

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

*Handwritten:* PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-095145- -00000-0000

Fecha: 2011-07-28 17:41:29 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 198

ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. EXPEDIENTE No.

*Handwritten:* 11-95145

SOJA EVENTO 127 Y MÉTODOS RELACIONADOS CON LA MISMA

54. TITULO

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL

BASF AGROCHEMICAL PRODUCTS B.V. Y

71. SOLICITANTE

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA-EMBRAPA

DOMICILIO

ARNHEM, PAÍSES BAJOS Y BRASILIA, DF, BRASIL

74. APODERADO

JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

22. BOGOTÁ, D.C.

AS: 117.665

## PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-095145-00000-0000

Fecha: 2011-07-28 17:41:29 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 198

**FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE**  
**PCT**  
**ENTRADA EN FASE NACIONAL**

1

## SOLICITUD DE:



Patente de Invención.



Patente de Modelo de Utilidad.



Capítulo I.



Capítulo II.

2

## SOLICITANTE

Nombre: **BASF AGROCHEMICAL PRODUCTS B.V. y EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA-EMBRAPA**

Dirección: Groningensingel 1 NL-6835 EA Arnhem, Países Bajos y Parque Estação Biologica - Pqeb s/n Edificio Sede, Plano Piloto 70770-901 Brasília, DF - Brasil - CEP

Nacionalidad o Domicilio: Países Bajos y Brasil  
Lugar de Constitución: Países Bajos y Brasil  
Teléfono: Fax:  
E-mail

## IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual \_\_\_\_\_  
Número \_\_\_\_\_

3

## REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO**Dirección: **Calle 70 A #4-41, Bogotá, Colombia.**

Teléfono: 744-2200 Fax: 742-2200  
E-mail:

## IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual \_\_\_\_\_  
Número **80.410.337 TP 57492**

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sirvase indicar el número de radicación (del poder). \_\_\_\_\_

4

INVENTOR (ES)  
(72)

Nombre: <sup>1</sup>CARLSON, Dale; <sup>2</sup>ARAGAO, Francisco Jose, Lima; <sup>3</sup>ARIAS, Carlos, Alberto, Arrabal; <sup>4</sup>LOUZANO, Luiz; <sup>5</sup>LUZZI, Bruce, M.; <sup>6</sup>MALEFYT, Tim; <sup>7</sup>FILHO, Elibio Leopoldo, Rech; <sup>8</sup>TAN, Siyuan; <sup>9</sup>ULBRICH, Adolfo; <sup>10</sup>YOTSUMOTO, Tadashi; <sup>11</sup>LINEMANN, Ute.

Dirección: <sup>1</sup>600 Sawcut Lane, Apex, NC 27502, Estados Unidos de América; <sup>2</sup>Embrapa Recursos Geneticos e Biotecnologia, Parque Estação Biologica - Pqeb - Av., W5 Norte (final), Mail Box 02372, 70770-900 Brasília, DF, Brasil; <sup>3</sup>Embrapa Soja, Rod. Carlos João Strass - Distrito de Warta, Mail Box 231, CEP 86001-970, Brasília, DF, Brasil; <sup>4</sup>Rua Ministro Joau Mendes 57/81, 11040-261 Santos SP, Brasil; <sup>5</sup>11105 Maplecroft Court, Raleigh, NC 27617, Estados Unidos de América; <sup>6</sup>5 Cherry Canyon Drive, Stroudsburg, PA 18360, Estados Unidos de América; <sup>7</sup>Embrapa Recursos Geneticos e Biotecnologia, Parque Estação Biologica - Pqeb - Av., W5 Norte (final), Mail Box 02372, 70770-900 Brasília, DF, Brasil; <sup>8</sup>1200 Wheelwright, Cary, NC 27519, Estados Unidos de América; <sup>9</sup>Rua Julio Munareto, 72, 86047-320 Londrina-PR, Brasil; <sup>10</sup>Av. Brigadeiro Faria Lima, 3.600, 04538-132 San Paulo, Brasil; <sup>11</sup>Wasserstrasse 1, 06466 Gatersleben, Alemania, respectivamente.

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América, Brasil y Alemania respectivamente.

## 5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2010/020252Fecha 06.01.2010Publicación Internacional No. WO 2010/080829 A1Fecha 15.07.20106 Título (54): SOJA EVENTO 127 Y MÉTODOS RELACIONADOS CON LA MISMA7 Clasificación Internacional (51): A01H 5/10 - C12N 15/82 - C12Q 1/68

## 8 Prioridad

SI ☒NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

07.01.2009

(31) Número de Solicitud

61/143,049

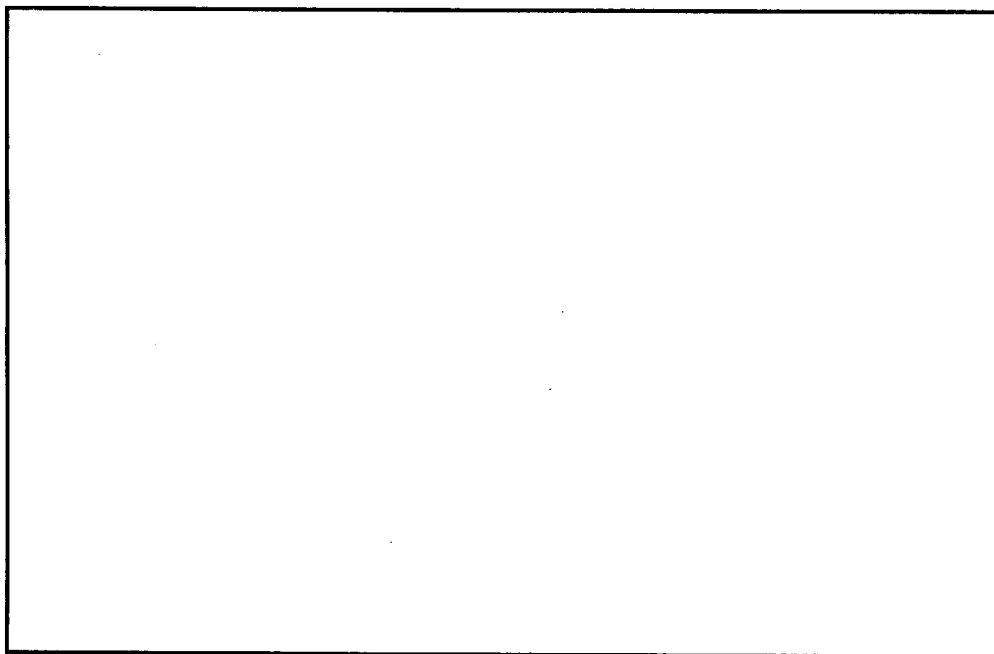
9 Comprobante de pago No. 11-63176, 11-7514, 11-7515, 11-31972, 11-33036Fecha 25-07-2011

10

## ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. \$ 571.000
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal de la persona jurídica peticionaria, en cuanto no esté inscrita en alguna Cámara de Comercio Colombiana.
- ☐ Poderes, si fuere el caso. Fotocopia autenticada.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante. Fotocopia autenticada.
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al español (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción de 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 bajo el Art. 34.
- ☒ Otros: Comprobante(s) de pago de la tasa por concepto de reivindicaciones adicionales \$ 1.188.000 (44\*\$27.000).

## 11 FIGURA CARACTERÍSTICA:



12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

FIRMA:

C.C. 80.410.337 de Usaquén TP 57492 del C.S.J.

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página.

117 665<sup>3</sup>

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



Industria y Comercio  
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0063176

Bogotá D.C., Junio 30 de 2011 - 08:30:19

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.

NI 860.047.372

\*\*\* Soporte del Pago \*\*\*

| TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PAGO | VR. PAGO      |
|--------------|-----------------|-----------|-----------|------------|---------------|
| CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 430542291 | 29/06/2011 | 29.559.200.00 |

\*\*\* Conceptos Pagados \*\*\*

| CANT. | RENTISTICO  | CONCEPTO                                | Vr. UNDITARIO | Vr. CONCEPTO                    |
|-------|-------------|-----------------------------------------|---------------|---------------------------------|
| 1     | 50005-01-09 | OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL | 99            | OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS |
|       |             |                                         | 571.000.00    | 571.000.00                      |
|       |             |                                         |               | \$571.000.00                    |

SON: \*\*QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE\*\*

Responsable: \_\_\_\_\_

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. \_\_\_\_\_

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-095145- -00000-0000

Fecha: 2011-07-28 17:41:29 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 198

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Linea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Junio 30 de 2011 - 08:30:27

1176654

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 007514

Bogotá D.C., Enero 27 de 2011 - 08:21:51

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.

NI 860.047.372

\*\*\* Soporte del Pago \*\*\*

| TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PAGO | VR. PAGO      |
|--------------|-----------------|-----------|-----------|------------|---------------|
| CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 411745924 | 26/01/2011 | 51.520.000.00 |

\*\*\* Conceptos Pagados \*\*\*

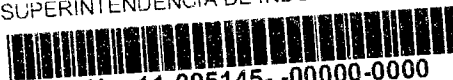
| CANT. | RENTISTICO                                          | CONCEPTO                           | Vr.UNDITARIO | Vr.CONCEPTO  |
|-------|-----------------------------------------------------|------------------------------------|--------------|--------------|
| 1     | 50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL | 99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS | 540.000.00   | 540.000.00   |
|       |                                                     |                                    |              | \$540.000.00 |

SON: \*\*QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE\*\*\*

Responsable:

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. \_\_\_\_\_

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-095145- -00000-0000

Fecha: 2011-07-28 17:41:29 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 198

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Linea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Enero 27 de 2011 - 08:22:26

1176655

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 007515

Bogotá D.C., Enero 27 de 2011 - 08:21:51

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.

NI 860.047.372

\*\*\* Soporte del Pago \*\*\*

| TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PAGO | VR. PAGO      |
|--------------|-----------------|-----------|-----------|------------|---------------|
| CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 411745924 | 26/01/2011 | 51.520.000.00 |

\*\*\* Conceptos Pagados \*\*\*

| CANT. | RENTISTICO                                          | CONCEPTO                           | Vr.UNDITARIO | Vr.CONCEPTO  |
|-------|-----------------------------------------------------|------------------------------------|--------------|--------------|
| 1     | 50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL | 99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS | 540.000.00   | 540.000.00   |
|       |                                                     |                                    |              | \$540.000.00 |
|       |                                                     |                                    | =====        |              |

SON: \*\*QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE\*\*

Responsable:

\*\*\*\*\*

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. \_\_\_\_\_

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-095145- -00000-0000

Fecha: 2011-07-28 17:41:29

Tra. 11 PATENTEIYII

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Eve. 378 FASENACIONALI

Folios: 198

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Enero 27 de 2011 - 08:22:26

117665<sup>6</sup>

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0031972

Bogotá D.C., Abril 03 de 2011 - 12:50:28

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.

NI 860.047.372

\*\*\* Soporte del Pago \*\*\*

| TIPO PAGO    | BANCO     | CUENTA | No. PAGO   | FECHA PAGO | VR. PAGO     |
|--------------|-----------|--------|------------|------------|--------------|
| CONSIGNACION | 999999999 | 31960  | 06/04/2011 |            | 4.507.000.00 |

\*\*\* Conceptos Pagados \*\*\*

| CANT. | RENTISTICO                                          | CONCEPTO                           | Vr.UNDITARIO | Vr.CONCEPTO |
|-------|-----------------------------------------------------|------------------------------------|--------------|-------------|
| 1     | 50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL | 99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS | 54.000.00    | 54.000.00   |
|       |                                                     |                                    |              | \$54.000.00 |

=====

SON: \*\*CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE\*\*

Responsable: \_\_\_\_\_

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. \_\_\_\_\_

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-095145- 00000-0000

Fecha: 2011-07-28 17:41:29 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 198

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Linea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Abril 6 de 2011 - 12:50:30

117665.7

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-

Industria y Comercio  
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0033036

Bogotá D.C., Abril 11 de 2011 - 07:12:31

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.

NI 860.047.372

\*\*\* Soporte del Pago \*\*\*

| TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PAGO | VR. PAGO      |
|--------------|-----------------|-----------|-----------|------------|---------------|
| CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 391765975 | 08/04/2011 | 43.684.700.00 |

\*\*\* Conceptos Pagados \*\*\*

| CANT. | RENTISTICO                                          | CONCEPTO                           | Vr.UNDITARIO | Vr.CONCEPTO |
|-------|-----------------------------------------------------|------------------------------------|--------------|-------------|
| 1     | 50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL | 99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS | 54.000.00    | 54.000.00   |
|       |                                                     |                                    |              | \$54.000.00 |

SON: \*\*CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE\*\*\*

Responsable

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-095145- -00000-0000

Fecha: 2011-07-28 17:41:29 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 198

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Abril 11 de 2011 - 07:12:40

- (51) International Patent Classification:  
A01H 5/10 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)  
C12N 15/82 (2006.01)

(21) International Application Number:  
PCT/US2010/020252

(22) International Filing Date:  
6 January 2010 (06.01.2010)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
61/143,049 7 January 2009 (07.01.2009) US

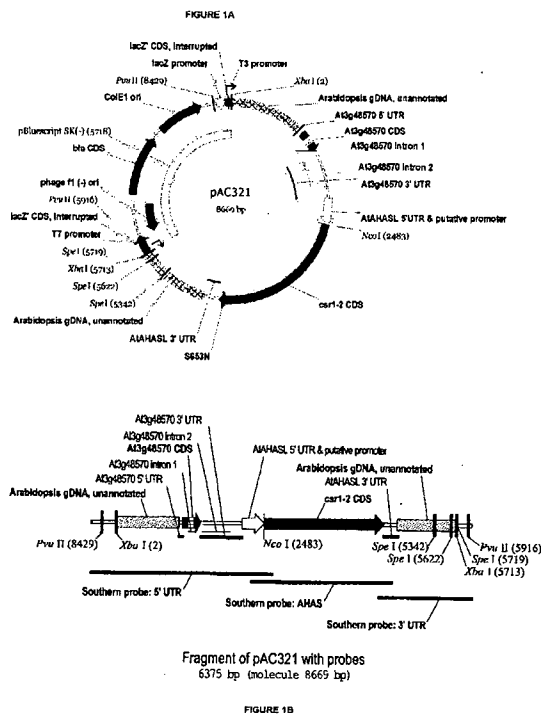
(71) Applicants (for all designated States except US): BASF AGROCHEMICAL PRODUCTS B.V. [NL/NL]; Groningensingel 1, NL-6835 EA Arnhem (NL). EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA-EMBRAPA [BR/BR]; Parque Estacao Biologica - Pqeb s/n, Edificio Sede, Plano Piloto, 70770-901 Brasilia, DF - Brasil - CEP (BR).

(72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): CARLSON, Dale [US/US]; 600 Sawcut Lane, Apex, NC 27502 (US). ARAGAO, Francisco Jose, Lima [BR/BR]; Embrapa Recursos Geneticos E Biotecnologia, Parque Estacao Biologica - Pqeb - Av., W5 Norte (final), Mail Box 02372, 70770-900 Brasilia, DF (BR). ARRABAL, Carlos Alberto, Arias [BR/BR]; Embrapa Soja, Rod. Carlos Joao Strass - Distrito De Warta, Mail Box 231, Cep 86001-970, Brasilia, DF (BR). LOUZANO, Luiz [BR/BR]; Rua Ministro Joao Mendes 57/81, 11040-261 Santos Sp (BR). LUZZI, Bruce, M. [US/US]; 11105 Maplecroft Court, Raleigh, NC 27617 (US). MALEFYT, Tim [US/US]; 5 Cherry Canyon Drive, Stroudsburg, PA 18360 (US). FILHO, Elibio Leopoldo, Rech [BR/BR]; Embrapa Recursos Geneticos E Biotecnologia, Parque Estacao Biologica - Pqeb - Av., W5 Norte (final), Mail Box 02372, 70770-900 Brasilia, DF (BR). TAN, Siyuan [CL/US]; 1200 Wheelwright, Cary, NC 27519 (US). ULBRICH, Adolfo [BR/BR]; Rua Julio Munareto, 72, 86047-320 Londrina-PR (BR). YOTSUMOTO, Tadashi [BR/BR]; Av. Brigadeiro Faria Lima, 3.600, 04538-132

[Continued on next page]

- (54) Title: SOYBEAN EVENT 127 AND METHODS RELATED THERETO

(57) Abstract: Compositions and methods related to transgenic AHAS-inhibiting herbicide resistant soybean plants are provided. Event 127 soybean plants having a mutated AHAS coding sequence which imparts tolerance to an AHAS-inhibiting herbicide are provided. The event 127 soybean plants having the event 127 nucleic acid molecule at the identified chromosomal location may comprise genomic/transgene junctions having at least the nucleic acid sequence of SEQ ID NO: 5 and/or 6. The characterization of the genomic insertion site of the event 127 provides for an enhanced breeding efficiency and enables the use of molecular markers to track the transgene insert in the breeding populations and progeny thereof. Various methods and compositions for the identification, detection, and use of the event 127 soybean plants are provided.



WO 2010/080829 A1

WO 2010/080829 A1



San Paulo (BR). LINEMANN, Ute [DE/DE]; Wasserstrasse 1, 06466 Gatersleben (DE).

