaataatgac acatcaccca tatggggagc aattctaaaa tgcatttgag 4020
 15 ttcttaacc tgagacacag tgcagtagag tctcaagga ttattgtgc cttttat 4080
 atatgatggg gtcactacat tggcctgtc aaagaaactg aattggggg attaaagaaa 4140
 20 cacaaaataa aaacaaatga aactagttaa tagaaatgtt gcctatgtc tctggaaaa 4200
 agtccaacca ttgtgattt ggataaaatt catattacc actgtagct tgtcaatca 4260
 aacactagat ttggataaaa tctactcct agatatacct caagggataa tatgaccaac 4320
 25 attagtcat ttagaaagt aaagtggaca aattgagat ttattcctt aatgacatta 4380
 taaacatgta tttttccat gaccctttt caatgtaagt acaattatc ccttagtta 4440
 30 gatactctat atatgcatg tacgtagtg atgaaaacat acctaagtg ttgtgatgg 4500
 ttaagttgc gactacctt gatataaac tctcatctc caatctata caaaagatac 4560
 ttgtcactg gtacctgaac ctgtcagtt tgcagttgt agtttctt gaagccacac 4620
 35 gctgtatag taaccagaag ccaggaggga gtccttaag gcttaactc gtatttccg 4680
 tggaaagta ttttttct taaagaaaac agagatagtt taccaatgat aatatttct 4740
 40 tagccaaata ggaccatcat agaaaacaaa acctcttc taagtattt atgcaactac 4800
 atatttaggg tgcgttgat tcgctaaaaa ataagggtct agacaacaca aaaatattt 4860
 tccaacggtt gatttataa atggctgaga gacaataca aataaagaat gatgaactgg 4920
 45 acaaaaacct aaaaactgt aactactga atctatata acttttgt cagtgtctaa 4980
 aaaaagtaaa aatacaatat tattcctatt ttactttg attatctac acctcttc 5040

tactcatttg tticacttca cctctccagt gggcaccttg gttgtcggc gagagtcgta 5100

5 tggacttttg ttgttccctt ttgtctcatt atttcttct tticattgtt aatttattca 5160

aatgttccca tcatcatctt actccttctt gttatgtttt ttcttttg ccaactccaa 5220

cgaggccgtg ccgcgaccac catcatcacg accttatggc ggcctcacgc cgcaaggccc 5280

10 tgcacccagt ggcatcaggg gtcatgcctc ctcttaaag gtgtctctt ttgttatgt 5340

cgtcaaagtg ttgctaattc acctagaatt ttcaatgaa tccctttact tgtgggttag 5400

tctaggtcgc tctgcccgtt tccaacccta gcccacaaaa aaatgaaatg ggtaggaaag 5460

15 gcgggcctag ttgaattaa aataaatcat gctaagatat tgataactgc tatgtatagg 5520

tatattttg gattaaatta tataggaatt agtaatttt ctctcttatt tcttctttt 5580

20 tgttcaaata atiggaattc taacatcatt taagtttta tglagaaaat attaaaagtt 5640

gatgaattta tgatacttag tgaataatta gagtagaaaa ataaagtaaa gcccacaaaa 5700

gaaaattggt gatatgaaga tacatgctta gcatgcccc ggcacgctta gtgtgtgtgt 5760

25 caaacactga tagtttaaac tgaaggcggg aaacgacaat ctgatcccca tcaagcttga 5820

tatcgaattc ctgcagcccc ggggatccac tagttctaga gcggccgcgt taactgcagg 5880

30 tgcacggatc cccgggtacc gagctcgaat tcaaatttat tatgtgtttt ttctcgttg 5940

tgcagattgt gtattattct ttagtatta caagacttt agctaaaatt tgaaagaatt 6000

tactttaaga aaatcttaac atctgagata attcagcaa tagattatat ttctattac 6060

35 tctagcagta ttttgcaga tcaatcgcaa catatatggt tgttagaaaa aatgcactat 6120

atatatatat attattttt caattaaaag tgcattgatat ataatatata tatatatata 6180

40 tatgtgtgtg tgtatatggt caaagaaatt ctatacaaa tatacacgaa cacatatatt 6240

tgacaaaatc aaagtattac actaaacaat gagttggtgc atggc 6285

45 <210> 4
<211> 2611
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

5
<220>
<221> caract_misc
<222> (1)..(2611)
<223> Secuencia flanqueadora 3' más unión

10
<400> 4
gactgacaag atcgatctga agtctaaaca attctaagag gtatcatgta gcaatgtcct 60
gccacaatat tgaattgacc tgcagcccgg gcggccgcat cgatcgtgaa gtttctcatc 120
15 taagccccc a ttggacgtg aatgttagaca cgtcgaaata aagatttccg aattagaata 180
attgtttat tgcttgcgc tataaatagc acggatcgta attgtcgtt ttatcaaat 240
20 gtactttcat ttataataa cgctgcggac atctacatt ttgaattgaa aaaaaattgg 300
taattactct ttcttttct ccatattgac catcatactc attgctgac catgtagatt 360
tcccggacat gaagccatca aaaagtagga ctaatttagg aaagcaagct aattcaagaa 420
25 agtgaaggca cgcttagtgt gagacacgtg ttgagcgca ttactgccac tcactaacca 480
cacaagtgca ctcagtcga aggttgctta aaaattaagt tgattgcac ttataaaga 540
30 aggatagaga tgaaggaaaa aacacagaaa atacaattcc ttatagaaga caaaggctag 600
aagaagcaaa cgcaaacatt agaagtcatt ccttcctca attcccttt tcaattccc 660
ctttactaa atatttctct ctgcaatta taaagcctcc tatgacaatg acaagctaaa 720
35 ctctccttg ttgggaactt atcagtcac tgctctaat ataatttctc ttctatcta 780
ttatgaatat tcactacaag aaatatgccc attgcccagg gattttgac agggacatta 840
40 acccctggca aatttccag ggactaagcc aaggaaaccc ctggcaaat gacatttgag 900
aaggctggga ccactacat ttacacaggg gttgtccct cgcaaaaata caaagcctt 960
ggcaaaaaaa agagcgggaa atgaatttta aaacagcatg tigtttcac acagccaaac 1020
45 acacgggtat gccctgttt tctgtaaagc tgacggaatc ttccataag tcaacacgac 1080
atgaccatgc actgcaaaaa gctgtgcggc ccagacgtga caggggtgtt acccctcgga 1140

aatggcttgc agcccctggc aaaaaggaat ccctgcttc ctactacac cgttctgctc 1200
 atatagctga agctaggagg ttagccttg actctgtgt tttgcgaggg gcattccgtg 1260
 5 agtattccc tgggttttt tacactatat agccaaaccg cgtgtttatc ctcatgctca 1320
 gtgtgtgtt ttgaaactt agaaaaattt tcggtttcca ttccatcct caccagtca 1380
 10 tttcagtc attatcattc agttcataca ctgttctat aatttggtaa cactctttc 1440
 acttattata ttttctgtt ttatttgtt actactatt aacataaata tttttattg 1500
 tatcagtgct caaatttgc tctcctgct gctcctgct ctctgaatt gtctcttaa 1560
 15 gcttcaacaa gtagtaatt ttctactta taattttaga tatatgatgt ttatatatat 1620
 gatgtataa tttgcatga tctgtcaaag aaaatatgat gtttctact gcatgatgtg 1680
 20 ttataatata tgatgttat atatatctg aatttgttg ttaataaaac tgtttaatta 1740
 gaaactgtat aattttttg ttaataaaa ctgttaatt ttgcatgac tgtttaataa 1800
 aactgttat ataaaactgt ttatatataa tatatgatgt taacattttt aaaactgtt 1860
 25 ataaaacagt ttagttagaa aaaatgttaa aactagagaa aaaaatgtat aataaaactg 1920
 tgcagtaca gcagcgcgtc agaaaagtgt gcagatgct cagtgagaag acaggggcta 1980
 30 agacagggat ttgacaggg aatttggcca gggatttgc cagggtcagc ccctcgtttt 2040
 ttgccaggg gtgaaatccc tggcaaactg atttgcgatg ggcgttttc ccagggattc 2100
 agcccctggc aaaatccctg gcaaacgtcc atttccagg gcttttgtt ctttccag 2160
 35 ggaatccgcc cctggcaaac gagctgttt ctgtagtga ttactttgc attagtttt 2220
 cctgtattta attttattgt ttatggctg attaccatt tgcattataa gtttagggg 2280
 40 tagcgtgaa aagtgttatt ctctaataga actggaaaag agtatataa taacttcatc 2340
 actagggata cattgattt atttagctta ttatatatct ctattataa tgaatttaa 2400
 ctattttatc tctgcaaagt gatttgggag agaagataga taagtagac tcttcactc 2460
 45 gaggctgagt acaacctga gagagcccag aaggctgtga acgccctctt tacctccacc 2520
 aatcagcttg gctgaaaac taacgttact gactatcaca ttgaccaagt gtccaactg 2580

gtcacctacc ttagcgatga gttctgaagg g 2611

- 5 <210> 5
- <211> 6426
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Sintética

- <220>
- 15 <221> caract_misc
- <222> (1)..(6426)
- <223> Secuencia de ADN insertada

<400> 5

20 tgtcaaacac tgatagtta aactgaaggc gggaaacgac aatctgatcc ccatcaagct 60

tgatatcgaa ttctgcagc ccgggggatc cactagttct agagcggccg cgtaactgc 120

aggtcgacgg atccccgggt accgagctcg aattcaaatt tattatgtgt tttttccg 180

25 tggtcgagat tgtgtattat tcttagtta ttacaagact ttagctaaa attgaaaga 240

atttacttta agaaaatctt aacatctgag ataattcag caatagatta tttttcat 300

30 tactctagca gtattttgc agatcaatcg caacatatat gggtgttaga aaaaatgcac 360

tatatatata tatattatt ttcaattaa aagtgcatga tatataatat atatatatat 420

atatatgtgt gtgtgtatat ggtcaaagaa attcttatac aaatatacac gaacacatat 480

35 attgacaaa atcaaagtat tacactaaac aatgagtgg tgcattggcca aaacaaatat 540

gtagattaaa aattccagcc tcaaaaaaaaa aatccaagtg ttgtaaagca ttatatatat 600

40 atagtagatc ccaaatttt gtacaattcc acactgatcg aattttttaa gtgaatatc 660

tgacgtagga ttttttaat gtcttacctg accatttact aataacattc atacgtttc 720

attgaaata tctctataa ttatattgaa ttggcacat aataagaaac ctaattggtg 780

45 atttatttta ctagttaaatt tctggtgatg ggctttctac tagaaagctc tcggaaaatc 840

ttggacaaa tccatattcc atgacttga ttgtaaccc tattagttt cacaacata 900

ctatcaatat cattgcaacg gaaaaggtag aagtaaaaca ttcaatccga tagggaagt 960
 atgtaggagg ttggaagac aggccagaa agagatttat ctgacttgtt ttgttatag 1020
 5 ttccaatgt tcataaagga agatggagac ttgagaagtt ttttggac ttgtttagc 1080
 ttgttgggc gttttttt ttgatcaata actttgttg gcttatgatt tgtaatat 1140
 10 tctgtgactc tttagttat ttgacgtgc taactttgtt gggcttatga ctgttgtaa 1200
 catattgtaa cagatgacti gatgtgcgac taactttac acattaaaca tagttctgtt 1260
 ttgtgaaagt tctattttc attttttt gaattgtata ttttttcta tattataat 1320
 15 tctagtaaaa ggcaaatftt gcttttaaat gaaaaaata tatattccac agttcacct 1380
 aatcttatgc atttagcagt acaaatcaa aaatttcca tttttattca tgaatcatal 1440
 20 cattatata taactaaatc caaggtaaaa aaaaggtag aaagctctat agtaagtaaa 1500
 atataaatc ccataagga aaggccaag tccaccaggc aagtaaatg agcaagcacc 1560
 actccaccat cacacaattt cactcataga taagalaag attcatggaa ttacttcca 1620
 25 cgtggcatta ttccagcgtt tcaagccgat aagggttca acactctcc ttaggccttt 1680
 gtggccgtta ccaagtaaaa ttaacctac acatatccac actcaaatc caacggtgta 1740
 30 gatcctagtc cactgaatc tcatgtatcc tagacctcc gatcactcca aagcttgtc 1800
 tcattgtgt tatattata tatagatgac caagcacta gaccaaact cagtcacaca 1860
 aagagtaaag aagaacaatg gcttctcta tgctctctc cgctactatg gttgcctctc 1920
 35 cggctcaggc cactatggtc gctccttca acggactta gtcctccgt gcctcccag 1980
 ccacccgcaa ggctaacaac gacattactt ccatcacaag caacggcgga agagttaact 2040
 40 gcatgcaggt gtggcctccg attgaaaga agaagttga gactctctt taccttctg 2100
 acctaccga ttccggtggt cgcgtcaact gcatgcaggc catggacaac aaccaaaca 2160
 tcaacgaatg cattccatc aactgctga gtaaccaga agtgaagta ctggtggag 2220
 45 aacgatga aaccggttac actccatcg acatctctt gtcctgaca cagttctgc 2280
 tcagcgagtt cgtgccaggt gctgggtcg ttctcggact agttgacatc atctgggta 2340