(74) Agents: ELLIOTT, Joshua, T. et al.; Brinks Hofer Gilson & Lione, P.O. Box 1340, Morrisville, NC 27560 (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, CL, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, 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, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Published:**

- with international search report (Art. 21(3))
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA BAJO EL TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad  
Intelectual  
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación Internacional  
15 de julio de 2010 (15.07.2010)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
WO 2010/080829 A1

- (51)

Clasificación Internacional de Patentes:  
A01H 5/10 (2006.01)  
C12N 15/82 (2006.01)
- (21)

Numero de Solicitud Internacional:  
PCT/US2010/020252
- (22)

Fecha de Presentación Internacional:  
06 de enero de 2010 (06.01.2010)
- (25)

Lenguaje de entrega:  
Inglés
- (26)

Lenguaje de Publicación:  
Inglés
- (30)

Datos de la Prioridad:  
61/143,049 07 de enero de 2009 (07.01.2009) US
- (71)

Solicitante (para todos los Estados designados menos los Estados Unidos): BASF AGROCHEMICAL PRODUCTS B.V. [NL/NL]; Groningensingel 1, NL-6835 EA Arnhem (NL). EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA-EMBRAPA [BR/BR]; Parque Estacao Biologica - Pqeb s/n, Edificio Sede, Plano Piloto, 70770-901 Brasilia, DF - Brasil - CEP (BR).
- (72)

Inventores; e
- (75)

Inventores/Solicitantes (solo para los Estados Unidos): CARLSON, Dale [US/US]; 600 Sawcut Lane, Apex, NC 27502 (US). ARAGAO, Francisco Jose, Lima [BR/BR]; Embrapa Recursos Geneticos e Biotecnologia, Parque Estação Biologica - Pqeb - Av., W5 Norte (final), Mail Box 02372, 70770-900 Brasília, DF (BR). ARIAS, Carlos, Alberto, Arrabal [BR/BR]; Embrapa Soja, Rod. Carlos João Strass – Distrito de Warta, Mail Box 231, CEP 86001-970, Brasilia, DF (BR). LOUZANO, Luiz [BR/BR]; Rua Ministro Joau Mendes 57/81, 11040-261 Santos SP (BR). LUZZI, Bruce, M. [US/US]; 11105 Maplecroft Court, Raleigh, NC 27617 (US). MALEFYT, Tim [US/US]; 5 Cherry Canyon Drive, Stroudsburg, PA 18360 (US). FILHO, Elibio Leopoldo, Rech [BR/BR]; Embrapa Recursos Geneticos e Biotecnologia, Parque Estação Biologica - Pqeb - Av., W5 Norte (final), Mail Box 02372, 70770-900 Brasília, DF (BR). TAN, Siyuan [CL/US]; 1200 Wheelwright, Cary, NC 27519 (US). ULBRICH, Adolfo [BR/BR]; Rua Julio Munareto, 72, 86047-320 Londrina-PR (BR). YOTSUMOTO, Tadashi [BR/BR]; Av. Brigadeiro Faria Lima, 3.600, 04538-132 San Paulo (BR).

(Continúa en la siguiente página)

(54) Título: SOJA EVENTO 127 Y MÉTODOS RELACIONADOS CON LA MISMA

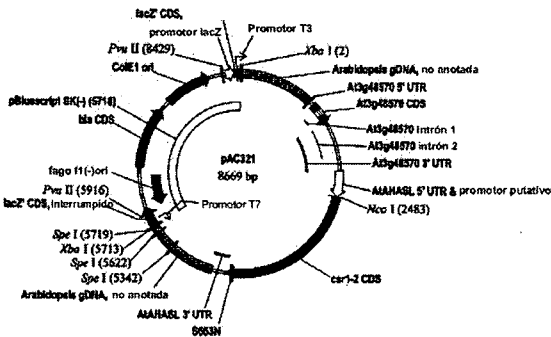
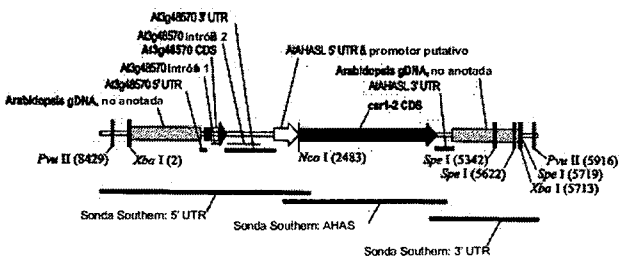


FIGURA 1A



Fragmento de pAC321 con sondas  
8375 bp (molécula 8669 bp)

FIGURA 1B

(57) Resumen: Se proporcionan composiciones y métodos relacionados con plantas de soja transgénicas resistentes a herbicidas inhibidores de AHAS. Las plantas de soja evento 127 tienen una secuencia de codificación de AHAS mutada que confiere tolerancia a un herbicida inhibidor de AHAS. Las plantas de soja evento 127 que tienen la molécula de ácido nucleico de evento 127 en la ubicación cromosómica identificada pueden comprender uniones genómicas/del transgenes que tienen al menos la secuencia de ácido nucleico de SEC ID NOs: 5 y/o 6. La caracterización del sitio de inserción genómica del evento 127 proporciona una mayor eficiencia del cultivo y permite el uso de marcadores moleculares para seguir la inserción de transgenes en las poblaciones de cultivo y la progenie de las mismas. Se proporcionan diversos métodos y composiciones para la identificación, detección y utilización de plantas de soja evento 127.



**LINEMANN, Ute** [DE/DE]; Wasserstrasse 1, 06466  
Gatersleben (DE).

**(74) Agente: ELLIOTT, Joshua, T. et al;** Brinks Hofer Gilson  
& Lione, P.O. Box 1340, Morrisville, NC 27560 (US)

**(81) Estados Designados** (a menos que se indique lo  
contrario, para todo tipo de protección nacional  
disponible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC,  
SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN,  
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

**(84) Estados Designados** (a menos que se indique lo  
contrario, para todo tipo de protección regional  
disponible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW,  
MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
Euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,  
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,  
LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK,  
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,  
GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publicado:**

- con el informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes del vencimiento de la fecha límite para modificar las  
reivindicaciones y ser publicado nuevamente en el evento  
de recibir modificaciones (Regla 48.2(h))
- con un listado de secuencias parte de la descripción  
(Regla 5.2(a))

## SOJA EVENTO 127 Y MÉTODOS RELACIONADOS CON LA MISMA

### Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

[0001] Esta solicitud reclama el beneficio de la Solicitud Provisional Estadounidense No. 61/143.049, presentada el 7 de enero de 2009, cuyo contenido completo se incorpora a la presente como referencia.

### Campo

[0002] La invención se refiere en general a biología molecular y a composiciones y métodos para aumentar la tolerancia de plantas a herbicidas inhibidores de acetohidroxiácido sintasa y a composiciones y métodos para el control de malezas.

### Antecedentes

[0003] La soja (*Glycine max*) es un cultivo importante en muchas regiones del mundo. Se han aplicado métodos biotecnológicos a la soja para la mejora de las características agronómicas y la calidad del producto. Una característica agronómica importante en la producción de soja es la tolerancia a los herbicidas, en particular, la tolerancia al herbicida glifosato. Como el uso de soja tolerante a glifosato ha crecido, han surgido malezas que son tolerantes al mismo. Por lo tanto, hay una necesidad de plantas de soja que tengan tolerancia a herbicidas distintos del glifosato para el manejo de las malezas.

[0004] La expresión fenotípica de un transgén (como los que proporcionan tolerancia a herbicidas) en una planta, como la soja, se ve afectada por la estructura del gen en sí mismo y por su la ubicación de su integración en el genoma de la planta. Al mismo tiempo, la presencia del transgén (en un ADN extraño) en diferentes lugares en el genoma influirá en el fenotipo global de la planta de diferentes maneras. La introducción exitosa agronómica o industrial de una característica de interés comercial en una planta por manipulación genética puede ser un proceso largo y depende de diferentes factores. La transformación real y la regeneración de plantas transformadas genéticamente son sólo las primeras de una serie de etapas de selección, que incluyen la caracterización genética amplia, el cultivo y la evaluación en ensayos de campo, llevando eventualmente a la selección de un evento de elite.

La capacidad para detectar y/o identificar claramente determinados eventos transgénicos es cada vez más importante debido a la mayor utilización de la modificación genética en el mejoramiento de cultivos, para mejorar la introgresión de transgenes en las variedades comerciales, para la segregación de organismos

modificados genéticamente (OMG) y no modificados genéticamente, y para la identificación de material patentado. Sigue siendo necesario el desarrollo de métodos que sean a la vez rápidos y sencillos, sin la necesidad de un gran equipamiento de laboratorio, para la detección de eventos transgénicos determinados. Además, los métodos para la detección de un evento en particular sería útiles para cumplir con las regulaciones que requieren la aprobación previa a la comercialización y la rotulación de alimentos derivados de plantas de cultivo recombinantes, o para su utilización en el monitoreo ambiental, el monitoreo de características en los cultivos en el campo, o el monitoreo de productos derivados de una cosecha de cultivos, así como para su uso en garantizar el cumplimiento de las partes sujetas a términos regulatorios o contractuales.

### Resumen

[0005] En una realización, la presente invención proporciona métodos para el control de malezas en un área cultivada, que comprenden: la aplicación de una cantidad efectiva de un herbicida no selectivo a la superficie cultivada que tiene una planta de soja que incluye una molécula de ácido nucleico de evento 127.

[0006] En otra realización, la presente invención proporciona métodos para el control de malezas tolerantes a glifosato en un campo de cultivo, que comprenden: la aplicación de una cantidad efectiva de un herbicida inhibidor de AHAS al campo de cultivo que tiene una planta de soja que incluye una molécula de ácido nucleico de evento 127.

[0007] En aún otra realización, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que tiene la secuencia de ácido nucleico de las posiciones 1312 a 6069 de SEC ID NO: 1.

[0008] En otra realización, la presente invención también proporciona plantas de soja transgénica con una molécula de ácido nucleico heterólogo que tiene la secuencia de ácidos nucleicos de los nucleótidos 1302 a 6079 de SEC ID NO: 1.

[0009] La presente invención también proporciona un par aislado de cebadores de ácido nucleico que comprende: una primera y una segunda molécula de ácido nucleico aislada capaz de amplificar una molécula de ácido nucleico de evento 127.

[0010] En otra realización, la presente invención proporciona un kit para la identificación de una molécula de ácido nucleico de evento 127 en una muestra biológica, que comprende: un primer y un segundo cebador de ácido nucleico,

donde el primero y segundo cebadores de ácido nucleico son capaces de amplificar una molécula de ácido nucleico de evento 127.

[0011] La presente invención también proporciona métodos para la identificación de una planta de soja evento 127, que comprenden: (a) formar una mezcla que comprende una muestra biológica que contiene ADN de soja y un primer y segundo cebadores de ácido nucleico capaces de amplificar una molécula de ácido nucleico específica de un evento 127; (b) hacer reaccionar la mezcla en condiciones que permiten que el primer y segundo cebadores de ácido nucleico amplifiquen una molécula de ácido nucleico específica de un evento 127; y (c) detectar la presencia del fragmento amplificado de la molécula de ácido nucleico, donde la presencia de la molécula de ácido nucleico específica de soja evento 127 indica que la planta de soja es una planta de soja evento 127.

[0012] En aún otra realización, la presente invención proporciona métodos para la identificación de una planta de soja que tiene una molécula de ácido nucleico de evento 127, que comprenden: (a) formar una mezcla que comprende una muestra biológica que contiene ADN de soja y una molécula de ácido nucleico sonda que es capaz de hibridizar con una molécula de ácido nucleico específica de un evento 127; (b) hacer reaccionar la mezcla en condiciones que permiten que la molécula de ácido nucleico sonda hibridice con una molécula de ácido nucleico específica de un evento 127; y (c) detectar la hibridización de la sonda con el ADN, donde la presencia de la hibridización de la molécula de ácido nucleico sonda con el ADN de soja indica la presencia de una molécula de ácido nucleico de evento 127.

[0013] La presente invención proporciona además métodos para aumentar el rendimiento en una planta de soja que comprende una molécula de ácido nucleico de evento 127, el método comprende: aplicar una cantidad efectiva de un herbicida inhibidor de AHAS a una o más plantas de soja que comprenden una molécula de ácido nucleico de evento 127 y al área circundante, donde el herbicida inhibidor de AHAS reduce el crecimiento de malezas en el área circundante, y cosechar semillas de una o más plantas de soja.

[0014] En otra realización, la presente invención proporciona métodos para cultivar una planta de soja resistente a un herbicida inhibidor de AHAS, que comprenden: (a) cruzar una planta de soja que comprende una molécula de ácido nucleico de evento 127 con una segunda planta de soja; (b) obtener semillas de la cruce de la etapa (a); (c) obtener una muestra de ADN de la semilla; y (d) detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico de evento 127 en la muestra,

donde la presencia de la molécula de ácido nucleico de evento 127 indica que la semilla es capaz de producir una planta de soja resistente a un herbicida inhibidor de AHAS.

[0015] La presente invención también proporciona una semilla de una planta de soja que comprende una molécula de ácido nucleico de evento 127.

[0016] En aún otra realización, la presente invención proporciona métodos para detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico de evento 127 en una muestra biológica, que comprenden: (a) formar una mezcla que comprende una muestra biológica que contiene ADN y un primer y segundo cebadores de ácido nucleico capaces de amplificar una molécula de ácido nucleico específica de un evento 127; (b) hacer reaccionar la mezcla en condiciones que permiten que el primer y segundo cebadores de ácido nucleico amplifiquen la molécula de ácido nucleico que comprende una molécula de ácido nucleico específica de un evento 127; y (c) detectar la presencia de la molécula de ácido nucleico amplificada, donde la presencia de la molécula de ácido nucleico específica de un evento 127 indica que la muestra contiene una molécula de ácido nucleico de evento 127.

[0017] En otra realización, la presente invención proporciona métodos para la detección de una molécula de ácido nucleico de evento 127 en una muestra biológica que comprenden: (a) formar una mezcla que comprende una muestra biológica que contiene ADN y una sonda de ácido nucleico capaz de hibridizar con una molécula de ácido nucleico específica de un evento 127; (b) hacer reaccionar la mezcla en condiciones que permiten que la sonda hibridice con una molécula de ácido nucleico específica de un evento 127; y (c) detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico hibridizada, donde la presencia de la molécula de ácido nucleico específica de un evento 127 indica que la muestra contiene una molécula de ácido nucleico específica de un evento 127.

[0018] La presente invención también proporciona métodos para detectar la presencia de una molécula de inserto de ácido nucleico de evento 127 en una muestra biológica, que comprenden: (a) formar una mezcla que comprende una muestra biológica que contiene ADN y un primer y un segundo cebadores capaces de amplificar una molécula de inserto de ácido nucleico de evento 127; (b) hacer reaccionar la mezcla en condiciones que permiten que el primer y segundo cebadores de ácido nucleico amplifiquen la molécula de ácido nucleico que comprende una molécula de inserto de ácido nucleico de evento 127; y (c) detectar la presencia de la molécula de ácido nucleico amplificada, donde la presencia de la molécula de inserto de ácido nucleico de evento 127 indica que la

muestra contiene inserto de ADN de evento 127.

[0019] En aún otra realización, la presente invención proporciona métodos para detectar la presencia de una molécula de inserto de ácido nucleico de evento 127 en una muestra biológica, que comprenden: (a) formar una mezcla que comprende una muestra biológica que contiene ADN y un primer cebador capaz de hibridizar con una región de la molécula de inserto de ácido nucleico de evento 127 y un segundo cebador capaz de hibridizar con una molécula de ácido nucleico flanqueante en el genoma de una célula huésped; (b) hacer reaccionar la mezcla en condiciones que permiten que el primer y segundo cebadores de ácido nucleico produzcan una molécula de ácido nucleico amplificada que comprende un fragmento de la molécula de inserto de ácido nucleico de evento 127; y (c) detectar la presencia de la molécula de ácido nucleico amplificada, donde la presencia del fragmento de la molécula de inserto de ácido nucleico de evento 127 indica que la muestra contiene inserto de ADN de evento 127.

[0020] En otra realización, la presente invención proporciona métodos para el cultivo de una planta de soja, que comprenden: (a) proporcionar una semilla de soja que comprende una molécula de ácido nucleico de evento 127; (b) sembrar la semilla de soja en un medio de cultivo bajo condiciones que permiten que la semilla germine para producir una planta de soja en desarrollo que comprende una molécula de ácido nucleico de evento 127; y (c) poner en contacto el medio de cultivo, la semilla o planta con una composición herbicida que comprende al menos un componente seleccionado del grupo que consiste de herbicidas imidazolinonas herbicidas sulfonilureas, combinaciones de los mismos entre sí, y combinaciones de los mismos con al menos un principio activo.

[0021] En aún otra realización, la presente invención proporciona métodos para la detección de un polipéptido de evento 127 en una muestra, que comprenden: la obtención de una muestra biológica de una planta de soja, y la realización de al menos un ensayo inmunológico en la muestra, donde el ensayo es capaz de detectar un polipéptido de evento 127.

[0022] La presente invención también proporciona dispositivos para usar en la detección de moléculas biológicas, que comprenden: un soporte sólido que tiene una superficie, y al menos una molécula diagnóstica de evento 127 adherida a la superficie del soporte sólido.

### Breve descripción de los dibujos

[0023] La Figura 1A proporciona una representación esquemática del plásmido pAC321. La Figura 1B proporciona una representación esquemática del fragmento *PvuII* de pAC321 que contiene el 5' UTR *AHASL*, la secuencia de codificación *csr1-2* y el 3' UTR *AHASL* que se utilizó para la transformación. Se indican los sitios de restricción de las enzimas (*NcoI*, *XbaI*, *SpeI*) utilizados para el análisis de transferencia tipo Southern del número de copias, ausencia de esqueleto y estabilidad intergeneracional.

[0024] La Figura 2 proporciona una representación esquemática de los antecedentes de cultivo de un ejemplo de una planta de soja evento 127.

[0025] La Figura 3 proporciona una representación esquemática de un alineamiento del fragmento de transformación pAC321 *PvuII* con el inserto de soja evento 127.

[0026] Las Figuras 4A-4C proporcionan los resultados de una hibridización por transferencia tipo Southern del número de copias del inserto en un ejemplo de planta de soja evento 127 según se describe en el Ejemplo 3. La Figura 4D proporciona una representación esquemática de las ubicaciones relativas de las sondas utilizadas en los experimentos de hibridización.

[0027] La Figura 5 proporciona los resultados de una hibridización por transferencia tipo Southern que muestra la ausencia de la secuencia esqueleto de vectores en un ejemplo de una planta de soja evento 127 según se describe en el Ejemplo 3. La Figura 5A proporciona los resultados utilizando una sonda VP1, y la Figura 5B proporciona los resultados utilizando una sonda VP2. La Figura 5C proporciona una representación esquemática de las ubicaciones relativas de las regiones de hibridización en la secuencia de evento 127.

[0028] La Figura 6 presenta los resultados de un análisis de hibridización por transferencia tipo Southern de la estabilidad intergeneracional de la secuencia de evento 127. La Figura 6A proporciona los resultados usando una sonda 5' UTR. La Figura 6B proporciona los resultados utilizando una sonda de *AHAS*. La Figura 6C proporciona los resultados usando una sonda 3' UTR. La Figura 6D proporciona una representación esquemática de regiones de hibridización en la secuencia de evento 127 de las sondas respectivas.

[0029] La Figura 7 proporciona un diagrama de un inserto y una secuencia flanqueante en un ejemplo de una planta de soja evento 127. También se indican seis amplicones utilizados para la secuenciación según se describe en el Ejemplo 3.

[0030] La Figura 8 proporciona la secuencia de ácido nucleico de longitud completa para un inserto y una región flanqueante de soja evento 127 (SEC ID NO: 1). Las posiciones 1-1311 representan el ADN de acompañamiento 5', las posiciones 1312-6069 representan el inserto de ADN que codifica una proteína AHASL modificada, y las posiciones 6070-10,656 representan el ADN flanqueante 3'.

[0031] La Figura 9 proporciona los resultados de electroforesis en gel del análisis por RT-PCR de la transcripción de una subunidad AtSec 61y en un ejemplo de una planta de soja evento 127 según se describe en el Ejemplo 3.

[0032] La Figura 10 proporciona los resultados de electroforesis en gel de un análisis por RT-PCR de la transcripción de un marco de lectura abierto (*open reading frame* - ORF) de 501 pb, creado por la inserción de una duplicación de 376 pb de la secuencia de codificación *csr1-2* en la unión flanqueante 3' en un ejemplo de una planta de soja evento 127 según se describe en el Ejemplo 3.

[0033] La Figura 11 proporciona resultados de una electroforesis en gel de ejemplos de métodos de detección por PCR específicos del evento 127 según se describe en el Ejemplo 3.

[0034] La Figura 12 proporciona el ADN utilizado para generar el evento 127, es decir, el fragmento *PvuII* de 6156 pb del constructo pAC321 (SEC ID NO: 4)

### **Descripción detallada**

[0035] La presente invención proporciona plantas de soja que demuestran tolerancia a herbicidas inhibidores de AHAS como herbicidas imidazolinona, herbicidas sulfonilurea, herbicidas triazolpirimidina sulfoanilida, y/o herbicidas pirimidil oxibenzoato. Las plantas de soja de la presente invención contienen una molécula de ácido nucleico insertada que se encuentra en una posición caracterizada en el genoma de la soja. También se proporcionan métodos y composiciones para usar con las plantas de soja descritas.

[0036] Antes de describir la invención con mayor detalle, se definirán en primer lugar los siguientes términos.

### **I. Definiciones**

[0037] Como se utiliza en la presente, los términos "soja" y "plantas de soja" significan plantas de *Glycine max* e incluyen todas las variedades de plantas que pueden cultivarse con la soja. El término "planta de soja", incluye partes de la

planta. Como se utiliza en la presente, el término “parte de la planta” incluye células de la planta, órganos de la planta, protoplastos de la planta, cultivos de tejidos celulares de la planta a partir de los cuales puede regenerarse la planta, callos de la planta, macizos de la planta y células de la planta que están intactos en plantas o partes de plantas como embriones, polen, óvulos, semillas, vainas de semillas, hojas, flores, ramas, frutos, tallos, raíces, ápices de raíces, anteras, cotiledones, hipocótilos, y similares. Grano significa la semilla madura producida por cultivadores comerciales para fines distintos del crecimiento o reproducción de la especie. La progenie, derivados, variantes y mutantes de las plantas regeneradas también se incluyen en el alcance de la invención, siempre que estas partes comprendan una molécula de ácido nucleico de evento 127.

[0038] Una “molécula de ácido nucleico de evento 127” se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico de las posiciones 1312-6069 de la SEC ID NO: 1, una variante de la misma obtenida por cultivo de plantas tradicional que permite la expresión de una forma modificada de la enzima AHAS que tiene una proteína *AHASL* que contiene una asparagina correspondiente a la posición 653, en lugar de la serina natural (S653N), donde la forma modificada de la enzima AHAS muestra tolerancia a un inhibidor de AHAS que normalmente inhibiría la actividad enzimática de la enzima AHAS de tipo salvaje, o el complemento de cualquiera de estas. La molécula de ácido nucleico de evento 127 puede contener secuencias adicionales que flanquean las posiciones 1312-6069 de la SEC ID NO: 1 (o, para las variantes, secuencias adicionales que flanquean las posiciones 5' y 3').

[0039] Una “región de evento 127” se refiere a una molécula de ácido nucleico que incluye al menos un fragmento de una molécula de ácido nucleico de evento 127 y que es indicativa de una planta de evento 127. Una región de evento 127 puede incluir una o más de las regiones de unión 5' y/o 3', el inserto de ADN, o la región de unión de la duplicación *csr1-2* del inserto de ADN con el resto del inserto de ADN, también puede incluirse en la misma la secuencia de ADN flanqueante 5' y/o 3'.

[0040] Como se utiliza en la presente, el término “molécula de ácido nucleico específica de un evento 127” se refiere a una secuencia de una molécula de ácido nucleico que identifica en forma discriminativa o que es capaz de identificar en forma discriminativa moléculas de ácido nucleico de evento 127 en la muestra. Las moléculas de ácido nucleico específicas de un evento 127 pueden incluir regiones de unión y mutaciones únicas o duplicaciones en el inserto de

ADN resultantes del evento de transformación. Por ejemplo, el uso de cebadores de PCR que tienen la secuencia de ácido nucleico de SEC ID NOs: 37 y 38 en una reacción de PCR resulta en la amplificación de un amplicón que es indicativa de una molécula de ácido nucleico de evento 127.

[0041] Una “molécula de evento 127” se refiere a moléculas de ácido nucleico, moléculas de polipéptido y otras moléculas biológicas que derivan de, son obtenidas a partir de, o son codificadas por una molécula de ácido nucleico de evento 127.

[0042] Una “molécula diagnóstica de evento 127” se refiere a moléculas que pueden ser utilizadas para detectar, ya sea directa o indirectamente, una molécula de ácido nucleico de evento 127. Las moléculas diagnósticas de evento 127 incluyen moléculas de ácido nucleico, como cebadores y sondas, anticuerpos y sus fragmentos de retención al sitio de unión (por ejemplo, Fv, Fab, Fab', F (ab'), y anticuerpos con el dominio H suprimido), polipéptidos, y derivados de los mismos, análogos de ácido nucleico, aptámeros, y similares que pueden ser utilizados en métodos para la detección de moléculas de ácido nucleico de evento 127 o polipéptidos expresados a partir de estas moléculas de ácido nucleico.

[0043] Como se utiliza en la presente, “inserto de ADN” se refiere al ADN heterólogo introducido en el material vegetal a través del proceso de transformación e incluye ADN que difiere del ADN original utilizados para esta transformación, según se explica en la presente. “Inserto de ácido nucleico de evento 127” e “inserto de ADN de evento 127” se refieren a una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de ácido nucleico de las posiciones 1312-6069 de SEC ID NO: 1 (la cual difiere del ADN utilizado para generar el evento 127, es decir, el fragmento *PvuII* de 6156 pb del constructo pAC321 proporcionado en la Figura 12 (SEC ID NO: 4)).

[0044] Una planta, célula, semilla, parte de planta o tejido vegetal de “evento 127” se refiere a cualquier planta, célula, semilla, parte de planta o tejido vegetal que contiene una molécula de ácido nucleico de evento 127 y, preferentemente, contiene al menos un ácido nucleico específico de evento 127. Las plantas de evento 127 incluyen plantas de soja evento 127-9 que contienen una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de SEC ID NO: 1, como las denominadas BPS-CV127-9.

[0045] El término “ADN flanqueante” se refiere al ADN genómico presente en forma natural en un organismo, como una planta, inmediatamente corriente arriba o corriente abajo, y contiguo a la molécula de ácido nucleico insertada. Una

“región flanqueante” o “secuencia flanqueante” como se utiliza en la presente se refiere a una secuencia de al menos 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 1000, 1500, 2000, 2500 o 5000 pares de bases o mayor la cual está situada ya sea inmediatamente corriente arriba (5') y contigua, o inmediatamente corriente abajo (3') y contigua a la molécula original de inserto de ADN extraño. Ejemplos no limitativos de las regiones flanqueantes del evento 127 se establecen en SEC ID NOs: 2 y 3 y variantes y fragmentos de las mismas, donde SEC ID NO: 2 representa las posiciones 1-1311 de SEC ID NO: 1 y SEC ID NO: 3 representa las posiciones 6070-10,656 de SEC ID NO: 1.

[0046] Los procedimientos de transformación que conducen a la integración aleatoria del inserto de ADN extraño resultarán en transformantes individuales que contienen diferentes regiones flanqueantes características y únicas para cada transformante. Cuando el ADN recombinante se introduce en una planta a través de la cruza tradicional, sus regiones flanqueantes en general no cambiarán con respecto a las del transformante original. Los eventos de transformación individuales también contendrán uniones únicas entre un fragmento de inserto de ADN heterólogo y el ADN genómico, o dos fragmentos de ADN genómico, o dos fragmentos de ADN heterólogo.

[0047] Un “punto de unión” es un punto en el que se unen dos fragmentos de ADN específicos, por ejemplo, donde el inserto de ADN se une al ADN flanqueante. También existe un punto de unión en un organismo transformado en el que dos fragmentos de ADN se unen en una forma que está modificada con respecto a la que se encuentra en el organismo nativo. Como se utiliza en la presente, “ADN de unión” o “región de unión” se refiere al ADN que comprende un punto de unión. Ejemplos no limitantes de puntos de unión en el ADN de soja evento 127 incluyen secuencias como las determinadas, por ejemplo, en SEC ID NOs: 5 y 6, donde SEC ID NO: 5 representa las posiciones 1311-1312 de SEC ID NO: 1 y SEC ID NO: 6 representa las posiciones 6069-6070 de SEC ID NO: 1.

[0048] Se comprenderá que como se utiliza en la presente, el término “transgénico” incluye cualquier célula, línea celular, callo, tejido, parte de planta, o planta, cuyo genotipo ha sido alterado por la presencia de un ácido nucleico heterólogo, incluyendo los transgénicos inicialmente alterados, así como los creados por cruza sexual o propagación asexual del evento regenerado inicial. El término “transgénico” como se utiliza en la presente no abarca la alteración del genoma (cromosomas o cromosomas extra) por métodos de cultivo de plantas convencionales o por eventos que ocurren naturalmente como fertilización cruzada

al azar, infección viral no recombinante, transformación bacteriana no recombinante, transposición no recombinante, o mutación espontánea.

[0049] "Transformación" se refiere a la transferencia de un fragmento de ácido nucleico al genoma de un organismo hospedador, lo que resulta en la herencia genética estable. Los organismos hospedadores que contienen los fragmentos de ácidos nucleicos transformados se conocen como organismos "transgénicos". Los ejemplos de métodos de transformación de plantas incluyen los conocidos en el arte y descritos a continuación.

[0050] Un "evento transgénico" es producido por la transformación de células vegetales con un constructo(s) de ADN heterólogo, incluyendo un casete de expresión de ácido nucleico que comprende un transgén de interés, la regeneración de una población de plantas resultante de la inserción del transgén en el genoma de la planta, y la selección de una planta regenerada particular, caracterizada por la inserción en una ubicación del genoma en particular. Un evento se caracteriza fenotípicamente por la expresión del transgén(es). A nivel genético, un evento es parte de la composición genética de una planta.

[0051] Como se utiliza en la presente, una "muestra" incluye cualquier muestra que contiene moléculas de ácido nucleico o polipéptidos y deriva de plantas, material vegetal o productos como, entre otros, alimentos o piensos (frescos o procesados) integrados o derivados de material vegetal.

[0052] Por "introducción" o "introducido" en el contexto de la transformación, se entiende que se presenta a la planta un constructo de ADN heterólogo de manera tal que el constructo obtiene acceso al interior de una célula de la planta. Las plantas y los métodos de la invención no dependen de un método particular para la introducción de un constructo de ácido nucleico a una planta, sólo que el constructo de ácido nucleico obtiene acceso al interior de al menos una célula de la planta. Los métodos para la introducción de constructor de ácido nucleico en las plantas son conocidos en el arte, incluyendo entre otros, métodos de transformación estable, métodos de transformación transitoria y métodos mediados por virus.

[0053] El término "progenie" se refiere a plantas producidas por una cruce sexual (por ejemplo, cruzamiento exogámico, auto-cruzamiento o retro-cruzamiento) entre una planta de evento 127 y otra variedad. Incluso después del retro-cruzamiento repetido de un parental recurrente, el ADN insertado y/o el ADN flanqueante del parental evento 127 está presente en la progenie de la cruce en la misma localización cromosómica y puede identificarse, por ejemplo, mediante

examen de regiones específicas del evento 127.

[0054] Como se utiliza en la presente, “heterólogo”, en referencia a una molécula de ácido nucleico es una molécula de ácido nucleico que se origina a partir de una especie extraña o, si se trata de la misma especie, se ha modificado con respecto a la forma nativa en la composición y/o locus genómico por la intervención humana deliberada.

[0055] Una molécula de ácido nucleico “aislada” o “purificada”, o una porción biológicamente activa de la misma, está sustancialmente o esencialmente libre de componentes que normalmente acompañan o interactuar con la molécula de ácido nucleico encontrada en su ambiente natural. Por lo tanto, una molécula de ácido nucleico aislada o purificada está sustancialmente libre de otro material celular, o medio de cultivo cuando se produce por técnicas recombinantes, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se obtiene por síntesis química.

[0056] Una “sonda” se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada a la cual se adjunta una marca o molécula indicadora detectables, por ejemplo, un isótopo radiactivo, ligando, agente quimioluminiscente, enzima, etc. Esta sonda es complementaria a una cadena de una molécula de ácido nucleico objetivo, en el presente caso, a una cadena de ADN aislado de material biológico de una planta de soja evento 127, ya sea de una planta de soja o de una muestra que incluye ADN del evento. Las sondas no sólo incluyen ácidos desoxirribonucleico o ribonucleico, sino también poliamidas y otros materiales sonda que pueden detectar específicamente la presencia de la secuencia de ADN objetivo.

[0057] Como se utiliza en la presente, “cebadores” son moléculas de ácido nucleico aisladas que son capaces de aparearse con una cadena de ADN complementario objetivo por hibridización de ácidos nucleicos para formar un híbrido entre el cebador y la cadena de ADN objetivo, la cual puede luego extenderse junto con la cadena de ADN objetivo mediante una polimerasa, por ejemplo, una polimerasa de ADN. “Pares de cebadores” se refiere a un par de cebadores usados en la amplificación de una molécula de ácido nucleico objetivo, por ejemplo, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otros métodos convencionales de amplificación de ácidos nucleicos. “Reacción en cadena de la polimerasa” o “PCR” es una técnica utilizada para la amplificación de segmentos específicos de ADN.

[0058] Una “línea” o “cepa” es un grupo de individuos de origen idéntico que en general son consanguíneos en algún grado y que comúnmente son isogénicos

o casi isogénicos.

[0059] El término “cruzado” o “cruza” en el contexto de esta invención significa la fusión de gametos, por ejemplo, a través de la polinización para producir una progenie (es decir, células, semillas o plantas) en el caso de las plantas. El término abarca tanto cruza sexual (la polinización de una planta por otra) y, en el caso de las plantas, autofecundación (auto-polinización, es decir, cuando el polen y el óvulo provienen de la misma planta).

[0060] El término “introgresión” se refiere a la transmisión de un alelo deseado de un locus genético de un fondo genético a otro. En un método, los alelos deseados pueden ser introgresados a través de una cruce sexual entre dos parentales, donde al menos uno de uno de los parentales tiene el alelo deseado en su genoma.

## II. Plantas de soja evento 127

[0061] Se proporcionan composiciones y métodos relacionados con plantas de soja transgénicas tolerantes al inhibidor de AHAS. Estas composiciones incluyen plantas de soja evento 127. Una planta de soja evento 127 ha sido modificada a partir de una planta de soja de tipo salvaje o no transformada mediante la inserción o la introgresión del gen de la subunidad grande de acetohidroxiácido sintasa tolerante a imidazolinona de *Arabidopsis thaliana* (*csr1-2*) en el genoma de la soja como se define en la presente. En algunas realizaciones, la inserción del gen *csr1-2* en el genoma de la soja proporciona la expresión de una forma modificada de la enzima acetohidroxiácido sintasa (AHAS) que tiene una proteína AHASL que contiene una asparagina correspondiente a la posición 653, en lugar de la serina natural (S653N). La enzima AHAS es importante para la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada y es inhibida por ciertos herbicidas (herbicidas inhibidores de AHAS). La modificación en el gen de AHAS supera esta inhibición y por lo tanto proporciona tolerancia a una amplia gama de herbicidas inhibidores de AHAS. Así, una planta de soja evento 127 es resistente a al menos un herbicida inhibidor de AHAS e es tolerante a cantidades mayores de por lo menos un herbicida inhibidor de AHAS comparado con una planta de soja que carece de una molécula de ácido nucleico de evento 127.