tctttggtcc atctcaatgg gatgcattcc tggtgcaa atgagcagttg atcaaccaga 2400
 5 ggatcgaaga gttcgccagg aaccaggcca tctctaggtt ggaaggattg agcaatctct 2460
 accaaatcta tgcagagagc ttcagagagt gggaagccga tctactaac ccagctctcc 2520
 gcgaggaaat gcgtattcaa ttcaacgaca tgaacagcgc ctgaccaca gctatcccat 2580
 10 tgttcgcagt ccagaactac caagttctc tctgtccgt gtacgttcaa gcagctaac 2640
 ttacctcag cgtgcttga gacgttagcg tgtttggca aagggtggga ttcgatgctg 2700
 caaccatcaa tagccgttac aacgacctta ctaggctgat tggaaactac accgaccagc 2760
 15 ctgttcgttg gtacaacact ggcttgagc gtgtctggg tctgtattct agagattgga 2820
 ttagatacaa ccagttcagg agagaattga cctcacagt ttggacatt gtgtctctct 2880
 20 tccgaacta tgactccaga acctacccta tccgtacagt gtcccaact accagagaaa 2940
 tctatactaa ccagttctt gagaacttcg acggtagctt ccgtggttct gcccaaggta 3000
 tcgaaggctc catcaggagc ccacacttga tggacatctt gaacagcata actatctaca 3060
 25 ccgatgctca cagaggagag tattactggt ctggacacca gatcatggcc tctccagttg 3120
 gattcagcgg gcccgagttt accttctc tctatggaac tatgggaaac gccgctccac 3180
 30 aacaacgtat cgttgcctaa ctaggtcagg gtgtctacag aacctgtct tccacctgt 3240
 acagaagacc ctcaatc ggtatcaaca accagcaact ttccgttctt gacggaacag 3300
 agttcgcta tggaaacctt tctaacttc catccgtgt ttacagaaag agcggaaccg 3360
 35 ttgattcctt ggacgaaatc ccaccacaga acaacaatgt gccaccagg caaggattct 3420
 cccacaggtt gagccacgtg tccatgttcc gtccggatt cagcaacagt tccgtgagca 3480
 40 tcatcagagc tctatgttc tctggatac atcgtagtgc tgagtcaac aacatcatcg 3540
 catccgatag tattactcaa atccctgcag tgaagggaaa cttctcttc aacggttctg 3600
 tcatttcagg accaggattc actggtggag acctcgttag actcaacagc agtggaaata 3660
 45 acattcagaa tagagggtat atgaagttc caattcactt cccatccaca tctaccagat 3720
 atagagttcg tgtgaggtat gcttctgtga cccctattca cctcaacgtt aattggggtg 3780

attcatccat ctctccaat acagttccag ctacagctac ctcttggat aatctccaat 3840
 ccagcgattt cggttacttt gaaagtgcc aatctttac atcttactc ggtaacatcg 3900
 5 tgggtgttag aaactttagt gggactgcag gagtgttat cgacagattc gatttattc 3960
 cagttactgc aacactcgag gctgagtaca acctgagag agcccagaag gctgtgaacg 4020
 10 cctctttac ctccaccaat cagcttggct tgaaaactaa cgttactgac tatcacattg 4080
 accaagtgtc caacttggc acctaccta gcgatgagtt ctgcctcgac gagaagcgtg 4140
 aactctccga gaaagttaa cacgccaagc gtctcagcga cgagaggaat ctctgcaag 4200
 15 actccaactt caaagacatc aacaggcagc cagaacgtgg ttgggggtgga agcaccggga 4260
 tcaccatcca aggaggcgac gatgtgttca aggagaacta cgtcacctc tccggaactt 4320
 20 tcgacgagtg ctacctacc tactgtacc agaagatcga tgagtcaaa ctcaaagcct 4380
 tcaccaggta tcaacttaga ggctacatcg aagacagcca agacctgaa atctactcga 4440
 tcagggtaca tgccaagcac gagaccgtga atgtccagg tactgttcc ctctggccac 4500
 25 ttctgcccc atctccatt gggaagtgtg gagagcctaa cagatgcgtt ccacacctg 4560
 agtggaaatc tgacttgac tgctctgca gggatggcga gaagtgtgcc caccattctc 4620
 30 atcattctc ctggacatc gatgtgggt gtactgacct gaatgaggac ctggagtct 4680
 gggatcatct caagatcaag accaagacg gacacgcaag acttggaac ctgagttc 4740
 tcgaagagaa accattgtc ggtgaagctc tcgctcgtg gaagagagca gagaagaagt 4800
 35 ggagggacaa acgtgagaaa ctgaaatggg aaactaacat cgtttacaag gaggccaaag 4860
 agtccgtgga tgcttgtc gtgaactccc aatatgatca gttgcaagcc gacaccaaca 4920
 40 tcgcatgat ccagccgca gacaaacgtg tgcacagcat tcgtgaggct tactgcctg 4980
 agttgtccgt gatccctgt gtgaacgtg ccatctcga ggaactgag ggacgtatct 5040
 ttaccgcatt ctctgtac gatgccagaa acgtcatcaa gaacggtgac ttcaacaatg 5100
 45 gcctcagctg ctggaatgtg aaaggtcatg tggacgtgga ggaacagaac aatcagcgtt 5160
 ccgtcctggt tgcctgag tgggaagctg aagtgtcca agaggtaga gtctgtccag 5220

gtagaggcta cattctccgt gtgaccgctt acaaggaggg atacggtgag ggttgcgta 5280
ccatccacga gatcgagaac aacaccgacg agcttaagtt ctccaactgc gtcgaggaag 5340
5 aaatctatcc caacaacacc gttacttgca acgactacac tgtgaatcag gaagagtacg 5400
gaggtgccta cactagccgt aacagagggtt acaacgaagc tccttccgtt cctgctgact 5460
10 atgcctccgt gtacgaggag aaatcctaca cagatggcag acgtgagaac ccttgcgagt 5520
tcaacagagg ttacagggaac tacacaccac ttccagttgg ctatgttacc aaggagcttg 5580
agtactttcc tgagaccgac aaagtgtgga tcgagatcgg tgaaaccgag ggaaccttca 5640
15 tcgtggacag cgtggagctt ctctgatgg aggaataatg agatcccgtc ctttgtctc 5700
aatttgagg gcttttact gaataagtat gtagtactaa aatgtatgct gtaatagctc 5760
20 atagtgcg aggaaagtat cgggctattt aactatgact tgagctccat ctatgaataa 5820
ataaatcagc atatgatgct ttgttttgt gtacttcaac tgtctgcta gctaattga 5880
tatggttggc acttggcacg tataaatatg ctgaagtaat ttactctgaa gctaaattaa 5940
25 ctagattaga tgagtgtatt atatacaaaa ggcattaaat cagatacatc ttagacaaat 6000
tgtcacggtc taccagaaaa gaaattgcat ttgttttgg gtctttcaga ctgacaagat 6060
30 cgatctgaag tctaaacaat tctaagaggt atcatgtagc aatgtcctgc cacaatattg 6120
aattgacctg cagcccgggc ggccgcatcg atcgtgaagt ttctcatcta agccccatt 6180
tgtagctgaa tgtagacacg tcgaaataaa gatttccgaa ttagaataat ttgtttattg 6240
35 ctttcgccta taaatacgac ggatcgtaat ttgtcgtttt atcaaaatgt actttcattt 6300
tataataacg ctgcggacat ctacattttt gaattgaaaa aaaattggta attactctt 6360
40 cttttctcc atattgacca tcatactcat tgctgatcca tgtagatttc ccggacatga 6420
agccat 6426
45 <210> 6
<211> 14416
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

5
<220>
<221> caract_misc
<222> (1)..(14416)
<223> Contig de secuencia flanqueadora 5', ADN insertado y secuencia flanqueadora
10 3'

<400> 6
gggaaaatcc ctctccata ttaagaacat aaaaatcaac aggaaaaata agttcaccaa 60
15 cccgaaccag cacatcctct atgaaacctg cggggtgagc agcacttcta ttcccaaat 120
gaatcaccac atctgtatg tgcaaaggct caagagataa agaattgaaa atggacagag 180
gggtgacact aactgatgct cctagatcta gcattgtatt atcaaattta ctgtcccaa 240
20 taatgaagg tatacagaaa gtacctgggt ccttacattt ctgaggaatg taaggaacaa 300
attacctat caatgctgac acatttctgc ccatgctaatt ccttcattg ccttgagct 360
25 tccttttggt ggtgcacaac tccttagaa actgacaca tcttgaatc tgctgatgg 420
catctagcag aggtatgtc acctctactt tctgaagggt ctccaagatc tcctttctg 480
ctcttccat ttttttgtt tggaattgct caagggtgga atggaagagg gataagaggc 540
30 tgcggtaagt cagaattact agaagaagggt ccacctgcat gaaaatttt gtaggaagc 600
ttctctttt gtgcaactat ctcatcctct ttctcagggt tagaatgaag ctgacaggt 660
35 tcagggtcgg gtgctgctac tggggagggt actgaattt ggtgtcaga cctcaagggt 720
atgacactca cattttcgg atttgcaca gttgtgaag gcaattgtc agaatttgg 780
gaatgagctt ggtcaactg agtagcatc cgcccatct gattgtcag actctgaatg 840
40 aaggctctg tctctgctg aaattgcata ttctggatgg tcattgcct cactaactct 900
tctaaggaag gtaaggagg agtctcagtt gctgtgtgc ttgtgtga ctgtgtgt 960
45 tgtgtgctg gtattggagg aggaacatat ggttgctg gaccagcaac attctggaaa 1020
ggagggacag actgtgtg ttgtgaagga ctgcccac tcatttgg atgattctc 1080