[0062] La molécula de ácido nucleico que confiere la tolerancia al inhibidor de AHAS se encontró insertada en una posición caracterizada del genoma de la soja y de este modo produce el evento 127. La planta de soja evento 127 que alberga una molécula de ácido nucleico de evento 127 en la ubicación

cromosómica mencionada comprende, en una realización, una o más uniones genómicas/transgénicas que tienen al menos la secuencia de la molécula de ácido nucleico de SEC ID NO: 5 y/o 6. La caracterización del sitio de inserción genómica del evento 127 proporciona una mayor eficiencia en el cultivo y permite el uso de marcadores moleculares para seguir la inserción del transgén en las poblaciones de cultivo y la progenie de los mismos. Se proporcionan en la presente diversos métodos y composiciones para la identificación, detección y uso de plantas de soja evento 127.

[0063] El casete de expresión *csr1-2*, un fragmento de *Pvull* del plásmido pAC321, se integró en un solo locus genético caracterizado en el genoma de la soja dando como resultado el evento 127. En una realización, el casete *csr1-2* insertado en el evento 127 contiene tres mutaciones puntuales en relación al fragmento de transformación original del plásmido pAC321 con una mutación en la secuencia de codificación de AHAS y las otras dos corriente debajo de la región no traducida (*untranslated region* - UTR) 3' AHASL. Estas mutaciones incluyen una G por A en la secuencia de codificación, lo cual resulta en la expresión de un polipéptido AHAS que tiene una sustitución de aminoácidos de R<sub>272</sub> a K<sub>272</sub>. El análisis por transferencia tipo Southern y la verificación de secuencia de la mutación puntual indican que el inserto es estable a través de al menos ocho generaciones. El ADN insertado en el evento 127 también contiene una duplicación de 376 pares de bases (pb) de una porción de la secuencia de codificación *csr1-2* directamente antes del punto de integración 3' (la duplicación está representada por las posiciones 5694-6069 de SEC ID NO: 1) . Este segmento duplicado de 376 pb resulta en un marco de lectura abierto (ORF) de 501 pb que se extiende en la secuencia flanqueante 3'. Los resultados de la transcripción inversa - reacción en cadena de la polimerasa- (RT-PCR) sugieren que este ORF de 501 pb no se transcribe. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico de evento 127 contiene también la mayoría del locus génico de la subunidad y de Arabidopsis SEC61 (At3g48570), el cual es un componente del fragmento de ADN utilizado para la transformación. En otras realizaciones, el gen de la subunidad y de SEC61 puede expresarse en una planta de soja evento 127. Por ejemplo, como se describe en más detalle en los Ejemplos siguientes, los experimentos de RT-PCR muestran que el gen de la subunidad y de Arabidopsis SEC61 es transcrito débilmente en el tejido foliar del evento 127. Se han secuenciado un total de alrededor de 1,3 kilobases (kb) de ADN de soja flanqueante 5', junto con alrededor de 4,6 kb de ADN de soja flanqueante 3'. La

información de las secuencias flanqueantes puede utilizarse en el desarrollo de un método de detección por PCR cualitativo específico para evento 127 en conformidad con la presente invención. Otras características de las moléculas de ácido nucleico de evento 127, como las mutaciones puntuales y las duplicaciones identificadas, también pueden utilizarse en métodos proporcionados en la presente para la detección de una planta de evento 127, incluyendo la progenie y los derivados de la misma.

[0064] Las plantas de evento 127 de la presente invención son tolerantes a la aplicación de herbicidas inhibidores de AHAS. Las plantas de evento 127 muestran tolerancia o mayor tolerancia a los niveles de herbicidas inhibidores de AHAS en niveles de aplicación que incluyen cantidades equivalentes a cantidades de aplicación de herbicida de entre 50 g ia/ha y alrededor de 500 g i.a./ha, entre 70 g ia/ha y alrededor de 400 g ia/ha, y entre 70 g ia/ha y alrededor de 300 g ia/ha. Esta tolerancia puede incluir también tolerancia a niveles de herbicidas inhibidores de AHAS de 1X, 2X, 3X, 4X, 5X, o cantidades mayores de los niveles comerciales de aplicaciones del herbicida.

[0065] La tolerancia a un herbicida inhibidor de AHAS puede ser determinada por cualquier método de determinación de tolerancia a herbicidas. Por ejemplo, una planta de soja evento 127 puede demostrar tolerancia a un herbicida inhibidor de AHAS u otro producto químico si muestra un daño en comparación con una planta control adecuada que es menor que el daño que presenta la planta control en al menos 5%, 10 %, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, o 1000% o más. De esta manera, una planta que es tolerante a un herbicida inhibidor de AHAS u otro producto químico muestra "tolerancia mejorada" en comparación con una planta control adecuada. Los daños resultantes del herbicida u otro tratamiento químico se evalúan examinando cualquier parámetro de crecimiento vegetal que sea considerado apropiado por un experto en la materia. El daño puede ser evaluado por inspección visual y/o por análisis estadístico de parámetros apropiados de plantas individuales o de un grupo de plantas. Así, el daño puede ser evaluado examinando, por ejemplo, parámetros como altura de la planta, peso de la planta, color de las hojas, floración, fertilidad, rendimiento, producción de semillas, y similares. El daño también puede ser evaluado examinando el tiempo transcurrido hasta una etapa determinada del desarrollo (por ejemplo, madurez o floración) o el tiempo transcurrido hasta que una planta se ha recuperado de un tratamiento con

un producto químico y/o herbicida en particular.

[0066] Los daños causados por un herbicida inhibidor de AHAS u otro producto químico pueden ser evaluados en varias ocasiones después de que una planta de evento 127 ha sido tratada o puesta en contacto con un herbicida. El daño puede ser evaluado alrededor del momento en que la planta control muestra daño máximo, o puede ser evaluado después de un período de tiempo en que una planta control que no fue tratada con el herbicida u otro producto químico ha crecido y/o se ha desarrollado en forma mensurable en comparación con el tamaño o el estadio en que el tratamiento fue administrado. Además, el daño puede ser evaluado en varias ocasiones, por ejemplo, a las 12 horas o a los 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 días, o a las tres semanas, cuatro semanas, o más después de que la planta de ensayo fue tratada con el herbicida. Cualquier tiempo de evaluación es adecuado siempre que permite la detección de una diferencia en la respuesta a un tratamiento de las plantas control y de ensayo.

[0067] La presente invención incluye además semillas de la línea de soja CV603 (también conocida como "BPS-CV127-9") que contienen moléculas de ácido nucleico de evento 127, depositadas como Depósito de Patente de NCIMB N° 41603 y plantas, células vegetales y semillas derivadas de las mismas. El solicitante(es) ha hecho un depósito de al menos 2500 semillas de plantas de soja que contiene una molécula de ácido nucleico de evento 127 con las Colecciones Nacionales de Bacterias Industriales, Alimentarias y Marinas (*National Collections of Industrial, Food, and Marine Bacteria* - NCIMB), 23 St. Machar Drive, Aberdeen AB2 1RY, Escocia, Reino Unido, el 22 de diciembre de 2008; le fue asignado al depósito el N° de Acceso NCIMB 41603. Estos depósitos se mantendrán bajo los términos del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para Propósitos de Procedimiento de Patentes. Este depósito se hizo sólo como una conveniencia para los expertos en la materia y no es una admisión de que se requiere un depósito de acuerdo con 35 USC § 112. Las semillas depositadas en el NCIMB el 22 de diciembre de 2008 fueron tomadas del depósito mantenido por Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria). El acceso a este depósito estará disponible durante la tramitación de la solicitud al Comisionado de Patentes y Marcas y las personas que determine el Comisionado con derecho al mismo previa solicitud. Con la concesión de cualquier reivindicación en la solicitud, el Solicitante(s) pondrá a disposición del público, en conformidad con 37 CFR § 1.808, muestra(s) del depósito de al menos 2500 semillas de plantas de soja que contengan una molécula de ácido nucleico

de evento 127 en las Colecciones Nacionales de Bacteria Industriales, Alimentarias y Marinas (NCIMB), 23 St. Machar Drive, Aberdeen AB2 1RY, Escocia, Reino Unido. Este depósito de semillas de línea de soja CV603 se mantendrá en el depósito del NCIMB, que es un depósito público, por un período de 30 años o 5 años después de la solicitud más reciente, o durante el periodo ejecutable de la patente, cualquiera sea mayor, y será sustituido si se torna no viable durante ese período. Además, el Solicitante(s) han cumplido todos los requisitos de 37 CFR, § § 1.801-1.809, incluyendo la prestación de una indicación de la viabilidad de la muestra en depósito. El Solicitante(s) no tiene autoridad para anular cualquier restricción impuesta por la ley sobre la transferencia de material biológico o su transporte en el comercio. El Solicitante(s) no renuncia a ninguna violación de sus derechos reconocidos en esta patente o de los derechos aplicables a la línea de soja CV603 bajo la Ley de Protección de Variedades de Plantas (7 USC 2321 y siguientes). Esta prohibida la multiplicación no autorizada de semillas. La semilla puede ser regulada.

[0068] Las plantas de evento 127 de soja de la presente invención también incluyen la progenie, derivados, variantes y mutantes de la transformación inicial que dio lugar a las plantas de soja evento 127. Estas plantas pueden ser identificadas utilizando cualquier método para la identificación de tales plantas, incluyendo entre otros, registros de cultivo, métodos de tolerancia a herbicidas, métodos de detección molecular, métodos descritos en la presente y combinaciones de los mismos.

[0069] Las plantas de soja evento 127 de la presente invención son tolerantes al menos a un herbicida que interfiere con la actividad de la enzima AHAS endógena (herbicidas inhibidores de AHAS) que carece de la mutación S653N. Los herbicidas que interfieren con la actividad de la enzima AHAS incluyen herbicidas imidazolinona, herbicidas sulfonilureas, herbicidas triazolpirimidina, herbicidas pirimidiniloxibenzoato, herbicidas sulfonilamino-carboniltriaolinona, o mezclas o combinaciones de los mismos. En una realización, estos herbicidas son un herbicida imidazolinona, un herbicida sulfonilurea, o mezclas de los mismos. Los herbicidas imidazolinona incluyen, entre otros, PURSUIT® (imazetapir), CADRE® (imazapic), RAPTOR® (imazamox), SCEPTER® (imazaquin), ASSERT® (imazetabenz), ARSENAL® (imazapir), un derivado de cualquiera de los herbicidas mencionados anteriormente, y una mezcla o combinación de dos o más de los herbicidas mencionados anteriormente, por ejemplo, imazapir/imazamox (ODYSSEY®). El herbicida imidazolinona también puede seleccionarse de,

entre otros, ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-nicotínico, ácido [2-(4-isopropil)-4]-[metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-3-quinolincarboxílico], ácido [5-etil-2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-(metoximetil)-nicotínico, ácido [2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-metilnicotínico, y una mezcla de metil[6-(4-isopropil-4)-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-m-toluate y metil[2-(4-isopropil-4-metil-5)-oxo-2-imidazolin-2-il)-p-toluate. En una realización se utilizan ácido 5-etil-2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-nicotínico y ácido [2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-(metoximetil)-nicotínico. En otra realización, se utilizan ácido [2-(4-isopropil-4)-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-(metoximetil)-nicotínico.

[0070] Los herbicidas sulfonilurea que pueden usarse en la presente invención incluyen, entre otros, clorsulfurón, metil metsulfurón, metil sulfometurón, etil clorimurón, metil tifensulfurón, metil tribenurón, metil bensulfurón, nicosulfurón, metil etametsulfurón, rimsulfurón, metil triflusulfurón, triasulfurón, metil primisulfurón, cinosulfurón, amidosulfurón, fluzasulfurón, imazosulfurón, etil pirazosulfurón, halo sulfurón, azimsulfurón, ciclosulfurón, etoxisulfurón, flazasulfurón, metil flupirsulfurón, foramsulfurón, iodosulfurón, oxasulfurón, mesosulfurón, prosulfurón, sulfosulfurón, trifloxisulfurón, tritosulfurón, un derivado de cualquiera de los herbicidas mencionados anteriormente, y una mezcla de dos o más de los herbicidas mencionados anteriormente. Los herbicidas triazolpirimidina de la invención incluyen, entre otros, cloransulam, diclosulam, florasulam, flumetsulam, metosulam y penoxsulam. Los herbicidas pirimidiniloxibenzoato (o pirimidinil carboxi) de la invención incluyen, entre otros, bispiribac, piritiobac, piriminobac, piribenzoxim y piriftalida. Los herbicidas sulfonilamino-carboniltriaolinona incluyen, entre otros, flucarbazona y propoxicarbazona.

[0071] Se reconoce que los herbicidas pirimidiniloxibenzoato están relacionados con los herbicidas pirimidiniltiobenzoato y pueden ser generalizados en el epígrafe de herbicidas pirimidiniltiobenzoato de la Sociedad Americana de Ciencia de las Malezas. En consecuencia, los herbicidas de la presente invención incluyen además herbicidas pirimidiniltiobenzoato, incluyendo entre otros, los herbicidas pirimidiniloxibenzoato descritos anteriormente.

### **III. Moléculas de ácido nucleico**

[0072] La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico de evento 127 aisladas. Como se utiliza en la presente, el uso del término

“molécula de ácido nucleico” no pretende limitarse a una molécula de ácido nucleico que compone el ADN, sino que puede incluir cualquier nucleótido, como ribonucleótidos y combinaciones de ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos. Estos desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos incluyen moléculas de origen natural y sus análogos sintéticos. Las moléculas de ácido nucleico también abarcan todas las formas de secuencias, incluyendo entre otras formas de una sola cadena, formas de doble cadena, horquillas, estructuras en tallo y en bucle, y similares. En una realización, la molécula de ácido nucleico de evento 127 comprende una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de ácido nucleico de las posiciones 1312 a 6069 de SEC ID NO: 1. En otra realización, la molécula de ácido nucleico de evento 127 comprende una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos 1302 a 6079 de SEC ID NO: 1.

[0073] Las moléculas de ácido nucleico de evento 127 también incluyen fragmentos de SEC ID NO: 1. Los “fragmentos” de una secuencia de nucleótidos pueden ser de cualquier longitud, como por ejemplo, de al menos 7, 15, 20, 25, 30, 40, 60, 80, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 550, 650, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, 2000, 2200, 2400, 2600, 2800, 3000, 3500, 4000, 4500 o más nucleótidos (nt) de longitud. Estos fragmentos tienen numerosos usos que incluyen, entre otros, sondas de diagnóstico y cebadores. Por supuesto, los fragmentos más grandes, como los de 601-8000 nt de longitud también son útiles de acuerdo con la presente invención ya que son fragmentos correspondientes a la mayoría, si no todas, las secuencias de nucleótidos de SEC ID NO: 1. Por un fragmento de al menos 20 nt de longitud, por ejemplo, se entienden fragmentos que incluyen fragmentos de 20 o más bases contiguas de, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos de SEC ID NO: 1.

[0074] Una planta de evento 127 comprende un casete de expresión transgénica que tiene una secuencia de codificación *AHASL* que presenta una mutación S653N que es capaz de proporcionar resistencia o tolerancia a herbicidas inhibidores de imidazolinona. El casete incluye además secuencias reguladoras 5' y 3' unidas operativamente a la secuencia de codificación *AHASL*. “Unido operativamente” significa un vínculo funcional entre dos o más elementos. Por ejemplo, una unión operativa entre una molécula de ácido nucleico de interés y una secuencia reguladora (por ejemplo, un promotor) es un vínculo funcional que permite la expresión de la molécula de ácido nucleico de interés. Los elementos unidos operativamente pueden ser contiguos o no contiguos. Cuando se usa para referirse a la unión de dos regiones que codifican proteínas, unido operativamente

significa que las regiones de codificación están en el mismo marco de lectura.

[0075] Por lo tanto, el casete de expresión en un planta de soja evento 127 contiene en la dirección 5'-3' de la transcripción, una región de iniciación de la transcripción y la traducción (por ejemplo, un promotor), una región de codificación AHASL S653N, y una región de terminación de la transcripción y la traducción funcional en plantas. "Promotor" se refiere a una secuencia de nucleótidos capaz de controlar la expresión de una secuencia de codificación o ARN funcional. En general, una secuencia de codificación se encuentra 3' con respecto a una secuencia promotora. La secuencia promotora puede comprender elementos corriente arriba proximales y más distales, estos últimos elementos se suelen denominar potenciadores. En consecuencia, un "potenciador" es una secuencia de nucleótidos que puede estimular la actividad del promotor y puede ser un elemento innato del promotor o un elemento heterólogo insertado para mejorar el nivel o la especificidad tisular de un promotor. Los promotores pueden derivar en su totalidad de un gen nativo, o estar compuestos de diferentes elementos derivados de promotores diferentes encontrados en la naturaleza, o incluso comprender segmentos de nucleótidos sintéticos. Queda entendido por los expertos en la materia que diferentes promotores pueden dirigir la expresión de un gen en diversos tejidos o tipos de células, o en diferentes etapas del desarrollo, o en respuesta a diferentes condiciones ambientales. Los promotores que causan que un fragmento de ácido nucleico se exprese en la mayoría de los tipos celulares la mayoría de las veces se conocen comúnmente como "promotores constitutivos".

[0076] En una realización, el casete de expresión en un planta de soja evento 127 contiene, como componentes unidos operativamente, una secuencia de codificación AHASL S653N bajo el control del promotor *csr1-2* y de la región de terminación de la transcripción *csr1-2* de *Arabidopsis thaliana*. El casete de expresión se obtiene como un fragmento de *PvuII* del constructo de ácido nucleico pAC321. En una realización, el casete de expresión tiene la secuencia de SEC ID NO: 4.

[0077] Se proporcionan moléculas de ácido nucleico aisladas que pueden utilizarse en diferentes métodos para la detección y/o identificación de la molécula de ácido nucleico de evento 127. En una realización, una molécula de ácido nucleico "aislada" está libre de secuencias (por ejemplo, secuencias codificadoras de proteínas) que flanquean naturalmente la molécula de ácido nucleico (es decir, secuencias situadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en el ADN

genómico del organismo a partir del cual se obtiene la molécula de ácido nucleico. Por ejemplo, en varias realizaciones, la molécula de ácido nucleico aislada puede contener menos de alrededor de 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb o 0,1 kb de la secuencia de nucleótidos que flanquea naturalmente la molécula de ácido nucleico en el ADN genómico de la célula de la cual deriva la molécula de ácido nucleico.

[0078] En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico comprenden la secuencia de ADN de unión determinada en la SEC ID NO: 5 y/o 6. En otras realizaciones, las moléculas de ácido nucleico comprenden las secuencias de ADN de unión determinadas en SEC ID NO: 5 y/o 6 o variantes y fragmentos de las mismas. Los fragmentos y variantes de secuencias de ADN de unión son adecuados para la identificación discriminativa de ADN de evento 127. Como se señala en la presente, dichas secuencias encuentran aplicación como cebadores y/o sondas para utilizar en la detección de un inserto de ADN de evento 127 en una muestra.

[0079] En otras realizaciones, se proporcionan moléculas de ácido nucleico que pueden detectar una planta de evento 127, un inserto de ADN de evento 127, o una molécula de ácido nucleico específica de un evento 127. Estas secuencias incluyen cualquier molécula de ácido nucleico que comprende una molécula de ácido nucleico determinada en SEC ID NOs: 5 y/o 6 o variantes de la misma o complementos de la misma. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico usada para detectar una molécula de ácido nucleico de evento 127 comprende la secuencia determinada en SEC ID NO: 5 y/o 6 o complementos de la misma. Los fragmentos y variantes de moléculas de ácido nucleico que detectan una molécula de ácido nucleico de evento 127, un inserto de ADN de evento 127 o una región específica de evento 127 son adecuados para identificación discriminativamente plantas de evento 127. Como se discute en la presente, dichas secuencias encuentran aplicación como cebadores y/o sondas. Además, se proporcionan secuencias de cebadores de nucleótidos de ADN aisladas que comprenden o consisten de una secuencia determinada en SEC ID NO: 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 47, 67, 68, 69, 70, o un complemento de las mismas, o variantes y fragmentos de SEC ID NO: 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 47, 67, 68, 69, 70, o complementos de las mismas.

[0080] En una realización, un par de cebadores específicos para usar en la presente comprende los cebadores directo e inverso mostrados a continuación (con posiciones relativas a SEC ID NO: 1 identificadas). Se prevé que los cebadores produzcan un tamaño de banda de 327 pares de bases.

| Dirección | Secuencia del Cebador 5'-3' | Posición<br>(SEC ID NO: 1) | SEC ID<br>NO: |
|-----------|-----------------------------|----------------------------|---------------|
| Directo   | GCTCCTTCGCCGTTTAGTGTATAG    | 1108-1131                  | 69            |
| Inverso   | CGAAATCTCTGAGAGGATCGATTG    | 1411-1434                  | 70            |

[0081] Como se utiliza en la presente, "variantes" con respecto a las secuencias de ácido nucleico se refiere a secuencias muy similares. En las moléculas de ácido nucleico, una variante comprende una molécula de ácido nucleico que presenta supresiones (por ejemplo, truncamientos) en el extremo 5' y/o 3', supresión y/o adición de uno o más nucleótidos en uno o más sitios internos en la molécula de ácido nucleico nativo, y/o sustitución de uno o más nucleótidos en uno o más sitios en la molécula de ácido nucleico nativo.

[0082] En la presente invención puede utilizarse cualquier combinación de cebadores, como los descritos en la presente, para la detección de una región específica de evento 127 (por ejemplo, SEC ID NOs: 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 47, 67, 68, 69 y 70). Ejemplos no limitativos de pares de cebadores incluyen SEC ID NOs: 35 y 36, SEC ID NOs: 37 y 38, SEC ID NOs: 39 y 40, SEC ID NOs: 41 y 42, SEC ID NOs: 43 y 44, SEC ID NOs: 67 y 68, SEC ID NOs: 69 y 70. Pueden diseñarse también cebadores y pares de cebadores adicionales de acuerdo con la presente invención para usar en los métodos descritos.

[0083] Las sondas y cebadores para usar en los métodos proporcionados presentan una longitud suficiente en nucleótidos para unirse a la secuencia de ADN objetivo y detectar y/o identificar específicamente a una molécula de ácido nucleico en una muestra biológica, por ejemplo, muestras obtenidas de una planta a examinar. Se reconoce que las condiciones de hibridización o las condiciones de reacción pueden ser determinadas por el operador para lograr este resultado. Esta longitud puede ser cualquiera que sea útil en un método de detección de elección, como por ejemplo, 8, 10, 11, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 40, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 nucleótidos o más, o entre alrededor de 11-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-100, 100-200, 200-300, 300-400, 400-500, 500-600, 600-700, 700-800, o más nucleótidos de longitud. Estas sondas y cebadores pueden hibridizar específicamente con una secuencia objetivo en condiciones de hibridización de alta rigurosidad. Las sondas y cebadores de acuerdo con las realizaciones pueden tener identidad de secuencia de ADN completa de los

nucleótidos contiguos con la secuencia objetivo, aunque sondas que difieren de la secuencia de ADN objetivo y que conservan la capacidad de detectar y/o identificar específicamente una secuencia de ADN objetivo pueden ser diseñadas por métodos convencionales. En consecuencia, las sondas y cebadores pueden compartir alrededor de 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia o complementariedad con la molécula de ácido nucleico objetivo (por ejemplo, SEC ID NO: 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44), o pueden diferir de la secuencia objetivo (por ejemplo, SEC ID NO: 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44) por 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más nucleótidos. Las sondas pueden ser utilizadas como cebadores, pero generalmente están diseñadas para unirse al ADN o ARN objetivo, y no se utilizan en un proceso de amplificación.

[0084] En algunas realizaciones, pueden utilizarse cebadores específicos para amplificar un fragmento del evento de ADN a fin de producir un amplicón que pueda utilizarse como una "sonda específica" o el amplicón en sí puede ser detectado para la identificación de moléculas de ácido nucleico de evento 127 en muestras biológicas. Como alternativa, puede usarse una sonda durante la reacción de PCR para permitir la detección del evento de amplificación (por ejemplo, una sonda Taqman o una sonda MGB) (denominada PCR en tiempo real). Cuando una sonda se hibrida con moléculas de ácido nucleico en una muestra biológica en condiciones que permiten la unión de la sonda a la muestra, esta unión puede ser detectada y así permite una indicación de la presencia del evento 127 en la muestra biológica. Esta identificación de una sonda unida ha sido descrita en el arte. En una realización, la sonda es una secuencia que, en condiciones optimizadas, hibridiza específicamente a una región, incluyendo la región flanqueante 5' o 3' del evento y también incluye una parte del inserto de ADN contiguo a la misma, abarcando así una región de unión. La sonda específica puede comprender una secuencia al menos 80%, entre 80 y 85%, entre 85 y 90%, entre 90 y 95%, y entre 95 y 100% idéntica (o complementaria) a una región específica de la molécula de ácido nucleico de evento 127.

[0085] Como se utiliza en la presente, "ADN amplificado" o "amplicón" se refiere al producto de amplificación de una molécula de ácido nucleico de una molécula de ácido nucleico objetivo que forma parte de una plantilla de ácido nucleico. Por ejemplo, para determinar si una planta de soja resultante de una cruce sexual contiene la molécula de ácido nucleico de evento 127, el ADN extraído de la muestra de tejido de la planta de soja puede ser sometido a un método de amplificación de moléculas de ácidos nucleicos usando un par de

cebadores de ADN que incluye un primera cebador derivados de la secuencia flanqueante adyacente al sitio de inserción de ADN heterólogo insertado, y un segunda cebador derivado del ADN heterólogo insertado para producir un amplicón que diagnostica o indica la presencia de la molécula de ácido nucleico de evento 127. Por “diagnóstico” de una región de evento 127 se entiende el uso de cualquier método o ensayo que discrimine entre la presencia o la ausencia de una región de evento 127 en una muestra biológica. Alternativamente, el segunda cebador pueden derivar de la secuencia flanqueante. En aún otras realizaciones, los pares de cebadores pueden derivar de la secuencia flanqueante en ambos lados del ADN insertado de modo de producir un amplicón que incluye la totalidad de la molécula de ácido nucleico insertada del constructo de expresión, así como la secuencia flanqueante del inserto transgénico, por ejemplo SEC ID NO: 1. El amplicón es de una longitud y tiene una secuencia que es también diagnóstica del evento (por ejemplo, contiene un ADN de unión de una región de evento 127). El amplicón puede variar en longitud de la longitud combinada de los pares de cebadores más un par de bases de nucleótidos a cualquier longitud de amplicón realizable mediante un protocolo de amplificación de ADN. Un miembro de un par de cebadores derivado de la secuencia flanqueante puede estar situado a distancia de la secuencia de ADN insertado, esta distancia puede variar de un par de bases de nucleótidos a los límites de la reacción de amplificación, o alrededor de veinte mil pares de bases de nucleótidos. En otra realización, los pares de cebadores pueden ser diseñados para amplificar el inserto de ADN, o un fragmento del inserto de ADN. Estos pares de cebadores son útiles para detectar la presencia del inserto de ADN de evento 127 en una muestra biológica. El uso del término “amplicón” excluye específicamente a los dímeros de cebadores que pueden formarse en la reacción térmica de amplificación de ADN.

[0086] En ciertas realizaciones, los pares de cebadores útiles incluirán un primer cebador que se superpone con el punto de unión entre el inserto de ADN y el ADN genómico flanqueante 5' o 3'. Estos cebadores pueden ser diseñados en torno al punto de unión entre el ADN flanqueante 5' y el inserto de ADN (es decir, la unión entre las posiciones 1311 y 1312 de SEC ID NO: 1) así como alrededor del punto de unión entre el inserto de ADN y el ADN flanqueante 3' (es decir, la unión entre las posiciones 6069 y 6070 de la SEC ID NO: 1). Estos cebadores pueden ser diseñados para hibridizar con alrededor de 10 nucleótidos de la región flanqueante o del inserto de ADN y con al menos 1 nucleótido en el punto de unión en el inserto de ADN o la región flanqueantes. Así, por ejemplo, los cebadores

pueden comprender secuencias de nucleótidos diseñados para hibridizar con los nucleótidos representados por al menos las siguientes posiciones de SEC ID NO: 1: 1311-1321, 1302-1312, 6060-6070 y/o 6069-6079.

[0087] En otras realizaciones, los pares de cebadores útiles incluirán un cebador que se superpone con el punto de unión entre el extremo 5' de la porción duplicada de la secuencia de codificación *csr1-2* del inserto de ADN (en la posición 5694 de SEC ID NO: 1) y el inserto de ADN adyacente (es decir, en la posición 5693 de SEC ID NO: 1). Estos cebadores pueden ser diseñados para hibridizar con alrededor de 10 nucleótidos de la región duplicada o del inserto de ADN adyacente y con al menos 1 nucleótido en el punto de unión (por ejemplo, al menos 5693-5603, o al menos 5684-5694 de SEC ID NO: 1).

[0088] Los métodos para la preparación y el uso de sondas y cebadores para utilizar en la presente invención son conocidos en el arte. Los pares de cebadores de PCR pueden obtenerse a partir de una secuencia conocida, por ejemplo, mediante programas de computadora destinados a tal fin, como la herramienta de análisis de cebadores de PCR de Vector NTI versión 6 (Informax Inc., Bethesda Md.); PrimerSelect (DNASTAR Inc., Madison, Wis.), y Primer (Versión 0.5© 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, Mass.). Además, la secuencia puede ser escaneada visualmente y los cebadores identificados en forma manual utilizando los lineamientos conocidos por los expertos en la materia.

#### **IV. Métodos de cultivo**

[0089] Las plantas de soja evento 127 descritas pueden utilizarse en un programa de cultivo empleando métodos de cultivo para producir más plantas de soja evento 127, como plantas de progenie. Estos métodos de cultivo pueden utilizarse para producir plantas de soja, por ejemplo, para usar en la producción comercial en diferentes regiones geográficas o para producir poblaciones de cultivo de soja adicionales.

[0090] Además, las plantas de soja evento 127 pueden utilizarse en programas de cultivo utilizando métodos de cultivo para producir plantas de soja con características adicionales de interés combinadas con la tolerancia al inhibidor de AHAS (también conocido como "características apiladas" o "apilamiento de características"), como combinaciones de resistencia a otros herbicidas, como glifosato, glufosinato y/o dicamba. Además, las plantas de soja evento 127 pueden utilizarse en un programa de cultivo utilizando métodos de cultivo para producir

plantas de soja con múltiples secuencias de codificación de resistencia a herbicidas inhibidores de AHAS. Además, las plantas descritas pueden utilizarse en programas de cultivo utilizando métodos de cultivo para producir plantas con la característica de tolerancia a los herbicidas inhibidores de AHAS en combinación con otras características agronómicamente importantes, incluyendo características de ingreso, (como resistencia a enfermedades y patógenos, como las conferidas por el gen Bt), y características de egreso, como la calidad y cantidad de aceite y proteína.

[0091] Los métodos descritos de cultivo de plantas de soja resistentes a herbicidas inhibidores de AHAS comprenden las etapas de: (a) cruzar una planta de soja evento 127 con una segunda planta de soja; y (b) obtener semillas de la cruce. Las semillas obtenidas pueden examinarse adicionalmente para identificar semillas que contienen ADN que tiene una molécula de ácido nucleico de evento 127. Estos métodos pueden implicar además la obtención de una muestra de ADN de la semilla de la cruce y analizar la muestra para detectar la presencia o ausencia de una molécula de ácido nucleico de evento 127. Alternativamente, las semillas pueden ser examinadas en cuanto a tolerancia a herbicidas inhibidores de AHAS para identificar semillas o progenie que contienen ADN de evento 127.

[0092] Una planta de soja evento 127 puede cultivarse utilizando cualquier método de cultivo disponible para soja. Por ejemplo, una planta de soja evento 127 puede ser cultivada mediante una primera cruce sexual de una primera planta de soja parental cultivada a partir de una planta de soja evento 127 transgénica (o de la progenie de la misma derivada de la transformación con los casetes de expresión de las realizaciones que confieren tolerancia a herbicidas) y una segunda planta de soja parental que carece del fenotipo de resistencia a herbicidas, produciendo así una pluralidad de plantas de la primera progenie; y seleccionando luego una planta de la primera progenie que muestra la tolerancia a los herbicidas deseada; y auto-fecundando la planta de la primera progenie, produciendo así una pluralidad de plantas de la segunda progenie; y a continuación seleccionando a partir de la segunda progenie plantas que muestran la tolerancia a herbicidas deseada. Estas etapas pueden incluir además el retro-cruzamiento cruce de una planta de la primera progenie tolerante a herbicidas o una planta de la segunda progenie tolerante a herbicidas con la segunda planta de soja parental o con una tercera planta de soja parental, produciendo así una planta de soja que muestra la tolerancia a herbicidas deseada. Se reconoce además que no se requiere la evaluación de la progenie en cuanto al fenotipo. Pueden

utilizarse diversos métodos y composiciones, como se describe en la presente, para detectar y/o identificar el inserto de evento 127.

[0093] Se entenderá también que dos plantas transgénicas diferentes pueden también ser cruzadas sexualmente para producir una progenie que contiene dos genes exógenos añadidos, que se segregan independientemente. La auto-fecundación de la progenie adecuada puede producir plantas que son homocigotas para ambos genes exógenos añadidos. El retro-cruzamiento con una planta parental y el cruzamiento exógeno con una planta no transgénica también están contemplados, como así también la propagación vegetativa. No obstante, puede emplearse cualquier método para generar estas plantas.

[0094] Pueden desarrollarse líneas de soja endogámicas que contienen una molécula de ácido nucleico de evento 127 para usar en la producción de variedades de soja y para usar como plantas parentales en programas de cultivo para crear líneas de soja endogámicas nuevas y diferentes. Las líneas de soja endogámicas se utilizan a menudo como objetivos para la introgresión de características novedosas a través del cultivo tradicional y/o técnicas de introgresión molecular. Existen numerosos métodos analíticos para determinar la homocigosidad y estabilidad fenotípica de las líneas endogámicas.

[0095] En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico que resulta en la producción de la planta de soja evento 127 de la invención puede ser manipulada en un apilamiento molecular con una molécula de ácido nucleico que confiere resistencia a un segundo herbicida, como el glifosato. En otras realizaciones, el apilamiento molecular comprende además al menos una molécula de ácido nucleico adicional que confiere tolerancia a un tercer herbicida. En una realización, la secuencia confiere tolerancia a glufosinato, y en una realización específica, la secuencia comprende pat.