caacctggat tgtatctgtt gcttgaaga tcataattat ttgctattg ttggtttgc 1140
 ttttgagggg gtctattata aatgtttgca gcataagctt caggttggtc attgactcca 1200
 5 gattactgca aagaaggaca aagatctgta tggatgctg cagaagaaca tataccacag 1260
 actcttgtaa caggtgcaaa ttctgattc atggcaagct gagtlactag gttgaccaag 1320
 gcatcaagtt ttccctcaag ctttttattt tcagtagata aagatgaatc tgtggccacc 1380
 10 tcatcgactc ctctaaggac aatagcatca ttcttgacac tgaattgtg ggagttggaa 1440
 gccttcttct caatcaaatt cctagcctca gcaggggtca tatcacgaag agtccacca 1500
 15 ctggcagcat caatcatact ccttccatg ttgctaagtc cctcatagaa atattgaaga 1560
 aggagttgct cagaaatctg gtggtagga cagctgcac acaatttctt gaatttctt 1620
 cagtactcat acaagctctc tcactaagt tgctgatgc ctgaaatttc ttcttgatg 1680
 20 gcagtgggtc tagatgcagg gaagaatttc tccaagaaca cctcttaag gtcattccag 1740
 ctgaaaatgg acctgggagc aaggtagtag agccaatctt ttgcactac ctccagagaa 1800
 25 tgaggaaaag ccttagaaa gatatgatct tctggacat cagggggctt catggtggaa 1860
 caaacaatat ggaactcctt aagatgctta tgaggatctt cacctagaag accatgaaac 1920
 ttgggtagca aatgtattag tccagtcttg agaacatatg gaacaccctc atcaggatat 1980
 30 tgaatgcaca agtttcata agtgaaatca ggtgcagcca tctccctaag agtctctca 2040
 cgaggtaggag gtttagccat gttctcagta tgaaaattag tagttgaatg ctcaaatca 2100
 35 gaatattcag aatcaccaga aacaaaatac tcagaatgct caaatgctc aaaatgcaca 2160
 taatgattag gatgcacact atgcctaact aatctatgaa aggttctatc tatttcagga 2220
 tcgaagggtt ataaatcacc tagattgccc ctagtcatgc actatatgta gcaaataatg 2280
 40 tgttctcaa caagcaccaa gggaggggtta aaactacaac tatagtcaa tgatatcaa 2340
 atgagttgaa atttgtgag cagcacccta aaatcatgaa aagatagcac aaaaaatttc 2400
 45 aaacgaaaat tcaaagtcta actatgaaaa ctacttaaga aaagtttaga aaaataggac 2460
 aataatactt gaaaaataaa aaaaaacata gtaaacagct gattttcga gtttgggaga 2520

ctccaaccgg ctaaaacggg ttgccacaat atgagaaatt ttttctacc ccaaagcca 2580
 caatatgaga aagttttgct aaaatctagt tcccaaaatt ttgtctctc tcaaattcaa 2640
 5 ccacaccaag tgctcctagt attttcaca caaaaaatca gccaaaaata acaactctaa 2700
 ctatcaaaac aaaaacagct aattaaattg caaaatcagt cgctaattcc tagtcactaa 2760
 tcaactgtca cagcaaaaca ccaactgaat cagtcgctaa acagtcgcta aacaggagac 2820
 10 gcaactgaaa tgcaaaacag aatgctacac aaacaaaaac aactaaacac tattatgaac 2880
 ctttgccca ctgctccccg acaacggcgc caaattgat cgaggctgta cccgaatcaa 2940
 15 ataaacatta aaaatgcagt atctaggaag tgatcctagg tcatctccca acgagcaatg 3000
 gtcaaccaat gttcataata gatagtgata aaacaataac gaattggggg gggggggtat 3060
 ttgttttgt aatttaaaca acaagcaaat ttaattaga aaataacaga attaaaacat 3120
 20 gttattccc ctgattcat aagcaagtct ctatcctag gttaggagga ttatcccta 3180
 accagtcaa ccacttaac caaccctaaa taaattact aagcgaaaat taacataagg 3240
 25 ttgtcttat atgattaagc aacacataca ocaattaac atgaacaaaa tcgatcatta 3300
 agcatcaaca taaattaagc gcaaagataa ttaatcaagc actaagcatg catggattag 3360
 tagcaacaaa tacagagtaa ttgggtggaga tgaaaaactg atcaatattc aatagtaata 3420
 30 acaaaacctc aaagagagtt gtgcttgatt ctcaagagaa aacaacgctg gagacttagc 3480
 ctccattaa tcagtagaaa acgaaattgt agaaaacgaa tttattcta tgtgaacaat 3540
 35 gtgcatgaac agtaataaaa actggaattg caaaacccta aaattattct tcttccaaa 3600
 aaaactccct aaactaaaac cctggtgcta ttatataggt cctcagcccc aaagcttaca 3660
 aatctatttt cagtccaaac ccataaacga aataaaaataa aatctggaca agataagata 3720
 40 agattggatg aaataaaatc tggacgaaat aaaatctgga taagataaga ttgataaaa 3780
 taaaattgtc tgctctttc aagtccaagc ccaattccgg attcaagccc aatttttat 3840
 45 aattctctg aaattaaatt aaaaatacga aattagtcaa gtaggcccaa atgataaaac 3900
 tgcataatta attgacaat taaggcta atcagtaata aatagtgaca aaaagggtta 3960

agaaatagga gaataatgac acatcaccca tatggggagc aattctaaaa tgcatttgag 4020
 ttcttaacc tgagacacag tgcagtagag tctccaagga ttcattgtgc cttttat 4080
 5 atatgatggg gtcactacat tggcctgtc aaagaaactg aatttggggg attaaagaaa 4140
 cacaaaataa aaacaaatga aactagttaa tagaaatgtt gcctattgct tcttgaaaa 4200
 agtccaacca ttgtgattt ggataaaatt catattacc actgttagct tgttcaatca 4260
 10 aacactagat ttggataaaa tctcactct agatatacct caagggataa tatgaccaac 4320
 attagtcat ttagaaagt aaagtggaca aattgagat ttcattcctt aatgacatta 4380
 15 taaacatgta tttttccat gaccctttt caatgtaagt acaatttacc ccttagttta 4440
 gatactctat atatgcatgt tacgtagtgt atgaaaacat acctaagttg ttgtgtatgg 4500
 ttaagttgc gactacctt gatatcaaac tctcatctc caatctcata caaaagatac 4560
 20 ttgtcacttg gtacctgaac ctgtcagtt tgcagttgtg agtttcttct gaagccacac 4620
 gctgtatag taaccagaag ccaggaggga gtcctctaag gctctaactc gtattttccg 4680
 25 tggaagtaca ttttttct taaagaaaac agagatagtt taccaatgat aatatttctt 4740
 tagccaaata ggaccatcat agaaaacaaa actctcttc taagtattta atgcaactac 4800
 atatttaggg tgcgttgat tcgctaaaaa ataaggtct agacaacaca aaaatattt 4860
 30 tccaacgtt gattttaaaa atggctgaga gacaatacaa aataaagaat gatgaactgg 4920
 acaaaaacct aaaaactgt aactcactga atctcataca acttttgtt cagtgtctaa 4980
 35 aaaaagtaaa aatacaatat ttttctatt ttttacttg attatctcac accttcttc 5040
 tactcattg tttcactca cctctccagt gggcaccttg gttgtcggc gagagtctga 5100
 tggactttg ttgttctt ttgtctatt atttcttct ttcattgtt aattattca 5160
 40 aatgttcca tcatcatctt actcctctt gttatgttt tttctttg ccaactcaa 5220
 cgaggccgtg ccgcgaccac catcatcacg acctatggc ggcctcacgc cgcaaggccc 5280
 45 tgcaccagtg ggcacaggg gtcatgcctc ctcttaaag gtgtctctt ttgttatgt 5340
 cgtcaaagt ttgctaatt acctagaatt ttcaatgaa tcccttact tgtgggttag 5400

tctaggtcgc tctgcccgt tccaacccta gcccaaaaaa aaatgaaatg ggtaggaaag 5460
 gcgggcctag ttgaattaa aataaatcat gctaagatat tgataactgc tatgtatagg 5520
 5 tatatttgg gattaaatta tataggaatt agtaatttt ctccttatt tcttccttt 5580
 tgttcaaata attggaattc taacatcatt taagtttta thtagaaaat attaaaagtt 5640
 gatgaattta tgatacttag tgaataatta gagtagaaaa ataaagtaa gcccaaaaaa 5700
 10 gaaaattggt gatatgaaga tacatgcta gcatgcccc ggcacgcta gtgtgtgtgt 5760
 caaacactga tagtttaac tgaaggcggg aaacgacaat ctgatccca tcaagctga 5820
 15 tatgaattc ctgcagcccg ggggatccac tagttctaga gggcccggt taactgcagg 5880
 tcgacggatc cccgggtacc gagctgaat tcaaatttat tatgtgttt tttccgtgg 5940
 tcgagattgt gtattattct ttattatta caagacttt agctaaaatt tgaaagaatt 6000
 20 tactttaaga aaatctaac atctgagata attcagcaa tagattatat tttcattac 6060
 tctagcagta ttttgcaga tcaatcgcaa catatatggt ttttagaaaa aatgcactat 6120
 25 atatatatat attattttt caattaaaag tgcagatat ataatatata tatatatata 6180
 tatgtgtgtg tttatatggt caaagaaatt ctatacaaa tatacacgaa cacatatatt 6240
 tgacaaaatc aaagtattac actaaacaat gagttgtgc atggccaaaa caaatatgta 6300
 30 gattaaatcc tccagcctcc aaaaaaaaaat ccaagtgttg taaagcatta tatatatata 6360
 gtagatccca aatttttga caattccaca ctgatcgaat ttttaaagtt gaatatctga 6420
 35 cgtaggattt ttttaatgic ttacctgacc atttactaat aacattcata cgttttcat 6480
 tgaaatatcc tctataatta tattgaattt ggcacataat aagaaaccta attggtgatt 6540
 tattttacta gtaaatttct ggtgatgggc ttctactag aaagctctcg gaaaatcttg 6600
 40 gaccaaattc atattccatg acttcgattg ttaaccctat tagttttcac aaacatacta 6660
 tcaatatcat tgcaacggaa aaggtaacaag taaaacattc aatccgatag ggaagtgatg 6720
 45 taggaggttg ggaagacagg cccagaaaga gatttatctg actgttttg tttatagttt 6780
 tcaatgttca taaaggaaga tggagacttg agaagtttt ttggacttt gtttagcttt 6840

gtggggcgt tttttttg atcaataact ttgtgggct tatgattgt aatatttcg 6900
 tggactctt agttattta gacgtgctaa cttgttggg cttatgactt gttgtaacat 6960
 5 attgtaacag atgacttga tgcgactaa tcttacaca ttaaacaatag ttctgtttt 7020
 tgaaagtct tatttcatt ttatttgaa tgtatata tttctatat ttataattct 7080
 agtaaaaggc aaattttgct tttaaataa aaaaatatat attccacagt ttacctaata 7140
 10 cttatgcatt tagcagtaca aattcaaaaa ttcccaatt ttattcatga atcataccat 7200
 tatatattaa ctaaatacaa ggtaaaaaaa aggtatgaaa gctctatagt aagtaaaata 7260
 15 taaattcccc ataaggaaa ggccaagtcc accaggcaag taaaatgagc aagcaccact 7320
 ccaccatcac acaattcac tcatagataa cgataagatt catggaatta tctccacgt 7380
 ggcattattc cagcgggtca agcogataag ggtctcaaca cctctccta ggcctttgtg 7440
 20 gccgttacca agtaaaatta acctcacaca tatccacact caaaatccaa cgggtgtagat 7500
 cctagtccac tgaatctca tgtatcctag accctcogat cactccaaag cttgttctca 7560
 25 ttgtgttat cattatatat agatgaccaa agcactagac caaacctcag tcacacaaag 7620
 agtaaagaag aacaatggct tccttatgc tctctccgc tactatgggt gcctctccgg 7680
 ctcaggccac tatggctgct ccttcaacg gacttaagtc ctccgtgcc ttccagcca 7740
 30 cccgcaaggc taacaacgac attacttoca tcacaagcaa cggcggaaga gtaactgca 7800
 tgcagggtgt gcctccgatt ggaaagaaga agtttgagac tctctctac cttcctgacc 7860
 35 ttaccgattc cgggtgtcgc gtcaactgca tgcaggccat ggacaacaac ccaaacaatca 7920
 acgaatgcat tccatacaac tgcttgagta acccagaagt tgaagtactt ggtggagaac 7980
 gcattgaaac cggttacact cccatcgaca tctcctgtc ctgacacag ttctgtctca 8040
 40 gcgagttcgt gccagggtgt ggttcgttc tcggactagt tgacatcatc tggggatatct 8100
 ttgtccatc tcaatgggat gcattcctgg tgcaaattga gcagttgatc aaccagagga 8160
 45 tcgaagagtt cgccaggaac caggccatct ctagggtgga aggattgagc aatctctacc 8220
 aaatctatgc agagagcttc agagagtggg aagccgatcc tactaacca gctctccg 8280

aggaaatgcg tattcaattc aacgacatga acagcgcctt gaccacagct atcccattgt 8340
 tcgcagtcca gaactaccaa gticcctctt tgtccgtgta cgttcaagca gctaattctc 8400
 5 acctcagcgt gcttcgagac gttagcgtgt ttgggcaaag gtggggattc gatgctgcaa 8460
 ccatcaatag ccgttacaac gaccttacta ggctgattgg aaactacacc gaccacgctg 8520
 ttcgttggtg caacactggc ttggagcgtg tctggggctc tgattctaga gattggatta 8580
 10 gatacaacca gticaggaga gaattgaccc tcacagtttt ggacattgtg tctctcttcc 8640
 cgaactatga ctccagaacc taccctatcc gtacagtgtc ccaacttacc agagaaaatct 8700
 15 atactaacc agttcttgag aacttcgacg gtagcttccg tggttctgcc caaggtatcg 8760
 aaggctccat caggagccca cacttgatgg acatctgaa cagcataact atctacaccg 8820
 atgtcacag aggagagtat tactggctcg gacaccagat catggcctct ccagttggat 8880
 20 tcagcggggc cgagtttacc ttccctctct atggaactat gggaaacgcc gctccacaac 8940
 aacgtatcgt tgctcaacta ggtcaggggtg tctacagaac ctgtcttcc acctgtaca 9000
 25 gaagaccctt caatatcggg atcaacaacc agcaacttc cgttctgac ggaacagagt 9060
 tcgcctatgg aacctctct aacttgccat ccgctgttta cagaaagagc ggaaccgtg 9120
 attccttggg cgaaatccca ccacagaaca acaatgtgcc acccaggcaa ggattctccc 9180
 30 acaggttgag ccacgtgtcc atgttcggtt ccggattcag caacagtcc gtgagcatca 9240
 tcagagctcc tatgtctct tggatacatc gtagtgctga gttcaacaac atcatcgcat 9300
 35 ccgatatgat tactcaaatc cctgcagtga agggaaactt tctctcaac ggttctgtca 9360
 ttcaggacc aggattcact ggtggagacc tcgttagact caacagcagt ggaaataaca 9420
 ttcagaatag agggatatatt gaagttccaa ttacttccc atccacatct accagatata 9480
 40 gagttcgtgt gaggtatgct tctgtgaccc ctattcacct caacgttaat tggggtaatt 9540
 catccatctt ctccaatata gttccagcta cagctacctc ctgggataat ctccaatcca 9600
 45 gcgatttcgg ttacttgaa agtgccaatg cttttacatc ttactcggg aacatcgtgg 9660
 gtgttagaaa cttagtggg actgcaggag tgattatcga cagattcgag ttattccag 9720

ttactgcaac actcgaggct gagtacaacc ttgagagagc ccagaaggct gtgaacgccc 9780
 tctttacctc caccaatcag ctgggttga aaactaacgt tactgactat cacattgacc 9840
 5 aagtgtccaa ctgggtcacc taccttagcg atgagttctg cctcgacgag aagcgtgaac 9900
 tctccgagaa agttaaacac gccaaagctc tcagcgacga gaggaatctc ttgcaagact 9960
 ccaacttcaa agacatcaac aggcagccag aacgtgggtg ggggtgaagc accgggatca 10020
 10 ccatccaagg aggcgacgat gtgttcaagg agaactacgt caccctctcc ggaactttcg 10080
 acgagtgtca ccctacctac ttgtaccaga agatcgatga gtccaaactc aaagccttca 10140
 15 ccaggatatca acttagaggc tacatcgaag acagccaaga ccttgaaatc tactcgatca 10200
 ggtacaatgc caagcacgag accgtgaatg tcccaggtag tggttccctc tggccacttt 10260
 ctgccaatc tccattggg aagtgtggag agcctaacag atgcgctcca caccttgagt 10320
 20 ggaatcctga ctggactgc tctgcaggg atggcgagaa gtgtgccac cattctcatc 10380
 acttctcctt ggacatcgat gtgggatgta ctgacctgaa tgaggacctc ggagtctggg 10440
 25 tcatttcaa gatcaagacc caagacggac acgcaagact tggcaacctt gagtttctcg 10500
 aagagaaacc attggtcggg gaagctctcg ctggtgtgaa gagagcagag aagaagtgga 10560
 gggacaaacg tgagaaactc gaatgggaaa ctaacatcgt ttacaaggag gccaaagagt 10620
 30 ccgtggatgc ttgttctgt aactcccaat atgatcagtt gcaagccgac accaaccatcg 10680
 ccatgatcca cgccgcagac aaacgtgtgc acagcattcg tgaggcttac ttgcctgagt 10740
 35 tgtccgtgat ccttggtgtg aacgtgcca tcttcgagga acttgagga cgtatcttta 10800
 ccgcattctc ctgtacgat gccagaaacg tcatcaagaa cggtgacttc aacaatggcc 10860
 tcagctgctg gaatgtgaaa ggtcatgtgg acgtggagga acagaacaat cagcgttccg 10920
 40 tcttggtgtg gcctgagtgg gaagctgaag tgtccaaga ggtagagtc tgtccaggta 10980
 gaggtacat tctccgtgtg accgcttaca aggagggata cggtgagggt tgcgtgacca 11040
 45 tccacgagat cgagaacaac acgacgagc ttaagttctc caactgcgtc gaggaagaaa 11100
 tctatcccaa caacaccgtt acttgcaacg actacactgt gaatcaggaa gactacggag 11160

gtgcctacac tagccgtaac agaggttaca acgaagctcc ttccgttcct gctgactatg 11220
 cctccgtgta cgaggagaaa tctacacag atggcagacg tgagaaccct tgcgagttca 11280
 5 acagagggtta cagggactac acaccacttc cagttggcta tgtaccaag gagcttgagt 11340
 actttctga gaccgacaaa gtgtggatcg agatcgggtga aaccgagggga accttcacg 11400
 tggacagcgt ggagcttctc ttgatggagg aataatgaga tcccgctctt tgccttcaat 11460
 10 ttgaggggt tttactgaa taagtatgta gtactaaaat gtatgctgta atagctcata 11520
 gtgagcgagg aaagtatcgg gctatttaac tatgactga gctccatcta tgaataaata 11580
 15 aatcagcata tgatgctttt gttttgtgta ctcaactgt ctgcttagct aatttgatat 11640
 ggttggcact tggcacgtat aaatatgctg aagtaattta ctctgaagct aaattaacta 11700
 gattagatga gtgtattata taaaaaggc attaaatcag atacatcta gacaaattgt 11760
 20 cacggcttac cagaaaagaa attgcatttg ttttgggtc ttcagactg acaagatcga 11820
 tctgaagtct aaacaattct aagaggatc atgtagcaat gtctgccac aatattgaat 11880
 25 tgacctgcag cccgggcggc cgcacgatc gtgaagtttc tcatctaagc cccatttgg 11940
 acgtgaatgt agacacgtcg aaataaagat ttccgaatta gaataatttg ttattgctt 12000
 tgcctataa atacgacgga tcgtaatttg tcttttatc aaaatgtact ttcatttat 12060
 30 aataacgctg cggacatcta cattttgaa ttgaaaaaaa attggaatt actcttctt 12120
 tttctcata ttgaccatca tactcattgc tgatccatgt agattcccc gacatgaagc 12180
 35 catcaaaaag taggactaat ttaggaaagc aagctaattc aagaaagtga aggcacgctt 12240
 agtgtgagac acgtgtgag cgcgattact gccactcact aaccacacaa gtgcactcag 12300
 tgcgaagggt gcttaaaaat taagtigatt cgcacttata aaagaaggat agagatgaag 12360
 40 gaaaaaacac agaaaatata attccttata gaagacaaag gctagaagaa gcaaacgcaa 12420
 acattagaag tcattccttc cctcaattcc cttttcaat ttccccttt actaaatatt 12480
 45 ctctcttgc aattataaag cctcctatga caatgacaag ctaaactctc cttgttggg 12540
 aactatcag tcaactgctc ttaataaat ttctcttct atctattatg aatattcact 12600

acaagaaata tgcccatttg ccagggattt ttgacaggga cattaacccc tggcaaattt 12660
 cccaggggact aagccaagga aacccctggc aaaatgacat ttgagaaggc tgggaccact 12720
 5 tacatttaca cagggggttg tccctcgcaa aaatacaaaa gccttggcaa aaaaaagagc 12780
 gggaaatgaa tttaaaaca gcatgttgtt ttacacagc caaacacacg ggtatgccct 12840
 cgtttctgt aaagctgacg gaatctccc ataagtcaac acgacatgac catgcactgc 12900
 10 aaaaagctgt ggggccaga cgtgacaggg gtgttcccc toggaaatgg ctgcagccc 12960
 ctggcaaaaa ggaatccctg ctttctagc tacaccgttc tgctcatata gctgaagcta 13020
 15 ggagggttagc cttgactct gttgtttgc gaggggcatt ccgtgagtta ttccctgggt 13080
 tttttacac tataagcca aaccgcgtgt ttatctcat gtcagtgtt gtgttttga 13140
 aactagaaa aatttcggt ttccatttc atcctacca gticatttc agtcattat 13200
 20 cattcagttc atacactgt tctataattt ggtaacactc tttcactta ttatatttt 13260
 ctgttttat ttgtactac ttattaacat aaatatattt tattgtatca gtgtccaaat 13320
 25 ttgccicctc ctgctctoc ttgctctcg aatttgttct ctaagcttc aacaagttag 13380
 taattttct acttataatt ttgatatat gatgttata tatatgatgt tataatttg 13440
 catgatctgt caaagaaaat atgatgttc tacttgcag atgtgttata atatagatg 13500
 30 ttatatata ttgcgaattt tgtgttaat aaaactgitt aattagaaac tgtataattt 13560
 tttgtttaa taaaactgtt taatttgca tgatctgtt aataaaaactg ttatatataa 13620
 35 actgtttata tataatatat gatgttaaca ttttaaaac tgtttataaa acagtttagt 13680
 tagaaaaaat gttaaaacta gagaaaaaaa tgtataataa aactgtgtca gtacagcagc 13740
 gcgtcagaaa agtgtgcaga tgcgtcagtg agaagacagg ggctaagaca gggatttga 13800
 40 caggggaattt tgccagggat ttgccaggg tcagcccctc gtttttgc caggggtgaa 13860
 atccctggca aactgatttg cgatgggcgt tttccaggg gattcagccc ctggcaaaat 13920
 45 ccctggcaaa cgtccatttc ccagggctt ttgtctttt cccaggggaat ccgcccctgg 13980
 caaacgagct tgttctgt agtgattact ttgcattag ttttctgt atttaattt 14040