[0096] En otras realizaciones, la planta de soja evento 127 de la invención comprende una o más características de interés y, en algunas realizaciones, el ADN del evento 127 se apila con cualquier combinación de secuencias de moléculas de ácido nucleico y/o características de interés para crear plantas con una combinación de características deseada. Una característica, como se utiliza en la presente, se refiere al fenotipo derivado de una secuencia o grupos de secuencias particulares. Por ejemplo, moléculas de ácido nucleico de tolerancia a herbicidas pueden apilarse con cualquier otras moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos con actividad plaguicida y/o insecticida, como proteínas tóxicas de *Bacillus thuringiensis* (proteínas Bt), lectinas, y similares. Las

combinaciones generadas también pueden incluir múltiples copias de cualquiera de las moléculas de ácido nucleico de interés.

[0097] En algunas realizaciones, el ADN de soja evento 127 puede apilarse con otras características de tolerancia a herbicidas para crear una planta transgénica de la invención con otras propiedades mejoradas. Otras moléculas de ácido nucleico de tolerancia a herbicidas que podrían utilizarse en estas realizaciones incluyen las que confieren tolerancia a glifosato o inhibidores de AHAS mediante otros modos de acción, como, por ejemplo, un gen que codifica una enzima glifosato óxido-reductasa. Otras características que podrían combinarse con el ADN de soja evento 127 incluyen las derivadas de moléculas de ácido nucleico que confieren a la planta la capacidad de producir un nivel mayor de 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS). Otras características que podrían combinarse con la soja evento 127 incluyen las que confieren tolerancia a sulfonilurea y/o imidazolinona.

[0098] En algunas realizaciones, el ADN de soja evento 127 puede apilarse con, por ejemplo, hidroxifenilpiruvatodioxigenasas, las cuales son enzimas que catalizan la reacción en la que el para-hidroxifenilpiruvato (HPP) se transforma en homogentisato. Las moléculas que inhiben esta enzima y que se unen a la misma con el fin de inhibir la transformación del HPP en homogentisato son útiles como herbicidas. Las características que confiere tolerancia a estos herbicidas en las plantas son conocidas en el arte. Otros ejemplos de características de tolerancia a herbicidas adecuadas que podrían apilarse con el ADN de soja evento 127 incluyen moléculas de ácido nucleico de ariloxialcanoato dioxigenasa (de la cual se informó que confiere tolerancia a 2,4-D y otros herbicidas fenoxi auxina, así como a herbicidas ariloxifenoxipropionato) y moléculas de ácido nucleico de tolerancia a dicamba.

[0099] Otros ejemplos de características de tolerancia a herbicidas que podrían combinarse con el ADN de soja evento 127 incluyen las conferidas por moléculas de ácido nucleico que codifican una fosfinotricina acetiltransferasa exógena. Las plantas que contienen una fosfinotricina acetiltransferasa exógena pueden mostrar mayor tolerancia a herbicidas glufosinato, que inhiben la enzima glutamina sintasa. Otros ejemplos de características de tolerancia a herbicidas que podrían combinarse con el ADN de soja evento 127 incluyen las conferidas por moléculas de ácido nucleico que confiere actividad alterada de protoporfirinógeno oxidasa (protox). Las plantas que contienen estas moléculas de ácido nucleico pueden exhibir mayor tolerancia a cualquiera de una variedad de herbicidas que

tienen como objetivo la enzima protox (también conocidos como "inhibidores de protox").

[00100] Otros ejemplos de características de tolerancia a herbicidas que pueden combinarse con la característica de tolerancia a inhibidores de AHAS incluyen las que confieren tolerancia a al menos un herbicida en una planta, como por ejemplo, una planta de soja. Las plantas de soja tolerantes a herbicidas son conocidas en el arte; son plantas que varían en su tolerancia a herbicidas en particular. Las características responsables de estas tolerancias pueden ser combinadas por cultivo o por otros métodos con la planta de soja evento 127 para proporcionar una planta de la invención, así como métodos de uso de la misma.

[00101] El ADN de soja evento 127 también puede combinarse con al menos otra característica para producir plantas de la presente invención que comprenden además una variedad de combinaciones de características deseadas, incluyendo entre otras, características deseables para la alimentación animal como alto contenido de aceite, composición de aminoácidos, contenido de proteínas, mejor digestibilidad, o composiciones alteradas de ácidos grasos.

[00102] El ADN de soja evento 127 también puede combinarse con otras características deseables, como, por ejemplo, genes de avirulencia y resistencia a enfermedades, como características de resistencia a quistes de nematodos de la soja, por ejemplo, SCN, y características deseables para el procesamiento o proceso de productos como mayor contenido de aceite o composición modificada de ácidos grasos (por ejemplo, los genes de desaturasa de ácidos grasos; y los polímeros o bioplásticos (por ejemplo, beta-cetotiolasa, polihidroxibutirato sintasa y acetoacetil-CoA reductasa) facilitan la expresión de polihidroxialcanoatos (PHA)). También podrían combinarse moléculas de ácido nucleico de tolerancia a herbicidas con moléculas de ácido nucleico que proporcionan cualquier característica agronómica.

[00103] Estas combinaciones apiladas pueden crearse por cualquier método, incluyendo entre otros, cultivo de plantas por cualquier método conocido, o transformación genética. Si las secuencias son apiladas por transformación genética de las plantas, las secuencias de la molécula de ácido nucleico de interés pueden combinarse en cualquier momento y en cualquier orden. Las características se pueden introducir de forma simultánea en un protocolo de co-transformación con las moléculas de ácido nucleico de interés proporcionadas por cualquier combinación de casetes de transformación. Por ejemplo, si se introducirán dos secuencias, las mismas pueden estar contenidas en casetes de

transformación separados (trans) o contenidas en el mismo casete de transformación (cis). La expresión de las secuencias puede ser dirigida por el mismo promotor o por promotores diferentes. En algunos casos, puede ser deseable introducir un casete de transformación que suprimirá la expresión de la molécula de ácido nucleico de interés. Esto puede combinarse con cualquier combinación de otros casetes de supresión o casetes de sobreexpresión para generar la combinación deseada de características en la planta. Se reconoce además que las moléculas de ácido nucleico pueden apilarse en una ubicación genómica deseada usando un sistema de recombinación específico para un sitio.

[00104] También se proporcionan métodos de cultivo de plantas de soja que tienen ADN de evento 127, donde el método comprende (a) cruzar una planta de soja evento 127 o un derivado de la misma con una segunda planta de soja parental; (b) obtener semillas de la cruce; (c) obtener una muestra de ADN de una o más semillas; y (d) detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico de evento 127.

## **V. Plantas transformadas**

[00105] Las plantas de soja que tienen características combinadas con la característica del evento 127 también pueden ser producidas por transformación del material vegetal o partes de la planta obtenidos de plantas de soja evento 127. Pueden combinarse características adicionales en plantas de soja evento 127 utilizando cualquier método de transformación disponible para el productor. De este modo, las plantas de soja evento 127 pueden utilizarse como fuente de material vegetal para usar en métodos de transformación a fin de introducir moléculas de ácido nucleico heterólogo adicionales en una planta de soja evento 127. Por ejemplo, pueden prepararse vectores de transformación para introducir genes de interés en plantas de soja evento 127 a fin de producir plantas de soja con múltiples características introducidas.

[00106] Los vectores de transformación para usar en tales métodos pueden utilizarse para producir plantas transformadas con cualquier gen de interés, incluyendo los descritos en la presente. El vector de transformación puede incluir un marcador de selección y un gen de interés a introducir y expresado normalmente en la planta de soja evento 127 transformada. Estos marcadores de selección son conocidos en el arte. Los genes de interés de la invención varían dependiendo de la característica deseada a introducir. Por ejemplo, diversos cambios en el fenotipo pueden ser de interés, incluyendo la modificación de la

composición de ácidos grasos en una planta, la modificación del contenido de aminoácidos de una planta, la alteración de mecanismos de defensa contra insectos/ o patógenos en una planta, y similares. Estos resultados pueden ser alcanzados proporcionando la expresión de productos heterólogos o un incremento en la expresión de productos endógenos de las plantas. Alternativamente, los resultados pueden ser alcanzados proporcionando una reducción de la expresión de uno o más productos endógenos, en particular enzimas o cofactores de la planta. Estos cambios resultan en una alteración en el fenotipo de la planta transformada.

[00107] Puede usarse cualquier vector de transformación en los métodos de la presente invención. Se dispone de numerosos vectores de transformación de plantas y métodos para la transformación de plantas. Los métodos de transformación pueden utilizarse para apilar cualquier característica con la característica de tolerancia a herbicidas inhibidores de AHAS proporcionada por el inserto del evento 127, incluyendo las descritas en la presente.

## **VI. Métodos de detección**

[00108] Se proporcionan también métodos y composiciones para la identificación y/o detección de moléculas de ácido nucleico de evento 127 en una muestra biológica, por ejemplo, de una muestra obtenida de una planta de soja, incluyendo su progenie y derivados. Estos métodos encuentran aplicación en la identificación y/o la detección de regiones o moléculas de ácido nucleico de evento 127 en cualquier material biológico. Estos métodos incluyen, por ejemplo, métodos para confirmar la pureza de las semillas y métodos para la detección de semillas en un lote de semillas con una molécula de ácido nucleico de evento 127. En una realización, se proporciona un método para la identificación de una molécula de inserto de ácido nucleico de evento 127 en una muestra biológica que comprende formar una mezcla de una muestra biológica y un primer y un segundo cebadores de ácido nucleico capaces de amplificar una molécula de ácido nucleico de evento 127; hacer reaccionar la mezcla en condiciones que permiten que el primer y segundo cebadores de ácido nucleico amplifiquen una molécula de ácido nucleico de soja evento 127; y detectar la presencia o ausencia de una molécula de ácido nucleico de evento 127 amplificada. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico de evento 127 es una molécula de ácido nucleico específica de un evento 127.

[00109] También se proporcionan métodos para la identificación de una

molécula de ácido nucleico de evento 127 en una muestra biológica que comprende formar una mezcla que contiene una muestra biológica que tiene ADN de soja y una molécula de ácido nucleico sonda que es capaz de hibridizar con una molécula de ácido nucleico de soja evento 127; hacer reaccionar la mezcla en condiciones que permiten que la molécula de ácido nucleico sonda hibridice con una molécula de ácido nucleico de evento 127; y detectar si la molécula de ácido nucleico sonda hibridiza con una molécula de ácido nucleico de evento 127 en la muestra, donde la presencia de hibridización indica la presencia de una molécula de ácido nucleico de evento 127.

[00110] Los métodos de la presente invención también pueden utilizarse para identificar y/o detectar una molécula de inserto de ácido nucleico de evento 127 en una muestra biológica. En una realización, se proporciona un método para la identificación de una molécula de ácido nucleico de evento 127 en una muestra biológica que comprende formar una mezcla de una muestra biológica y un primer y un segundo cebadores de ácido nucleico capaces de amplificar una molécula de inserto de ácido nucleico de evento 127; hacer reaccionar la mezcla en condiciones que permiten que el primer y el segundo cebadores de ácido nucleico amplifiquen una molécula de inserto de ácido nucleico de evento 127; y detectar la presencia o ausencia de una molécula de inserto de ácido nucleico de evento 127 amplificada.

[00111] También se proporcionan métodos para la identificación de moléculas de ácido nucleico de evento 127 en una muestra biológica que comprenden formar una mezcla que contiene una muestra biológica que tiene ADN y una molécula de ácido nucleico sonda que es capaz de hibridizar con una molécula de ácido nucleico de evento 127; hacer reaccionar la mezcla bajo condiciones que permiten que la molécula de ácido nucleico sonda hibridice con una molécula de ácido nucleico de evento 127; y detectar si la molécula de ácido nucleico sonda hibridiza con una molécula de ácido nucleico de evento 127 en la muestra, donde la presencia de hibridización indica la presencia de una molécula de ácido nucleico de evento 127.

[00112] Se proporcionan además métodos para la detección de regiones de evento 127 en una muestra biológica. Las regiones de evento 127 que pueden ser detectadas mediante los métodos de la presente invención incluyen inserto de ADN de evento 127, regiones de unión 5', regiones de unión 3', regiones flanqueantes 5', regiones flanqueantes 3', mutaciones únicas o duplicaciones en el inserto de ADN resultantes del evento de transformación, o combinaciones y

fragmentos de cualquiera de estos.

[00113] Una muestra biológica puede comprender cualquier muestra en la que se desea determinar si está presente un ADN que tiene una molécula de ácido nucleico de evento 127. Por ejemplo, una muestra biológica puede comprender cualquier material vegetal o material que comprende o deriva de un material vegetal como, entre otros, alimentos o piensos. Como se utiliza en la presente, "material vegetal" se refiere a material que se obtiene o deriva de una planta o parte de una planta. En realizaciones específicas, la muestra biológica comprende un tejido de soja. En otras realizaciones, la muestra biológica se obtiene a partir de tejido foliar de soja. En aún otras realizaciones, la muestra biológica se obtiene a partir de tejido de semillas de soja.

[00114] Cualquier molécula de ácido nucleico relacionada con soja evento 127 puede ser detectada y/o identificadas utilizando los métodos de la presente invención. Por ejemplo, las moléculas de ácido nucleico que pueden detectarse incluyen, entre otras, ADN, ARNm, ADNc, y similares. En otras realizaciones, polipéptidos codificados por moléculas de ácido nucleico de evento 127 pueden ser detectados y/o identificados utilizando los métodos de la presente invención. Las moléculas de ácido nucleico detectadas y/o identificadas pueden abarcar cualquier fragmento de inserto de ADN de evento 127, incluyendo mutaciones identificadas en el inserto de ADN, por ejemplo, moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos AHAS que presentan S653N o R272K, y similares, secuencias promotoras, secuencias de terminación, fragmentos de estas secuencias, y combinaciones de los mismos.

[00115] Los cebadores y sondas para usar en los métodos descritos en la presente pueden utilizarse para confirmar (y en caso necesario corregir) las secuencias descritas por métodos convencionales, por ejemplo, por reclonación y secuenciación de dichas secuencias. La molécula de ácido nucleico sonda y los cebadores detectan específicamente una secuencia de ADN objetivo. Puede usarse cualquier método convencional de hibridización o amplificación de ácidos nucleicos para detectar o identificar la presencia de una molécula de ácido nucleico de un evento transgénico en una muestra. Por "detectar específicamente" se entiende que la molécula de ácido nucleico puede utilizarse como un cebador para amplificar una región específica de un evento 127, o que la molécula de ácido nucleico puede utilizarse como una sonda que hibridiza en condiciones rigurosas con una molécula de ácido nucleico que tiene una región específica de un evento 127. El nivel o grado de hibridización que permite la detección específica de un

evento 127 o una región específica de un evento 127 es suficiente para distinguir la molécula de ácido nucleico con la región específica de un evento 127 de una molécula de ácido nucleico que carece de esta región, permitiendo así la identificación discriminativa de una molécula de evento 127. Por "comparte suficiente identidad o complementariedad de secuencias para permitir la amplificación de una molécula de ácido nucleico de evento 127" se entiende que la secuencia comparte al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95 %, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad o complementariedad con un fragmento o toda la longitud de la molécula de ácido nucleico que tiene la molécula de ácido nucleico de evento 127.

[00116] En cuanto a la amplificación de una molécula de ácido nucleico objetivo (por ejemplo, por PCR) utilizando un par determinado de cebadores de amplificación, "condiciones rigurosas" son condiciones que permiten que el par de cebadores hibridice con la molécula de ácido nucleico objetivo con respecto a la cual el cebador que tiene la secuencia de tipo silvestre (o su complemento) correspondiente se uniría y, preferentemente, genere un producto de amplificación identificable (el amplicón) que tiene una molécula de ácido nucleico de evento 127 en una reacción térmica de amplificación de ADN. En una metodología de PCR, los cebadores oligonucleótidos pueden ser diseñados para usar en reacciones de PCR a fin de amplificar una molécula de ácido nucleico de evento 127. Los métodos para el diseño de cebadores de PCR y la clonación por PCR son generalmente conocidos en el arte. Se entiende que puede ser necesario ajustar una serie de parámetros en un protocolo de PCR específico a las condiciones de laboratorio específicas y que estos pueden ser ligeramente modificados permitiendo sin embargo la obtención de resultados similares. Estos ajustes serán evidentes para un experto en la materia.

[00117] Los cebadores para usar en los métodos descritos pueden utilizarse para amplificar cualquier molécula de ácido nucleico de evento 127. Por ejemplo, los pares de cebadores pueden ser diseñados de forma que sean capaces de amplificar regiones que son indicadoras de que una planta contiene un fragmento de una molécula de ácido nucleico de evento 127. En una realización, estos pares de cebadores pueden amplificar una región que comprende una sola unión, por ejemplo, una región de unión 5' o una región de unión 3'. Estos pares de cebadores incluyen un cebador que es capaz de iniciar la elongación de una región cromosómica flanqueante (por ejemplo, regiones flanqueantes 5' o 3') en la dirección del inserto de ADN, mientras que el segundo cebador es capaz de iniciar

desde el inserto de ADN en la dirección del primer cebador en la región cromosómica flanqueante. Estos pares de cebadores amplifican una molécula de ácido nucleico que comprende una región de unión. En algunas realizaciones, uno de los cebadores utilizados en el par de amplificación es capaz de aparearse a una región que abarca una de las regiones de unión (por ejemplo, regiones de unión 5' o 3') y es capaz de amplificar en la dirección de la región cromosómica o en la dirección del inserto. Los cebadores de la región cromosómica flanqueante para usar en estos métodos pueden ser capaces de aparearse a cualquier región cromosómica flanqueante 5' o 3' e iniciar la amplificación en la dirección del inserto. En otras realizaciones, los pares de cebadores pueden ser diseñados de forma que sean capaces de amplificar dos uniones.