attgtttatg gcttgattac ccatttgcac tataagtttt aggggtagcg ttgaaaagtg 14100
 ttattctcta atagaactgg aaaagagtat ttaaataact tcatcactag ggatacattg 14160
 5 attttattta gcttattata tatctctatt attaatgtaa tttaactatt ttatctctgc 14220
 aaagtgattt gggagagaag atagataagt tagactcttt cactcgaggc tgagtacaac 14280
 cttgagagag ccagagaaggc tgtgaacgcc ctctttacct ccaccaatca gcttggttg 14340
 10 aaaactaacg ttactgacta tcacattgac caagtgacca acttggtcac ctaccttagc 14400
 gatgagttct gaaggg 14416
 15
 <210> 7
 <211> 6916
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Sintética
 25
 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(6916)
 <223> casete de expresión TIC107 con bordes derecho e izquierdo completos
 30
 <400> 7
 aggatttttc ggcgctgcgc tacgtccgcg accgcgttga gggatcaagc cacagcagcc 60
 cactcgacct tctagccgac ccagacgagc caagggatct ttttgaatg ctgctccgct 120
 35 gtcaggcttt ccgacgtttg ggtggttgaa cagaagtcac tatcgacagc aatgccaagc 180
 actcccagagg ggaaccctgt ggttggcatg cacatacaaa tggacgaacg gataaacctt 240
 ttacagccct tttaaataac cgattattct aataaacgct cttttctctt aggtttaccc 300
 40 gccaatatat cctgtcaaac actgatagtt taaactgaag gcgggaaacg acaatctgat 360
 ccccatcaag cttgatatcg aattcctgca gcccggggga tccactagtt ctagagcggc 420
 45 cgcgttaact gcaggctgac ggatccccgg gtaccgagct cgaattcaaa ttattatgt 480
 gtttttttc cgtggctgag attgtgtatt attcttagt tattacaaga ctttagcta 540

aaatttgaaa gaatttactt taagaaaatc ttaacatctg agataatttc agcaatagat 600
 tatatttttc attactctag cagtattttt gcagatcaat cgcaacatat atgggtgtta 660
 5 gaaaaaatgc actatatata tatatattat ttttcaatt aaaagtgc at gatatataat 720
 atatatatat atatatatgt gtgtgtgtat atgggtcaaag aaattcttat acaaatatac 780
 acgaacacat atatttgaca aaatcaaagt attacactaa acaatgagtt ggtgcatggc 840
 10 caaaacaaat atglagattt aaaattccag cctccaaaaa aaaatccaag tgttgtaaag 900
 cattatatat atatagtaga tcccaaattt tigtacaatt ccacactgat cgaattttta 960
 15 aagtgaata tctgacgtag gattttttta atgtcttacc tgaccattta ctaataacat 1020
 tcatacgttt tcatttgaaa tatcctctat aattatattg aatttggcac ataataagaa 1080
 acctaattgg tgatttattt tactagtaaa ttctgggtga tgggctttct actagaaagc 1140
 20 tctcggaata tcttggacca aatccatatt ccatgacttc gattgttaac cctattagtt 1200
 ttcacaaaca tactatcaat atcattgcaa cggaaaaggt acaagtaaaa cattcaatcc 1260
 25 gataggggaag tgatgtagga ggttgggaag acaggcccag aaagagattt atctgacttg 1320
 tttgtgtat agttttcaat gttcataaag gaagatggag actgagaag ttttttgg 1380
 actttgtta gcttgttgg gcgtttttt ttigtatcaa taactttgt gggcttatga 1440
 30 ttgtaatat ttctgtggac tcttagttt atttagacgt gctaactttg ttgggcttat 1500
 gacttgtgt aacatatgt aacagatgac ttgatgtgcg actaatcttt acacattaaa 1560
 35 catagtctg tttttgaaa gtcttattt tcattttat ttgaatgtta tatattttc 1620
 tatattata attctagtaa aaggcaaatt ttgctttta atgaaaaaaaa tatatattcc 1680
 acagttcac ctaatcttat gcatttagca gtacaaattc aaaaatttcc catttttatt 1740
 40 catgaatcat accattatat attaaactaaa tccaaggtaa aaaaaaggta tgaaagctct 1800
 atagtaagta aaatataaat tccccataag gaaagggcca agtccaccag gcaagtaaaa 1860
 45 tgagcaagca ccactocacc atcacacaat ttactcata gataacgata agattcatgg 1920
 aattatcttc cacgtggcat tattccagcg gtccaagccg ataagggctt caacacctct 1980

ccttaggcct ttgtggccgt taccaagtaa aattaacctc acacatatcc acactcaaaa 2040
 tccaacgggtg tagatcctag tccacttgaa tctcatgtat cctagaccct ccgatcactc 2100
 5 caaagcttgt tctcattgtt gttatcatta tatatagatg accaaagcac tagaccaaac 2160
 ctcagtcaca caaagagtaa agaagaacaa tggcttcctc tatgctctct tccgctacta 2220
 tggttgcctc tccggctcag gccactatgg tcgctccttt caacggactt aagtcctccg 2280
 10 ctgccttccc agccacccgc aaggctaaca acgacattac ttccatcaca agcaacggcg 2340
 gaagagttaa ctgcatgcag gtgtggcctc cgattggaaa gaagaagttt gagactctct 2400
 15 ctaccttcc tgacctacc gattccgggtg gtcgcgtcaa ctgcatgcag gccatggaca 2460
 acaacccaaa catcaacgaa tgcattccat acaactgctt gagtaacca gaagttgaag 2520
 tacttggigg agaacgcatt gaaacogggtt acactcccat cgacatctcc ttgtccttga 2580
 20 cacagtttct gctcagcgag ttctgtccag gtgtggggtt cgttctcgga ctagttgaca 2640
 tcatctgggg tatcttgggt ccatctcaat gggatgcatt cctgggtgcaa attgagcagt 2700
 25 tgatcaacca gaggatcgaa gatttcgcca ggaaccaggc catctctagg ttggaaggat 2760
 tgagcaatct ctaccaaatt tatgcagaga gttcagaga gtgggaagcc gatcctacta 2820
 acccagctct ccgcgaggaa atgcgtattc aattcaacga catgaacagc gccttgacca 2880
 30 cagctatccc attgttcgca gtccagaact accaagttcc tctctgtcc gtgtacgttc 2940
 aagcagctaa tctcacctc agcgtgcttc gagacgttag cgtgtttggg caaagggtggg 3000
 35 gattcgatgc tgcaaccatc aatagccgtt acaacgacct tactaggctg attggaaact 3060
 acaccgacca cgctgttcgt tggtaacaac ctggcttggg gcgtgtctgg ggtcctgatt 3120
 ctgagattg gattagatac aaccagtica ggagagaatt gacctcaca gttttggaca 3180
 40 ttgtgtctct ctcccgaac tatgactcca gaacctaccc tatccgtaca gtgtcccaac 3240
 ttaccagaga aatctatct aaccagttc ttgagaactt cgacggtagc ttccgtgggt 3300
 45 ctgccaagg tatcgaaggc tccatcagga gccacactt gatggacatc ttgaacagca 3360
 taactatcta caccgatgct cacagaggag agtattactg gtctggacac cagatcatgg 3420

cctctccagt tggattcagc gggcccgagt ttaccttcc tctctatgga actatgggaa 3480
 acgccgctcc acaacaacgt atcgttgctc aactaggtca ggggtgtctac agaacctgt 3540
 5 cttccacctt gtacagaaga cccctcaata tccgtatcaa caaccagcaa cttccgttc 3600
 ttgacggaac agagttcgcc tatggaacct ctctaaactt gccatccgct gtttacagaa 3660
 agagcgggaac cgttgattcc ttggacgaaa tcccaccaca gaacaacaat gtgccacca 3720
 10 ggcaaggatt ctccacagg ttgagccaog tgtccatgtt ccgttcogga ttcagcaaca 3780
 gttccgtgag catcatcaga gctcctatgt tctcttggat acatcgtagt gctgagttca 3840
 15 acaacatcat cgcacccgat agtattactc aaatccctgc agtgaaggga aactttctt 3900
 tcaacggttc tgcatttca ggaccaggat tctctggtgg agacctcgtt agactcaaca 3960
 gcagtggaaa taacattcag aatagagggt atattgaagt tccaattcac ttcccatcca 4020
 20 catctaccag atatagagtt cgtgtgaggt atgcttctgt gacctctatt cacctcaacg 4080
 ttaattgggg taattcatcc atcttctcca atacagttcc agctacagct acctcctgg 4140
 25 ataatctcca atccagcgtt ttccgttact ttgaaagtgc caatgctttt acatcttcac 4200
 tccgtaacat cgtgggtgtt agaaacttta gtgggactgc aggagtgatt atcgacagat 4260
 tccagttcat tccagttact gcaacactcg aggctgagta caaccttgag agagcccaga 4320
 30 aggctgtgaa cggcctcttt acctccacca atcagcttgg ctgaaaact aacgttactg 4380
 actatcacat tgaccaagtg tccaacttgg tcacctacct tagcgatgag ttctgcctcg 4440
 35 acgagaagcg tgaactctcc gagaaagtta aacacgcca gctctcagc gacgagagga 4500
 atctcttga agactccaac ttcaaagaca tcaacaggca gccagaacgt ggttggggtg 4560
 gaagcaccgg gatcaccatc caaggaggcg acgatgtgtt caaggagaac tacgtcacc 4620
 40 tctccggaac ttccagcag tgctacccta cctacttcta ccagaagatc gatgagtcca 4680
 aactcaaagc cttcaccagg tatcaactta gaggctacat cgaagacagc caagacctg 4740
 45 aaatctactc gatcaggtag aatgccaagc acgagaccgt gaatgtcca ggtactggtt 4800
 ccctctggcc acttctgcc caatctcca ttgggaagtg ttgagagcct aacagatgcg 4860

ctccacacct tgagtggaat cctgacttgg actgctcctg cagggatggc gagaagtgtg 4920
 cccaccattc tcatcattc tcttggaca tcatgtggg atgtactgac ctgaatgagg 4980
 5 acctcggagt ctgggtcatc ttcaagatca agaccaaga cggacacgca agacttggca 5040
 accttgagtt tctgaagag aaaccattgg tgggtgaagc tctcgtcgt gtgaagagag 5100
 cagagaagaa gtggagggac aaacgtgaga aactcgaatg ggaaactaac atcgtttaca 5160
 10 aggaggccaa agagtccgtg gatgcttgt tctgaactc ccaatatgat cagttgcaag 5220
 ccgacaccaa catcgccatg atccacgccg cagacaaacg tgtcacagc attcgtgagg 5280
 15 cttacttgcc tgagtgtcc gtgatccctg gtgtgaacgc tgccatctc gaggaacttg 5340
 aggacgtat cttaccgca ttctcctgt acgatgccag aaacgtcatc aagaacgggtg 5400
 actcaacaa tggcctcagc tgctggaatg tgaagggtca tgtggaogtg gaggaacaga 5460
 20 acaatcagcg ttccgtcctg gttgtgcctg agtgggaagc tgaagtgtcc caagagggtta 5520
 gagtctgtcc aggtagaggc tacattctoc gtgtgaccgc ttacaaggag ggatacgggtg 5580
 25 aggggtgcgt gaccatccac gagatcgaga acaacaccga cgagcttaag ttctccaact 5640
 gcgtcgagga agaaatctat cccaacaaca ccgttacttg caacgactac actgtgaatc 5700
 aggaagagta cggagggtcc tacactagcc gtaacagagg ttacaacgaa gtccttccg 5760
 30 ttctgtctga ctatgcctcc gtgtacgagg agaaatccta cacagatggc agacgtgaga 5820
 acccttgca gttcaacaga ggttacaggg actacacacc acttcagtt ggctatgtta 5880
 35 ccaaggagct tgagtacttt cctgagaccg acaaagtgtg gatcgagatc ggtgaaaccg 5940
 aggaacctt catcgtggac agcgtggagc ttctcttgat ggaggaataa tgatgccg 6000
 tccttgtct tcaatttga gggctttta ctgaataagt atgtagtact aaaatgtatg 6060
 40 ctgtaatagc tcatagttag cgaggaaagt atcgggctat ttaactatga ctgagctcc 6120
 atctatgaat aaataaatca gcatatgatg ctttgtttt gtgtacttca actgtctgct 6180
 45 tagctaatt gatatggtg gcacttggca cgtataaata tctgaagta attactctg 6240
 aagctaaatt aactagatta gatgagtga ttatatacaa aaggcattaa atcagataca 6300