[00118] Otros ejemplos de cebadores adecuados capaces de aparearse a las regiones flanqueantes 5' o 3' pueden ser diseñados para usar en estos métodos y pueden comprender secuencias de cebadores de alrededor de 10 o 12 a alrededor de 40 nucleótidos capaces de aparearse con una molécula de ácido nucleico entre las posiciones 1-1311 de SEC ID NO: 1 o las posiciones 6070-10.656 de SEC ID NO: 1.

[00119] Alternativamente, pueden desarrollarse cebadores aleatorios que son capaces de aparearse en todo el genoma de la planta y puede ser usados en conjunción con un inserto de un cebador específico para amplificar una molécula de ácido nucleico que comprende el inserto de ADN y un fragmento de secuencia flanqueante. En algunas realizaciones, el inserto del cebador específico puede ser marcado para permitir la detección de un fragmento amplificado mediante el inserto del cebador específico. En otras realizaciones, las moléculas de ácido nucleico amplificado resultantes pueden ser hibridizadas con sondas marcadas para identificar o detectar moléculas de ácido nucleico de evento 127.

[00120] En otra realización, pueden desarrollarse pares de cebadores que amplifican todo el inserto de ADN o una porción del inserto que es indicativa de un ADN de evento 127. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los pares de cebadores pueden ser diseñados para amplificar todo el inserto de ADN utilizando cebadores que inician a partir de las regiones flanqueantes 5' y 3' del inserto. Alternativamente, pueden diseñarse pares de cebadores que son capaces de amplificar una región sola del inserto de evento 127 para identificar la presencia del inserto. Por ejemplo, pueden diseñarse cebadores para amplificar cualquier región en el fragmento *PvuII* del plásmido pAC321 para usarse en la detección de la presencia del inserto en una muestra biológica. Estos cebadores incluyen los

capaces de ampliar cualquiera de las regiones del inserto de ADN, incluyendo la región entre las posiciones 1312 y 6069 de SEC ID NO: 1. En algunas realizaciones pueden desarrollarse pares de cebadores que son capaces de amplificar la secuencia de codificación AHAS mutante de *Arabidopsis thaliana* del inserto de ADN (por ejemplo, las posiciones 2762 a 4774 o fragmentos de la misma), o cualquier combinación de la secuencia de codificación y de secuencias reguladoras del inserto.

[00121] La molécula de ácido nucleico amplificada (amplicón) puede ser de cualquier longitud que permita la detección de la molécula de ácido nucleico de evento 127. Por ejemplo, el amplicón puede ser de alrededor de 10, 50, 100, 200, 300, 500, 700, 100, 2000, 3000, 4000, 5000 nucleótidos de longitud o más.

[00122] En algunas realizaciones, pueden detectarse una o más regiones específicas de la molécula de ácido nucleico de evento 127.

[00123] Cualquier cebador que permita que una molécula de ácido nucleico de evento 127 sea amplificada y/o detectada puede emplearse en los métodos de la presente invención. En una realización, los cebadores comprenden o son complementarios a una molécula de ácido nucleico de evento 127, como por ejemplo 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o más nucleótidos contiguos correspondientes o complementarios de una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de SEC ID NO: 1. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los primer y segundo cebadores comprenden una molécula de ácido nucleico de secuencia SEC ID NO: 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 67, 68, 69 y 70, donde el primer o segunda cebador comparte suficiente identidad o complementariedad de secuencia suficiente con respecto a la molécula de ácido nucleico para amplificar la molécula de ácido nucleico de evento 127. En aún otras realizaciones, el primer y el segundo cebador puede comprender una o cualquier combinación de las secuencias determinadas en SEC ID NO: 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 67, 68, 69 y 70. Los cebadores pueden ser de cualquier longitud suficiente para amplificar una región de soja evento 127, incluyendo, por ejemplo, al menos, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 15 o 30 o alrededor de 7-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-35, 35-40, 40-45 nucleótidos o más.

[00124] Como se describió anteriormente, en ciertas realizaciones, los pares de cebadores útiles incluirán un cebador que se superpone con el punto de unión entre el inserto de ADN y el ADN genómico flanqueante 5' o 3'. Estos cebadores pueden diseñarse en torno al punto de unión entre el ADN flanqueante

5' y el inserto de ADN (es decir, la unión entre las posiciones 1311 y 1312 de SEC ID NO: 1) así como alrededor del punto de unión entre el inserto de ADN y el ADN flanqueante 3' (es decir, la unión entre las posiciones 6069 y 6070 de SEC ID NO: 1). Estos cebadores pueden diseñarse para hibridizar con alrededor de 10 nucleótidos de la región flanqueantes o del inserto de ADN y con al menos 1 nucleótido en el punto de unión en el inserto de ADN o la región flanqueante. Así, por ejemplo, los cebadores pueden comprender secuencias de nucleótidos diseñadas para hibridizar con los nucleótidos representados por al menos las siguientes posiciones de SEC ID NO: 1: 1311-1321, 1302-1312, 6060-6070 y/o 6069-6079.

[00125] En otras realizaciones, los pares de cebadores útiles incluirán un cebador que se superpone con el punto de unión entre el extremo 5' de la porción duplicada de la secuencia de codificación *csr1-2* del inserto de ADN (en la posición 5694 de SEC ID NO: 1) y el extremo 3' de la porción adyacente del inserto de ADN (es decir, la posición 5693 de SEC ID NO: 1). Estos cebadores pueden ser diseñados para hibridizar con alrededor de 10 nucleótidos de la región duplicada o del inserto de ADN adyacente y con al menos 1 nucleótidos en el punto de unión (por ejemplo, al menos 5693-5603, o al menos 5684-5694 de SEC ID NO: 1).

[00126] Como se señala en la presente, puede emplearse cualquier método de PCR para amplificar la molécula de ácido nucleico de evento 127, incluyendo, por ejemplo, PCR en tiempo real.

[00127] Por consiguiente, en algunas realizaciones, se proporciona un método de detección de la presencia de moléculas de ácido nucleico de evento 127 en una muestra biológica. El método comprende (a) extraer una muestra de ADN de la muestra biológica; (b) proporcionar un par de moléculas de ADN cebador (por ejemplo, cualquier combinación de SEC ID NOs: 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 67, 68, 69 y 70, donde la combinación amplifica una región de soja evento 127), incluyendo entre otros, i) las secuencias de SEC ID NO: 35 y SEC ID NO: 36, ii) SEC ID NO: 37 y SEC ID NO: 38, iii) SEC ID NO: 39 y SEC ID NO: 40, iv) SEC ID NO: 41 y SEC ID NO: 42, v) SEC ID NO: 43 y SEC ID NO: 44, vi) SEC ID NO: 67 y SEC ID NO: 68, y vii) la SEC ID NO: 69 y SEC ID NO: 70; (c) proporcionar condiciones de reacción de amplificación de ADN; (d) realizar la reacción de amplificación de ADN, lo cual produce una molécula de ADN amplicón; y (e) detectar la molécula de ADN amplicón, donde la detección de la molécula de ADN amplicón en la reacción de amplificación de ADN indica la

presencia de moléculas de ácido nucleico de evento 127 en la muestra. Para que una molécula de ácido nucleico sirva como cebador o sonda sólo necesita ser suficientemente complementaria a fin de ser capaz de formar una estructura estable de doble cadena en el solvente y las concentraciones de sal empleadas en particular.

[00128] En las técnicas de hibridización, puede emplearse la totalidad o parte de una molécula de ácido nucleico que hibridiza selectivamente con una molécula de ácido nucleico de evento 127 objetivo. Por "condiciones rigurosas" o "condiciones de hibridización rigurosas" al referirse a una molécula de ácido nucleico sonda se entienden las condiciones en las cuales una sonda hibridizará con su secuencia objetivo en un grado detectablemente mayor que con otras secuencias (por ejemplo, al menos 2 por sobre el fondo). En cuanto a la amplificación de una molécula de ácido nucleico objetivo (por ejemplo, por PCR) utilizando un par de cebadores de amplificación determinado, las "condiciones rigurosas" son condiciones que permiten que el par de cebadores hibridice con la molécula de ácido nucleico objetivo con respecto a la cual el cebador tiene el tipo salvaje correspondiente. Las condiciones rigurosas son dependientes de la secuencia y serán distintas en diferentes circunstancias. Al controlar la rigurosidad de las condiciones de hibridización y/o de lavado, pueden identificarse secuencias objetivo que son 100% complementarias a la sonda (sondeo homólogo). Alternativamente, las condiciones rigurosas pueden ajustarse para permitir algunos desapareamientos en las secuencias de modo que se detecten grados de identidad menores (sondeo heterólogo). En general, una sonda presenta menos de alrededor de 1000 nucleótidos de longitud o menos de 500 nucleótidos de longitud.

[00129] Como se utiliza en la presente, una secuencia sustancialmente idéntica o complementaria es una molécula de ácido nucleico que hibridiza específicamente con el complemento de la molécula de ácido nucleico con la cual se está comparando en condiciones de alta rigurosidad. Las condiciones de rigurosidad adecuadas que promuevan la hibridización del ADN, por ejemplo, 6X de cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a alrededor de 45 °C, seguido de un lavado con 2X de SSC a 50 °C, son conocidas por los expertos en la materia. Comúnmente, las condiciones rigurosas para la hibridización y detección serán aquellos en las que la concentración de sal es inferior a 1,5 M de iones Na, comúnmente alrededor de 0,01 a 1,0 M de concentración de iones Na (u otras sales) a un pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es de al menos alrededor de 30°C

para sondas cortas (por ejemplo, 10 a 50 nucleótidos) y al menos alrededor de 60°C para sondas largas (por ejemplo, de más de 50 nucleótidos). Las condiciones rigurosas también pueden lograrse con la adición de agentes desestabilizantes como formamida. Los ejemplos de condiciones de baja rigurosidad incluyen hibridización con una solución buffer de formamida 30 a 35%, NaCl 1M, SDS (dodecil sulfato sódico) 1% a 37°C, y un lavado en SSC 1X a 2X (SSC 20X = NaCl 3,0M / citrato trisódico 0,3M) a 50 a 55°C. Los ejemplos de condiciones de rigurosidad moderada incluyen hibridización en formamida 40 a 45%, NaCl 1,0M, SDS 1% a 37°C, y un lavado en SSC 0,5X a 1X a 55 a 60°C. Los ejemplos de condiciones de alta rigurosidad incluyen hibridización en formamida 50%, NaCl 1M, SDS 1% a 37°C, y un lavado en SSC 0,1X a 60 a 65°C. Opcionalmente, los buffers de lavado pueden comprender alrededor de 0,1% a alrededor de 1% de SDS. La duración de la hibridización es generalmente menor que alrededor de 24 horas, usualmente de alrededor de 4 a alrededor de 12 horas. La duración del tiempo de lavado será de al menos un período de tiempo suficiente para alcanzar el equilibrio.

[00130] En las reacciones de hibridización, la especificidad suele ser función de los lavados post-hibridización, siendo los factores críticos la fuerza iónica y la temperatura de la solución de lavado final. Para híbridos de ADN-ADN, el  $T_m$  puede aproximarse a partir de la ecuación de Meinkoth y Wahl (1984) Anal. Biochem. 138:267-284:  $T_m = 81,5^\circ\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\% \text{ GC}) - 0,61 (\% \text{ forma}) - 500/L$ , donde M es la molaridad de los cationes monovalentes, % GC es el porcentaje de nucleótidos de guanosa y citosina en el ADN, % forma es el porcentaje de formamida en la solución de hibridización, y L es la longitud del híbrido en pares de bases. La  $T_m$  es la temperatura (a fuerza iónica y pH definidos) en la que el 50% de una secuencia objetivo complementaria hibridiza con una sonda con apareamiento perfecto. La  $T_m$  se reduce en aproximadamente 1°C por cada 1% de desapareamiento, por lo tanto, la  $T_m$ , la hibridización y/o las condiciones de lavado pueden ser ajustadas para hibridizar con secuencias de la identidad deseada. Por ejemplo, si se buscan secuencias con identidad  $\geq 90\%$ , la  $T_m$  puede reducirse en 10°C. En general, se seleccionan condiciones rigurosas a una temperatura alrededor de 5°C menor que el punto de fusión térmica ( $T_m$ ) para la secuencia específica y su complemento a una fuerza iónica y pH definidos. Sin embargo, las condiciones severamente rigurosas pueden utilizar una hibridización y/o un lavado a 1, 2, 3 o 4°C menos que el punto de fusión térmica ( $T_m$ ); las condiciones de rigurosidad moderada pueden utilizar una hibridización y/o un

lavado a 6, 7, 8, 9 o 10°C menos que el punto de fusión térmica ( $T_m$ ); las condiciones de baja rigurosidad pueden utilizar una hibridización y/o un lavado a 11, 12, 13, 14, 15 o 20°C menos que el punto de fusión térmica ( $T_m$ ). Utilizando la ecuación, la hibridización y las composiciones de lavado, y la  $T_m$  deseada, las personas con conocimiento usual entenderán que se describen inherentemente variaciones en la rigurosidad de la hibridización y/o las soluciones de lavado. Si el grado deseado de desapareamiento resulta en una  $T_m$  de menos de 45°C (solución acuosa) o 32°C (solución de formamida), es óptimo aumentar la concentración de SSC de manera que pueda utilizarse una temperatura más alta. La hibridización de la sonda con la molécula de ADN objetivo puede ser detectada por cualquier serie de métodos conocidos por los expertos en la materia; estos pueden incluir, entre otros, marcas fluorescentes, marcas radiactivas, marcas en base a anticuerpos, y marcas quimioluminiscentes.

[00131] Se dice que una molécula de ácido nucleico es el “complemento” de otra molécula de ácido nucleico si muestran complementariedad. Como se utiliza en la presente, se dice que las moléculas presentan “complementariedad completa”, cuando cada nucleótido de una de las moléculas de ácido nucleico es complementario con un nucleótido de la otra. Se dice que dos moléculas son “mínimamente complementarias” si pueden hibridizar entre sí con la suficiente estabilidad para permitir que permanezcan apareadas entre sí en condiciones al menos convencionales “de baja rigurosidad”. Del mismo modo, se dice que las moléculas son “complementarias” si pueden hibridizar entre sí con la suficiente estabilidad para permitir que permanezcan apareadas entre sí en condiciones convencionales “de alta rigurosidad”.

[00132] En otras realizaciones, las plantas de evento 127 pueden ser detectadas o identificadas por detección de un polipéptido de AHAS de *Arabidopsis thaliana*. Puede utilizarse cualquier método en la detección del polipéptido de AHAS. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos contra la proteína de AHAS introducida para detectar la presencia de un polipéptido de AHAS expresado.

[00133] Puede utilizarse cualquier método para detectar una molécula de ácido nucleico de evento 127 o un amplicón del mismo, incluyendo, entre otros, Análisis de Bits Genéticos. En un método, se diseña un oligonucleótido de ADN que se superpone con la secuencia de ADN flanqueante adyacente y la secuencia de ADN insertado. En otras realizaciones, se diseñan cebadores de ADN para contar con un amplicón específico de evento 127. El oligonucleótido es

inmovilizado en pocillos de una placa multi-pocillos. Después de la PCR de la región de interés, un producto de PCR de cadena única puede ser hibridizado con el oligonucleótido inmovilizado y servir como plantilla para una reacción de extensión de base única usando una polimerasa de ADN y ddNTPs marcados específicos para la base siguiente esperada. La lectura puede ser fluorescente o en base a ELISA. Una señal indica la presencia de la secuencia del inserto/flanqueante debido a la amplificación, hibridización y extensión de base única exitosas.

[00134] Otro método de detección para usar en los métodos de la presente invención es la técnica de pirosecuenciación. En este método, se diseña un oligonucleótido que se superpone con la unión del ADN adyacente y del inserto de ADN o se emplea un par de oligonucleótidos que pueden amplificar una región específica de un evento 127. El oligonucleótido se hibridiza con un producto de PCR de una sola cadena de la región de interés (un cebador en la secuencia insertada y uno en la secuencia flanqueante) y se incuba en presencia de una polimerasa de ADN, ATP, sulfúrico, luciferasa, apirasa, adenosina 5' fosfosulfato y luciferina. Los dNTPs se añaden de forma individual y la incorporación da como resultado una señal luminosa la cual es medida. Una señal luminosa indica la presencia del inserto/secuencia flanqueante del transgén debido a la amplificación, hibridización, y extensión de base única o múltiples exitosa.

[00135] Puede utilizarse también la polarización de fluorescencia utilizarse para detectar un amplicón de la invención. Usando este método, se diseña un oligonucleótido que se superpone con la unión del ADN flanqueante y del insertado o se emplea un par de oligonucleótidos que pueden amplificar una región específica de evento 127. El oligonucleótido se hibridiza con un producto de PCR de una sola cadena de la región de interés (un cebador en el ADN insertado y el otro en la secuencia de ADN flanqueante) y se incuba en presencia de una polimerasa de ADN y un ddNTP con marcador fluorescente. La extensión de base única da como resultado la incorporación del ddNTP. La incorporación puede medirse como un cambio en la polarización usando un fluorómetro. Un cambio en la polarización indica la presencia de la secuencia del inserto/flanqueante del transgén debido a la amplificación, hibridización y extensión de una sola base exitosas.