tcttagacaa attgtcacgg tctaccagaa aagaaattgc attgtttt gggctttca 6360
 gactgacaag atcgatctga agtctaaaca attctaagag gtaicatgta gcaatgtcct 6420
 5 gccacaatat tgaattgacc tgcagcccgg gcggccgcat cgatcgtgaa gtttctcatc 6480
 taagcccca ttggacgtg aatgtagaca cgtcgaaata aagatttccg aattagaata 6540
 attgtttat tgccttccc tataaatacg acggatcgta attgtcgtt ttatcaaat 6600
 10 gtacttcat ttataataa cgctgoggac atctacatt ttgaattgaa aaaaaattgg 6660
 taattactct tcttttct ccatattgac catcatactc attgctgac catgtagatt 6720
 15 tcccgacat gaagccattt acaattgaat atatcctgcc gccgctgccg cttgcaccc 6780
 ggtggagctt gcatgttgt tctacgcag aactgagccg gtaggcaga taattccat 6840
 tgagaactga gccatgtgca ccttcccc aacacggtga gcgacggggc aacggagtga 6900
 20 tccacatggg actttt 6916

<210> 8
 25 <211> 3801
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 30 <223> Sintética

<220>
 <221> caract_misc
 35 <222> (1)..(3801)
 <223> ADN que codifica a la toxina de insecto TIC107 incluyendo la secuencia
 codificante del péptido de tránsito a cloroplastos

<400> 8
 40 atggcttct ctatgctctc ttccgtact atggtgcct ctccggctca ggccactatg 60
 gtcgctctt tcaacggact taagtctcc gctgccttc cagccacccg caaggctaac 120
 aacgacatta ctccatcac aagcaacggc ggaagagtta actgcatgca ggtgtggcct 180
 45 ccgattggaa agaagaagt tgagactctc tcttaccttc ctgacctac cgattccggt 240
 ggctcgtca actgcatgca ggccatggac aacaaccaa acatcaacga atgcattcca 300

tacaactgct tgagtaaccc agaagttgaa gtacttggtg gagaacgcat tgaaaccggt 360
 tacactccca togacatctc ctgtccttg acacagtttc tgctcagcga gttcgtgccca 420
 5 ggtgctgggt tcgtctcgg actagttgac atcatctggg gtatctttgg tccatctcaa 480
 tgggatgcat tcttggtgca aattgagcag ttgatcaacc agaggatcga agagttcgcc 540
 10 aggaaccagg ccatctctag gttggaagga ttgagcaatc tctaccaaat ctatgcagag 600
 agcttcagag agtggaagc cgtcctact aaccagctc tccgcgagga aatgcgtatt 660
 caattcaacg acatgaacag cgccttgacc acagctatcc cattgttcgc agtcagaac 720
 15 taccaagttc ctctctgtc cgtgtacgtt caagcagcta atctcacct cagcgtgctt 780
 cgagacgta gcgtgtttg gcaaagggtg ggattcgatg ctgcaacat caatagccgt 840
 20 tacaacgacc ttactaggct gatggaaac tacaccgacc acgctgttcg ttgttacaac 900
 actggcttg agcgtgtctg gggctctgat tctagagatt ggattagata caaccagttc 960
 aggagagaat tgacctcac agtttggac attgtgtctc tctcccgaa ctatgactcc 1020
 25 agaacctacc ctatccgtac agtgcccaa ctaccagag aaatctatac taaccagtt 1080
 ctgagaact tcgacgtag ctccgtgtt tctgccaag gtatcgaagg ctccatcagg 1140
 30 agccacact tgatggacat ctgaacagc ataactatct acaccgatgc tcacagagga 1200
 gagtattact ggtctggaca ccagatcatg gcctctccag ttggattcag cgggcccag 1260
 ttaccttc ctctctatgg aactatggga aacgcgctc cacaacaacg tatcgttct 1320
 35 caactaggtc aggtgtcta cagaacctg tctccacct tctacagaag acccttcaat 1380
 atcggatatca acaaccagca acttccgtt ctgacggaa cagagttcgc ctatggaacc 1440
 40 tcttctaact tgcatccgc tgtttacaga aagagcggaa ccgttgattc ctggacgaa 1500
 atcccaccac agaacaacaa tgtgccacc aggcaaggat tctccacag gttgagccac 1560
 gtgtccatgt tccgtccgg attcagcaac agttccgtga gcatcatcag agctcctatg 1620
 45 ttctcttga tacatcgtag tctgagttc aacaacatca tcgcatccga tagtattact 1680
 caaatccctg cagtgaagg aaacttctc ttaacgggt ctgtcattc aggaccagga 1740

ttactggtg gagacctgt tagactcaac agcagtggaa ataacattca gaatagaggg 1800
 tatattgaag ttcaattca ctcccatcc acatctacca gatatagagt tegtgtgagg 1860
 5 tatgttctg tgaccctat tcacctcaac gtaattggg gtaattcatc catcttctcc 1920
 aatacagttc cagctacagc tacctcctg gataatctcc aatccagcga ttctggttac 1980
 10 ttgaaagtg ccaatgctt tacatctca ctoggttaaca tctgggtgt tagaaactt 2040
 agtgggactg caggagtgt tatcgacaga ttgagttca ttccagttac tgcaacactc 2100
 gaggctgagt acaacctga gagagcccag aaggctgtga acgacctt tacctccacc 2160
 15 aatcagctg gctgaaaac taacgtact gactatcaca ttgaccaagt gtccaactg 2220
 gtcacctacc ttagcgatga gttctgctc gacgagaagc gtgaactctc cgagaaagt 2280
 20 aaacacgcc aagctctcag cgacgagagg aatctctgc aagactcaa ctcaaagac 2340
 atcaacaggc agccagaacg tgggtgggt ggaagcaccg ggatcacat ccaaggaggc 2400
 gacgatgtg tcaaggagaa ctacgtacc ctctccgaa ctctgacga gtgctacct 2460
 25 acctactgt accagaagt cgtgagtc aaactcaaag cctcaccag gtatcaact 2520
 agaggctaca tcgaagacag ccaagacct gaaatctact cgtcaggta caatgccaag 2580
 30 cagcagaccg tgaatgtccc aggtactgt tccctctgc cacttctgc ccaatctccc 2640
 attggaagt gtggagagcc taacagatgc gctccacacc ttgagtggaa tctgactg 2700
 gactgtctc gcaggatgg cgagaagtgt gccaccatt ctatcact ctcttgac 2760
 35 atcgatgtg gatgtactga cctgaatgag gacctcggag tctgggtcat ctcaagatc 2820
 aagaccaag acggacacgc aagactggc aacctgagt ttctgaaga gaaaccattg 2880
 40 gtcggtgaag ctctgctc tgtgaagaga gcagagaaga agtggaggga caaacgtgag 2940
 aaactcgaat gggaaactaa catcggttac aaggaggcca aagagtccgt ggatgcttg 3000
 ttctgaact ccaatatga tcagtgcaa gccgacacca acatcgccat gatccagcc 3060
 45 gcagacaaac gtgtcacag cttcgtgag gcttactgc ctgagttgc cgtgatccct 3120
 ggtgtgaacg ctgcatct cgaggaact gagggacga tcttaccgc attctctg 3180

tacgatgcca gaaacgcat caagaacggt gactcaaca atggcctcag ctgctggaat 3240
 gtgaaaggtc atgtggacgt ggaggaacag aacaatcagc gttccgtcct ggttgtgcct 3300
 5 gagtggaag ctgaagtgtc ccaagagggt agagtctgtc caggtagagg ctacattctc 3360
 cgtgtgaccg cttacaagga gggatacggg gaggggtgcg tgaccatcca cgagatcgag 3420
 10 aacaacaccg acgagcttaa gttctccaac tgcgtcgagg aagaaatcta tccaacaac 3480
 accgttactt gcaacgacta cactgtgaat caggaagagt acggaggtgc ctactatgc 3540
 cgtaacagag gttacaacga agctccttc gttctgtcg actatgcctc cgtgtacgag 3600
 15 gagaaatcct acacagatgg cagacgtgag aaccctgcy agttcaacag aggttacagg 3660
 gactacacac cactccagt tggctatgtt accaaggagc ttgagtactt tctgagacc 3720
 20 gacaaagtgt ggatcgagat cggtgaaacc gagggaaact tcatcgtgga cagcgtggag 3780
 cttctcttga tggaggaata a 3801

25 <210> 9
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintética

35 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(25)
 <223> Cebador de oligonucleótidos SQ1135

40 <400> 9
 cccgccttca gtttaaacta tcagt 25

45 <210> 10
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<220>

5 <221> caract_misc
<222> (1)..(28)
<223> Cebador de oligonucleótidos SQ1136

<400> 10
10 attggtgata tgaagataca tgcttagc 28

<210> 11
<211> 16
15 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

20

<220>
<221> caract_misc
<222> (1)..(16)
25 <223> Sonda de oligonucleótidos PB63 marcada con 6FAM

<400> 11
ttgacacaca cactaa 16

30

<210> 12
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> Sintética

40

<220>
<221> caract_misc
<222> (1)..(24)
<223> Cebador de oligonucleótidos SQ3443

45 <400> 12
cattgctgat ccatgtagat ttcc 24

	<210> 13	
	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Sintética	
10	<220>	
	<221> caract_misc	
	<222> (1)..(28)	
	<223> Cebador de oligonucleótidos SQ3445	
15	<400> 13	
	agcttgctt cctaaattag tcctactt	28
20	<210> 14	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Sintética	
30	<220>	
	<221> caract_misc	
	<222> (1)..(18)	
	<223> Cebador de oligonucleótidos SQ3446	
35	<400> 14	
	ggcgctctgc acgatgta	18
40	<210> 15	
	<211> 16	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Sintética	
	<220>	
	<221> caract_misc	
	<222> (1)..(16)	

<223> Sonda de oligonucleótidos PB1111 marcada con 6FAM

<400> 15
acatgaagcc atcaaa 16

5

<210> 16
<211> 14
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

15

<220>
<221> caract_misc
<222> (1)..(14)
<223> Sonda de oligonucleótidos PB1112 marcada con VIC

20

<400> 16
aggctcagtg gcgc 14

REIVINDICACIONES:

1. Una molécula de ADN, CARACTERIZADA PORQUE comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°:1, SEQ ID N°:2 o un complemento de la misma.
- 5 2. La molécula de ADN de la reivindicación 1, CARACTERIZADA PORQUE comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°:3, SEQ ID N°:4, SEQ ID N°:6 o un complemento de la misma.
3. La molécula de ADN de la reivindicación 2, CARACTERIZADA PORQUE consiste esencialmente de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°:3
- 10 entre las posiciones 1 a 5757, la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°:5 entre las posiciones 1 a 6426 y la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°:4 entre las posiciones 379 a 2611, o un complemento de la misma.
4. La molécula de ADN de la reivindicación 2, CARACTERIZADA PORQUE consiste esencialmente de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°:6 o
- 15 un complemento de la misma.
5. Una planta de soja, o partes de la misma, CARACTERIZADA PORQUE comprende la molécula de ADN de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. Semilla de la planta de soja de la reivindicación 5, CARACTERIZADA PORQUE dicha semilla comprende dicha molécula de ADN.
- 20 7. Una composición derivada de la planta de soja, o partes de la misma, que se describió en la reivindicación 5, CARACTERIZADA PORQUE dicha composición comprende una cantidad detectable de dicha molécula de ADN, y en donde dicha composición es un producto comercial seleccionado del grupo que consiste de fécula de soja, harina de soja, concentrado de proteínas de soja, formas

aisladas de proteínas de soja, concentrado texturizado de proteínas de soja, proteína hidrolizada de soja, aceite de soja y coberturas batidas.

8. Un método para producir una planta de soja resistente a insectos, CARACTERIZADO PORQUE comprende:

- 5 (a) cruzar la planta de soja de la reivindicación 5 con otra planta de soja;
- (b) obtener al menos una planta de la progenie derivada del cruzamiento de (a); y
- (c) seleccionar la progenie que comprende secuencias de nucleótidos de la SEQ ID N°:1 y SEQ ID N°:2, en donde dicha progenie seleccionada es una planta de
- 10 soja resistente a insectos.

9. El método de la reivindicación 8, CARACTERIZADO PORQUE dicho paso de selección (c) incluye someter dicha al menos una planta de la progenie obtenida en (b) a una reacción de amplificación de ácidos nucleicos, en donde se selecciona la progenie que produce un amplicón que comprende al menos una

15 secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°:3, SEQ ID N°:4, SEQ ID N°:5 o SEQ ID N°:6, o someter dicha al menos una planta de la progenie obtenida en (b) a una reacción de hibridación de ácido nucleico, en donde se selecciona la progenie que se hibridiza con una sonda capaz de hibridizarse bajo condiciones severas con una o más secuencias de ADN seleccionadas entre la SEQ ID N°:1 y SEQ ID N°:2.

20 10. Un método para proteger una planta de soja contra una infestación por insectos, CARACTERIZADO PORQUE comprende proporcionar en la dieta de una plaga de Lepidópteros de soja una cantidad eficaz como insecticida de célula(s) o tejido(s) de la planta de soja, o partes de la misma, de la reivindicación 5.

11. El método de la reivindicación 10, CARACTERIZADO PORQUE dicha plaga de Lepidópteros se selecciona del grupo que consiste de *Anticarsia*, *Pseudoplusia*, *Epinotia*, *Spilosoma*, *Helicoverpa*, *Spodoptera* y *Rachiplusia*.

5 12. Un par de moléculas de ADN, CARACTERIZADO PORQUE comprende: una primera molécula de ADN y una segunda molécula de ADN, en donde las moléculas de ADN son de suficiente longitud de nucleótidos contiguos de la SEQ ID N°:3 o SEQ ID N°:5 o su complemento como para funcionar como cebadores o sondas de ADN diagnósticos del ADN extraído de la planta de soja MON87701 o de la progenie de la misma.

10 13. Un par de moléculas de ADN, CARACTERIZADO PORQUE comprende: una primera molécula de ADN y una segunda molécula de ADN, en donde las moléculas de ADN son de suficiente longitud de nucleótidos contiguos de la SEQ ID N°:4 o SEQ ID N°:5 o su complemento como para funcionar como cebadores o sondas de ADN diagnósticos del ADN extraído de la planta de soja MON87701 o de la
15 progenie de la misma.

14. Un par de moléculas de ADN, CARACTERIZADO PORQUE comprende: una primera molécula de ADN y una segunda molécula de ADN, en donde las moléculas de ADN son de suficiente longitud de nucleótidos contiguos de la SEQ ID N°:6 o su complemento como para funcionar como cebadores o sondas de ADN
20 diagnósticos del ADN extraído de la planta de soja MON87701 o de la progenie de la misma.

15. El par de moléculas de ADN de cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, CARACTERIZADO PORQUE dicha primera molécula de ADN comprende 11 o más nucleótidos contiguos de cualquier porción de la región del transgen de la SEQ ID
25 N°:3 o SEQ ID N°:5, o un complemento de la misma, y dicha segunda molécula de

ADN comprende una longitud similar de una región de ADN genómico flanqueadora 5' de soja de la SEQ ID N°:3, o un complemento de la misma.

16. El par de moléculas de ADN de la reivindicación 15, CARACTERIZADO PORQUE dicha primera molécula de ADN comprende la SEQ ID N°:9 y dicha segunda
5 molécula de ADN comprende la SEQ ID N°:10.

17. El par de moléculas de ADN de cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, CARACTERIZADO PORQUE dicha primera molécula de ADN comprende 11 o más nucleótidos contiguos de cualquier porción de la región del transgen de la SEQ ID N°:4 o SEQ ID N°:5, o un complemento de la misma, y dicha segunda molécula de
10 ADN comprende una longitud similar de una región de ADN genómico flanqueadora 3' de soja de la SEQ ID N°:4, o un complemento de la misma.

18. El par de moléculas de ADN de la reivindicación 17, CARACTERIZADO PORQUE dicha primera molécula de ADN comprende la SEQ ID N°:12 y dicha segunda molécula de ADN comprende la SEQ ID N°:13.

15 19. Un método para detectar la presencia de una molécula de ADN seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID N°:3, SEQ ID N°:4, SEQ ID N°:5 y SEQ ID N°:6 en una muestra biológica, CARACTERIZADO PORQUE dicho método comprende:

(a) poner dicha muestra biológica en contacto con un par de cebadores de
20 ADN que comprenden moléculas cebadoras de ADN de suficiente longitud de nucleótidos contiguos de la SEQ ID N°:3 o su complemento, de la SEQ ID N°:4 o su complemento, de la SEQ ID N°:5 o su complemento o de la SEQ ID N°:6 o su complemento, como para funcionar como cebadores o sondas de ADN diagnósticos del ADN extraído de la planta de soja MON87701 o de la progenie de la misma;

(b) proveer condiciones para una reacción de amplificación de ácidos nucleicos;

(c) conducir dicha reacción de amplificación de ácidos nucleicos, produciendo así una molécula de ADN de amplicón; y

5 (d) detectar dicha molécula de ADN del amplicón, en donde la detección de un amplicón que comprende al menos una de la SEQ ID N°:1, la SEQ ID N°:2 y un complemento de la misma es indicativa de la presencia de dicha molécula de ADN en dicha muestra biológica.

20. El método de la reivindicación 19, CARACTERIZADO PORQUE dicha
10 muestra biológica es una muestra de ADN extraída de una planta de soja.

21. Un método para detectar la presencia de una molécula de ADN seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID N°:3, SEQ ID N°:4, SEQ ID N°:5 y SEQ ID N°:6 en una muestra biológica, CARACTERIZADO PORQUE dicho método comprende:

15 (a) poner dicha muestra biológica en contacto con una sonda de ADN que se hibridiza bajo condiciones severas con dicha molécula de ADN, y no se hibridiza bajo las condiciones severas con una muestra biológica que no contiene a dicha molécula de ADN;

(b) someter dicha muestra biológica y sonda de ADN a condiciones de
20 hibridación severas; y

(c) detectar la hibridación de dicha sonda de ADN con dicha muestra biológica, en donde la detección de la hibridación es indicativa de la presencia de dicha molécula de ADN en dicha muestra biológica.

22. El método de la reivindicación 21, CARACTERIZADO PORQUE dicha
25 muestra biológica es una muestra de ADN extraída de una planta de soja.

23. El método de la reivindicación 21 ó 22, CARACTERIZADO PORQUE dicha sonda de ADN comprende a la SEQ ID N°:1 o a la SEQ ID N°:2 o un complemento de la misma.

24. El método de la reivindicación 21 ó 22, CARACTERIZADO PORQUE
5 dicha sonda de ADN comprende a la SEQ ID N°:11 o a la SEQ ID N°:15.

25. El método de las reivindicaciones 21 a 24, CARACTERIZADO PORQUE dicha sonda de ADN está marcada con al menos un fluoróforo.

26. El método de la reivindicación 19 ó 21, CARACTERIZADO PORQUE
10 dicha muestra biológica se selecciona del grupo que consiste de fécula de soja, harina de soja, concentrado de proteínas de soja, formas aisladas de proteínas de soja, concentrado texturizado de proteínas de soja, proteína hidrolizada de soja y coberturas batidas.

27. Un conjunto de elementos para la detección de ADN, CARACTERIZADO PORQUE comprende: al menos una molécula de ADN de
15 suficiente longitud de nucleótidos contiguos homólogos o complementarios de la SEQ ID N°:3, de la SEQ ID N°:4, de la SEQ ID N°:5 o de la SEQ ID N°:6 como para funcionar como un cebador o sonda de ADN específico del evento de soja MON87701 y/o su progenie.

28. El conjunto de elementos para la detección de ADN de la reivindicación
20 27, CARACTERIZADO PORQUE dicha al menos una molécula de ADN comprende a la SEQ ID N°:1, a la SEQ ID N°:2 o a un complemento de la misma.

29. El conjunto de elementos para la detección de ADN de la reivindicación 28, CARACTERIZADO PORQUE dicha al menos una molécula de ADN es la SEQ ID N°:1, la SEQ ID N°:2 o un complemento de la misma.

30. Un método para determinar la cigosidad del ADN del genoma de una planta soja que comprende al evento de soja MON87701 en una muestra de soja, CARACTERIZADO PORQUE comprende:

- 5 (a) poner dicha muestra en contacto con un primer par de cebadores de la SEQ ID N°:12 y SEQ ID N°:13, que cuando se usan juntos en una reacción de amplificación de ácidos nucleicos con el ADN del evento de soja MON87701, produce un amplicón que es diagnóstico del evento de soja MON87701;
- (b) conducir una reacción de amplificación de ácidos nucleicos;
- (c) detectar un primer amplicón producido;
- 10 (d) poner dicha muestra en contacto con un segundo par de cebadores de la SEQ ID N°:13 y SEQ ID N°:14, que cuando se usan juntos en una reacción de amplificación de ácidos nucleicos con un ADN genómico de soja distinto del ADN del evento de soja MON87701, produce un amplicón que es diagnóstico de ADN genómico de soja distinto del ADN del evento de soja MON87701;
- 15 (e) conducir una reacción de amplificación de ácidos nucleicos; y
- (f) detectar un segundo amplicón producido; en donde la detección del amplicón que es diagnóstico del evento de soja MON87701 y del amplicón que es diagnóstico del ADN genómico de soja distinto del ADN del evento de soja MON87701 indica que dicha muestra es heterocigota para el ADN del evento de soja MON87701.
- 20 31. El método de la reivindicación 30, CARACTERIZADO PORQUE dicho primer par de cebadores se usa además junto con la sonda de la SEQ ID N°:15 y/o en donde dicho segundo par de cebadores además se usa con la sonda de la SEQ ID N°:16.

**PLANTAS Y SEMILLAS DE SOJA CORRESPONDIENTES AL EVENTO
TRANSGÉNICO MON87701 Y MÉTODOS DE DETECCIÓN DEL MISMO**

RESUMEN

- [00121] Un evento transgénico MON87701 de soja, y células, semillas y plantas
- 5 que comprenden un ADN diagnóstico del evento de soja. La invención también provee composiciones que comprenden secuencias de nucleótidos que son diagnósticos para dicho evento de soja en una muestra biológica, sondas y cebadores para su uso en la detección de secuencias de nucleótidos que son diagnósticos de la presencia de dicho evento de soja en una muestra biológica, y métodos para detectar la presencia de
- 10 dichas secuencias de nucleótidos del evento de soja en una muestra biológica. La invención provee además métodos de cultivo de las semillas de dicho evento de soja en plantas de soja, y métodos de desarrollo para producir plantas de soja que comprenden al ADN diagnóstico del evento de soja.

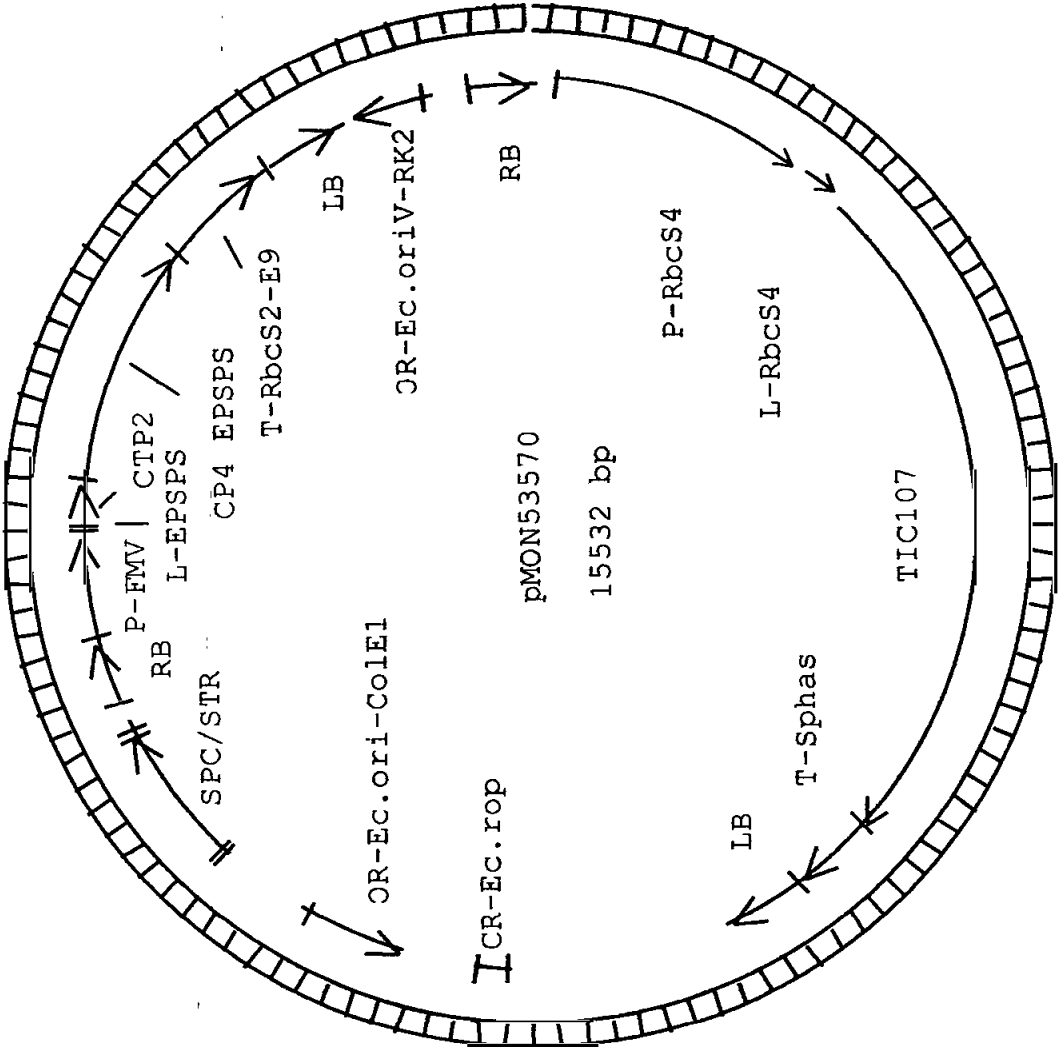


Fig. 1

F] SEQ ID N°: 6

D] SEQ ID N°: 4

E] SEQ ID N°: 5

C] SEQ ID N°: 3

B] SEQ ID N°: 2

A] SEQ ID N°: 1

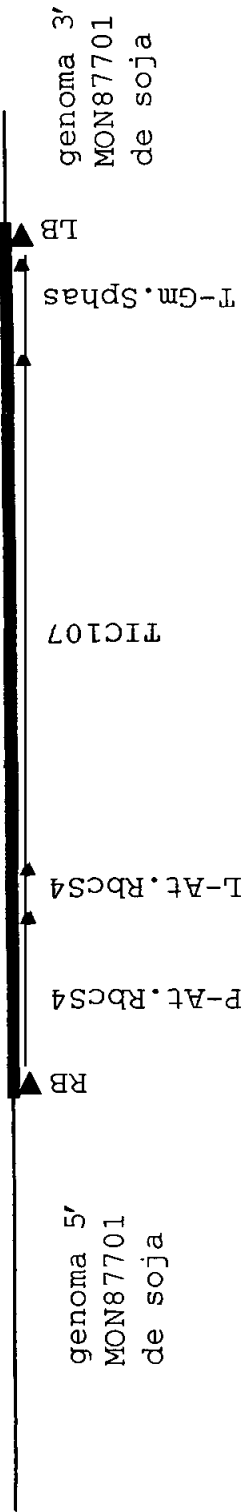


Fig. 2


Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS
SUPERINTENDENCIA PATENTE DE INVENCION ____ PCT X MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____

(21) N° de solicitud

(22) Fecha de solicitud

(51) Clasificación Internacional :

 (71) Solicitante(s) **MONSANTO TECHNOLOGY, LLC.**

 (72) Inventor(es) **AI-GUO GAO, KATHRYN H. KOLACZ, TED C. MACRAE, JOHN A. MIKLOS**

 (74) Apoderado: **DRA. MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO**

(30) Prioridad

 (31) No. Prioridad
60/988.349

 (32) Fecha
15/11/2007

 (33) Pais
US

(85) Fecha inicio fase nacional:

(87) Publicación internacional

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

 Fecha: **22/05/2009**

 Fecha de presentación de la solicitud: **06/11/2008**

 N° publicación: **WO 2009/064652 A1**

 No. de solicitud **PCT/US2008/082590**

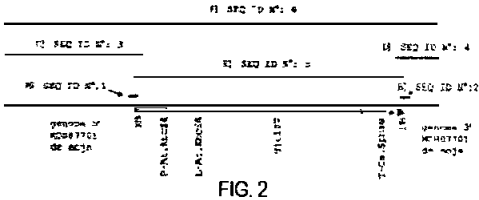
 (54) Título: **PLANTAS Y SEMILLAS DE SOJA CORRESPONDIENTES AL EVENTO TRANSGÉNICO MON87701 Y MÉTODOS DE DETECCIÓN DEL MISMO**

		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud:		(51) int. Cl.:	
22) Fecha de solicitud:		(71) Solicitante(s) MONSANTO TECHNOLOGY, LLC	
(30) Prioridad	(31) N° Prioridad 60/988.349	(32) Fecha 15/11/2007	(72) Inventor(es) AI-GUO GAO KATHRYN H. KOLACZ TED C. MACRAE JOHN A. MIKLOS
		(33) Pais US	(74) Apoderado: MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO
(85) Fecha limite inicio fase nacional:		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 22/05/2009	
Fecha de presentación de la solicitud: 06/11/2008		N° publicación: WO 2009/064652 A1	
N° de solicitud PCT/US2008/082590			
(54) Titulo: PLANTAS Y SEMILLAS DE SOJA CORRESPONDIENTES AL EVENTO TRANSGÉNICO MON87701 Y MÉTODOS DE DETECCIÓN DEL MISMO			

Reivindicación(es):

1. Una molécula de ADN, CARACTERIZADA PORQUE comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°:1, SEQ ID N°:2 o un complemento de la misma.
2. La molécula de ADN de la reivindicación 1, CARACTERIZADA PORQUE comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°:3, SEQ ID N°:4, SEQ ID N°:6 o un complemento de la misma.
3. La molécula de ADN de la reivindicación 2, CARACTERIZADA PORQUE consiste esencialmente de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°:3 entre las posiciones 1 a 5757, la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°:5 entre las posiciones 1 a 6426 y la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°:4 entre las posiciones 379 a 2611, o un complemento de la misma.
4. La molécula de ADN de la reivindicación 2, CARACTERIZADA PORQUE consiste esencialmente de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°:6 o un complemento de la misma.
5. Una planta de soja, o partes de la misma, CARACTERIZADA PORQUE comprende la molécula de ADN de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. Semilla de la planta de soja de la reivindicación 5, CARACTERIZADA PORQUE dicha semilla comprende dicha molécula de ADN.
7. Una composición derivada de la planta de soja, o partes de la misma, que se describió en la reivindicación 5, CARACTERIZADA PORQUE dicha composición comprende una cantidad detectable de dicha molécula de ADN, y en donde dicha composición es un producto comercial seleccionado del grupo que consiste de fécula de soja, harina de soja, concentrado de proteínas de soja, formas aisladas de proteínas de soja, concentrado texturizado de proteínas de soja, proteína hidrolizada de soja, aceite de soja y coberturas batidas.
8. Un método para producir una planta de soja resistente a insectos, CARACTERIZADO PORQUE comprende:
- (a) cruzar la planta de soja de la reivindicación 5 con otra planta de soja;
- (b) obtener al menos una planta de la progenie derivada del cruzamiento de (a); y
- (c) seleccionar la progenie que comprende secuencias de nucleótidos de la SEQ ID N°:1 y SEQ ID N°:2, en donde dicha progenie seleccionada es una planta de soja resistente a insectos.

9. El método de la reivindicación 8, CARACTERIZADO PORQUE dicho paso de selección (c) incluye someter dicha al menos una planta de la progenie obtenida en (b) a una reacción de amplificación de ácidos nucleicos, en donde se selecciona la progenie que produce un amplicón que comprende al menos una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°:3, SEQ ID N°:4, SEQ ID N°:5 o SEQ ID N°:6, o someter dicha al menos una planta de la progenie obtenida en (b) a una reacción de hibridación de ácido nucleico, en donde se selecciona la progenie que se hibridiza con una sonda capaz de hibridarse bajo condiciones severas con una o más secuencias de ADN seleccionadas entre la SEQ ID N°:1 y SEQ ID N°:2.
10. Un método para proteger una planta de soja contra una infestación por insectos, CARACTERIZADO PORQUE comprende proporcionar en la dieta de una plaga de Lepidópteros de soja una cantidad eficaz como insecticida de célula(s) o tejido(s) de la planta de soja, o partes de la misma, de la reivindicación 5.
11. El método de la reivindicación 10, CARACTERIZADO PORQUE dicha plaga de Lepidópteros se selecciona del grupo que consiste de *Anticarsia*, *Pseudoplusia*, *Epinotia*, *Spilosoma*, *Helicoverpa*, *Spodoptera* y *Rachiplusia*.
12. Un par de moléculas de ADN, CARACTERIZADO PORQUE comprende: una primera molécula de ADN y una segunda molécula de ADN, en donde las moléculas de ADN son de suficiente longitud de nucleótidos contiguos de la SEQ ID N°:3 o SEQ ID N°:5 o su complemento como para funcionar como cebadores o sondas de ADN diagnósticos del ADN extraído de la planta de soja MON87701 o de la progenie de la misma.





LISTA DE CHEQUEO
ADMISION A TRAMITE - NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCION ☐ **MODELO DE UTILIDAD** ☐ **Art. 33 Decisión 486/00**

- ☐ Indicación que se solicita una patente
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ **MODELO DE UTILIDAD PCT** ☐ **Art. 33 Decisión 486/00**
Circular Única

- ☒ Indicación que se solicita una PCT
- ☒ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☒ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☒

Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ **(Art. 119 Decisión 486/00)**

- ☐ Indicación que se solicita diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ **(Art. 92 Decisión 486/00)**

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