[00136] Puede usarse también el ensayo de expresión genes Taqman® (PE Applied Biosystems, Foster City, California) para detectar y cuantificar la presencia de una molécula de ácido nucleico de evento 127. En resumen, se diseña una

sonda de oligonucleótidos FRET la cual se superpone a la unión del ADN flanqueante y del inserto o se emplea un par de oligonucleótidos que puede amplificar una molécula de ácido nucleico de evento 127. La sonda FRET y los cebadores de PCR (un cebador en la secuencia de inserto de ADN y uno en la secuencia genómica flanqueante) se ciclan en presencia de una polimerasa termoestable y dNTPs. La hibridización de la sonda FRET da como resultado la escisión y la liberación de la fracción fluorescente fuera de la fracción de desactivación de la sonda FRET. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia flanqueante/inserto del transgén debido a la amplificación e hibridización exitosas.

[00137] Pueden emplearse también faros moleculares en los métodos descritos. En resumen, se diseña una sonda de oligonucleótidos FRET que se superpone a la unión del ADN flanqueante y del inserto o se emplea un par de oligonucleótidos que puede amplificar una región específica de un evento 127. La estructura singular de la sonda FRET resulta en que la misma contiene la estructura secundaria que mantiene las fracciones fluorescentes y de desactivación en estrecha proximidad. La sonda FRET y los cebadores de PCR (un cebador en la secuencia del inserto de ADN y uno en la secuencia flanqueante) se ciclan en presencia de una polimerasa termoestable y dNTPs. Después de la amplificación por PCR exitosa, la hibridización de la sonda FRET con la secuencia objetivo da como resultado la eliminación de la estructura secundaria de la sonda y la separación espacial de las fracciones fluorescente y de desactivación. Se produce una señal fluorescente. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia flanqueante/del inserto del transgén debido a la amplificación e hibridización exitosas.

[00138] Una reacción de hibridización con una sonda específica para una secuencia encontrada dentro del amplicón es otro método utilizado para detectar el amplicón producido por una reacción de PCR de la presente invención.

[00139] En otra realización, las moléculas de ácido nucleico de evento 127 pueden ser detectadas o identificadas por métodos de detección de polipéptidos producidos por las moléculas de ácido nucleico de evento 127. Por ejemplo, el producto de expresión del gen *csr-1* AHAS puede ser detectado mediante los métodos descritos en la presente. Estos métodos pueden involucrar el uso de proteínas de unión que son capaces de unirse a polipéptidos producidos por la molécula de ácido nucleico de evento 127 insertada. Estos métodos incluyen, entre otros, ensayos inmunológicos como ELISA (ensayo de inmunosorbentes

unido a enzimas), ensayos de antígenos, inmunotinción, inmunohistoquímica, ensayos de chips de proteínas, ensayos de radioinmunoprecipitación, ensayos inmunocromatográficos rápidos con membrana, y ensayos inmunocromatográficos rápidos con varilla (pruebas de flujo lateral).

[00140] Los métodos descritos en la presente pueden ser adaptados para usar en técnicas de alto rendimiento, por ejemplo, uniendo las moléculas diagnósticas (como cebadores y/o sondas) a un sustrato para formar un dispositivo, por ejemplo, un arreglo o un microarreglo, o a placas multi-pocillos. Los dispositivos pueden ser proporcionados en cualquier formato útil, como chips, láminas, placas, membranas, fibras, cuentas, cintas, varillas, alfombrillas, entramados, barras, telas, paredes de vasos, y similares. Además, los sustratos pueden ser de cualquier material disponible, como por ejemplo, vidrio, cerámica, geles (por ejemplo, hidrogeles, microgeles, pseudogeles), y materiales poliméricos (por ejemplo, plásticos, silicona, fluoropolímeros). Por lo tanto, los sustratos para usar en los dispositivos y métodos de la presente invención incluyen, entre otros, chips de silicio, membranas de nylon, fibras ópticas, placas multi-pocillos, y similares. Las sondas u otras moléculas diagnósticas de un evento 1274 pueden unirse al sustrato usando cualquier método de unión disponible, como unión covalente, unión coordinada, y unión no covalente (por ejemplo, enlace iónico, unión de hidrógeno, atracción lipofílica).

[00141] Para medir los objetivos de hibridización de una molécula de ácido nucleico de evento 127 puede utilizarse un método basado en un arreglo para detección, identificación o monitoreo de la expresión de alto rendimiento. Esta metodología en base a un "chip" comprende el uso de microarreglos de moléculas de ácido nucleico como objetivos de hibridización específicos para genes para medir cuantitativamente la expresión de los genes correspondientes. Cada nucleótido en una secuencia grande puede ser consultado simultáneamente. Puede usarse la hibridización para analizar de manera eficiente las secuencias de nucleótidos.

[00142] Cualquier método de microarreglos disponible puede ser utilizado en los métodos de la presente invención. Por ejemplo, un método de microarreglo puede comparar las secuencias a ser analizadas por hibridización con una serie de oligonucleótidos o de moléculas de ADNc que representan todas las subsecuencias posible. Un segundo método hibridiza la muestra con un arreglo de oligonucleótidos o sondas de ADNc. Puede usarse un arreglo consistente en oligonucleótidos o moléculas de ADNc complementarios a las subsecuencias de

una secuencia objetivo de un evento 127 para determinar la identidad de una secuencia objetivo, medir su cantidad y detectar diferencias entre el objetivo y una secuencia de referencia. Los microarreglos de moléculas de ácido nucleico pueden también examinarse con moléculas de proteínas o fragmentos de las mismas para determinar las moléculas de ácido nucleico que se unen específicamente a moléculas de proteínas o fragmentos de las mismas. Otros métodos diagnósticos de microarreglos para usar en los métodos de la presente invención incluyen, por ejemplo, los descritos en la Publicación Estadounidense N° 2007/0298423.

[00143] Por consiguiente, las moléculas de ácido nucleico de evento 127 pueden ser identificadas o detectadas en una muestra usando cualquier método disponible. Estos métodos incluyen, entre otros, técnicas de separación en gel, detección por transferencia de ácidos nucleicos (por ejemplo, hibridización Southern, hibridización Northern), PCR cualitativa, semi-cuantitativa o cuantitativa, inmunoensayos (por ejemplo, ELISA, ensayos en tiras (por ejemplo, tiras de flujo lateral) utilizando cualquier inmunoglobulina, anticuerpos monoclonales, anticuerpos de una sola cadena, o fragmentos de anticuerpos que retienen la región de unión) para detectar la expresión de un AHASL modificado, y ensayos de detección basados en microarreglos o "microchips". En otras realizaciones, los métodos pueden involucrar el uso de técnicas de espectrometría de masas o resonancia magnética nuclear (RMN) para detectar o identificar la presencia de moléculas de ácido nucleico de evento 127 en una muestra biológica.

[00144] Se proporcionan también dispositivos útiles para estos métodos de detección en varias realizaciones de la presente; los dispositivos comprenden un soporte sólido con una superficie, y ligada a la misma al menos una molécula diagnóstica de evento 127. Estos pueden ser dispositivos para ensayos de hibridización, dispositivos para inmunoensayo, dispositivos de ensayo de unión receptor-ligando, o cualquier otro conocido en el arte.

## **VII. Kits**

[00145] La presente invención también proporciona kits para la detección de una planta de evento 127, o una molécula de ácido nucleico de evento 127, donde el kit comprende un primer y un segundo cebadores de ácido nucleico que son capaces de amplificar una molécula de ácido nucleico de evento 127. Las moléculas de ácido nucleico de evento 127 amplificadas resultantes pueden ser detectadas directamente, o utilizarse como sondas de hibridización en reacciones

con muestras biológicas que contienen ADN.

[00146] Como se utiliza en la presente, "kit" se refiere a una serie de reactivos para el propósito de llevar a cabo las realizaciones de los métodos, más concretamente, la identificación y/o la detección de un evento 127 en muestras biológicas. El kit pueden utilizarse, y sus componentes pueden ser ajustados específicamente, para propósitos de control de calidad (por ejemplo, pureza de lotes de semillas), detección de moléculas de ácido nucleico de evento 127 en material vegetal, o un material que comprende o deriva de material vegetal, como entre otros, alimentos o piensos.

[00147] En realizaciones específicas, se proporciona un kit para la identificación de moléculas de ácido nucleico de evento 127 en una muestra biológica. El kit comprende un primer y un segundo cebadores, donde el primer y el segundo cebadores son capaces de amplificar una molécula de ácido nucleico de evento 127. En otras realizaciones, el kit también incluye una molécula de ácido nucleico para la detección de una molécula de ácido nucleico de evento 127. El kit puede comprender, por ejemplo, un primer y un segundo cebadores que comprenden una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de SEC ID NOs: 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 y 44, donde el primer o el segunda cebadores comparten suficiente homología o complementariedad de secuencias con respecto a la molécula de ácido nucleico para amplificar una molécula de ácido nucleico de evento 127. Por ejemplo, en realizaciones específicas, el primer cebador o el segundo cebador comprenden un fragmento de una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia SEC ID NO: 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 67, 68, 69 y 70, donde el primer o el segundo cebadores comparten suficiente homología o complementariedad de secuencias con respecto a la molécula de ácido nucleico para amplificar una molécula de evento 127. El par de cebadores puede comprender un fragmento de una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia SEC ID NO: 5 y un fragmento de una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia SEC ID NO: 6 o, alternativamente, el par de cebadores puede seleccionarse de las secuencias de i) SEC ID NO: 35 y SEC ID NO: 36, ii) SEC ID NO: 37 y SEC ID NO: 38, iii) SEC ID NO: 39 y SEC ID NO: 40, iv) SEC ID NO: 41 y SEC ID NO: 42, v) SEC ID NO: 43 y SEC ID NO: 44, vi) SEC ID NO: 67 y SEC ID NO: 68, y vii) SEC ID NO: 69 y SEC ID NO: 70. En aún otras realizaciones, el primer y el segundo cebadores pueden comprender una o cualquier combinación de las secuencias determinadas en SEC ID NO: 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 67, 68, 69 y 70. Los cebadores pueden ser de cualquier

longitud suficiente para amplificar una molécula de evento 127, incluyendo, por ejemplo, al menos 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 15 o 30 o alrededor de 7-10, 10-15, 15 - 20, 20-25, 25-30, 30-35, 35-40, 40-45 nucleótidos o más.

[00148] Se proporcionan además kits de detección de ADN que comprenden al menos una molécula de ácido nucleico que puede detectar específicamente una región de un evento 127, donde la molécula de ácido nucleico comprende al menos una molécula de ADN de una longitud suficiente de nucleótidos contiguos homóloga o complementaria a SEC ID NO: 5 y/o 6. En algunas realizaciones, el kit de detección de ADN comprende una molécula de ácido nucleico que tiene SEC ID NO 5 y/o 6 o comprende una secuencia que hibridiza con secuencias que detectan específicamente una región de un evento 127, como las seleccionadas del grupo que consiste de SEC ID NOs: 5 y/o 6.

### **VIII. Métodos de control de malezas**

[00149] La presente invención proporciona también métodos y composiciones para el control de malezas o plantas no deseadas. Los métodos generalmente involucran la aplicación de una cantidad efectiva de uno o más herbicidas no selectivos a un área cultivada o campo de cultivo que contiene una o más plantas de soja evento 127. Aunque cualquier maleza puede ser controlada por los métodos descritos, en algunas realizaciones, los métodos pueden incluir en primer lugar la identificación de malezas o plantas no deseadas en un área o campo susceptibles a un herbicida inhibidor de AHAS.

[00150] Se proporcionan métodos para controlar malezas en un área cultivada, impedir el desarrollo o la aparición de malezas o plantas no deseadas en un área cultivada, producir un cultivo, y aumentar la seguridad de los cultivos. El término "control" y sus derivados, por ejemplo, como en "control de malezas" se refiere a uno o más entre inhibir el crecimiento, germinación, reproducción y/o proliferación, y/o eliminar, retirar, destruir, o de otro modo disminuir la aparición y/o la actividad de una maleza y/o planta no deseada.

[00151] Los métodos de la invención pueden controlar malezas o plantas no deseadas en un área de cualquier cantidad mensurable, como al reducir la cantidad de malezas o plantas no deseadas en un área de al menos alrededor de 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% en comparación con un área que no ha sido tratada con la misma cantidad y tipo de herbicida. El control de malezas o plantas no deseadas puede ser medido por cualquier medio de medición reproducible. En una realización, el control de malezas o plantas no

deseadas es medido contando el número de malezas o plantas no deseadas que crecen en un área tratada con un herbicida y comparando con el número de malezas o plantas no deseadas que crecen en un área no tratada de tamaño similar.

[00152] La presente invención también proporciona métodos para el control de malezas o plantas no deseadas poniendo en contacto semillas de plantas de soja evento 127 antes de la siembra y/o después de la pregerminación con un herbicida inhibidor de AHAS. El método puede comprender además la siembra de las semillas, por ejemplo, en un medio de cultivo adecuado, como el suelo de un campo o en un medio para cultivo en macetas en un invernadero. Los métodos encuentran aplicación particular en el control de malezas y/o plantas no deseadas en la vecindad inmediata de la semilla.

[00153] Se entiende por malezas, en el sentido más amplio, todas aquellas plantas que crecen en lugares donde son indeseables.

[00154] Las malezas que pueden ser controladas por los métodos de la presente invención son, por ejemplo, malezas dicotiledóneas y monocotiledóneas. Las malezas dicotiledóneas que pueden ser controlados utilizando los métodos descritos incluyen, entre otras, malezas de los géneros: *Sinapis*, *Lepidium*, *Galium*, *Stellaria*, *Matricaria*, *Anthemis*, *Galinsoga*, *Chenopodium*, *Urtica*, *Senecio*, *Amaranthus*, *Portulaca*, *Xanthium*, *Convolvulus*, *Ipomoea*, *Polygonum*, *Sesbania*, *Ambrosia*, *Cirsium*, *Carduus*, *Sonchus*, *Solanum*, *Rorippa*, *Rotala*, *Lindemia*, *Lamium*, *Veronica*, *Abutilon*, *Emex*, *Datura*, *Viola*, *Galeopsis*, *Papaver*, *Centaurea*, *Trifolium*, *Ranunculus*, y *Taraxacum*. Las malezas monocotiledóneas que pueden ser controladas utilizando los métodos descritos incluyen, entre otras, malezas de los géneros: *Echinochloa*, *Setaria*, *Panicum*, *Digitaria*, *Phleum*, *Poa*, *Festuca*, *Eleusine*, *Brachiaria*, *Lolium*, *Bromus*, *Avena*, *Cyperus*, *Sorghum*, *Agropyron*, *Cynodon*, *Monochoria*, *Fimbristylis*, *Sagittaria*, *Eleocharis*, *Scirpus*, *Paspalum*, *Ischaemum*, *Sphenoclea*, *Dactyloctenium*, *Agrostis*, *Alopecurus*, y *Apera*. Las malezas en particular que pueden ser controladas por los métodos de la presente invención incluyen, entre otras, malezas importantes desde el punto de vista agrícola como *Ipomoea* spp., *Commelina* spp., *Tridax procumbens*, *Euphorbia* spp., *Sida* spp., *Bidens* spp., *Galinsoga* spp., *Solanum* spp., *Xanthium* spp., *Chenopodium* spp., *Spermacoce latifolia*, *Richardia brasiliensis*, *Sonchus oleraceus*, *Conyza* spp., *Amaranthus* spp., *Acanthospermum* spp., *Hyptis* spp., *Portulaca oleracea*, *Casia obtusifolia* y también incluyen el control de especies de ciperáceas de *Cyperus* spp., así como

también especies de pastos incluyendo *Brachiaria* spp., *Digitaria* spp., *Panicum* spp., *Setaria* spp., *Sorghum halepense*, *Echinochloa* spp., *Eleusine indica*, y *Pennisetum* spp. Con el uso de herbicidas imidazolinona no selectivos, los métodos descritos son ventajosos para el control de malezas de difícil control, como *Commelina* spp, *Conyza* spp., *Chamaesice hirta*, *Spermacoce latifolia*, *Richardia brasiliensis*, *Ipomoea* spp, *Euphorbia heterophylla*, *Echinochloa* spp y *Casia obtusifolia*.

[00155] Además, las malezas que pueden ser controlados por los métodos de la presente invención son, por ejemplo, plantas de cultivo no deseadas que están creciendo en un lugar identificado. Por ejemplo, una planta de maíz voluntario que está en un campo que comprende fundamentalmente plantas de soja evento 127 puede ser considerada una maleza, si la planta de maíz no es deseada en el campo de plantas de soja.

[00156] Las plantas no deseadas que pueden ser controladas por los métodos de la presente invención incluyen aquellas plantas que fueron plantadas previamente en un campo determinado en una estación anterior, o que se han plantado en un área adyacente, y comprenden plantas de cultivo, incluyendo soja, maíz, canola, algodón, girasol, y similares. En algunos aspectos, las plantas de cultivo pueden ser tolerantes a herbicidas, como herbicidas glifosato o glufosinato, o pueden ser tolerantes a herbicidas inhibidores de AHAS.

[00157] Como se utiliza en la presente, un "área cultivada" o "área cultivada" comprende cualquier región en la cual se desea hacer crecer una o más plantas, como una planta de soja evento 127. Estas áreas de cultivo incluyen, entre otras, un campo en el cual se cultiva una planta de soja evento 127 (como un campo de cultivo, estudio de campo, etc.), un invernadero, una cámara de crecimiento, etc.

[00158] Los métodos comprenden plantar el área cultivada con semillas o plantas de soja evento 127, y en algunos modos de realización, aplicando a la cosecha, las semillas, malezas, plantas no deseadas, el suelo o área cultivada de la misma una cantidad efectiva de un de herbicidas de interés. El herbicida se puede aplicar en cualquier momento durante el cultivo de plantas de soja evento 127. El herbicida se puede aplicar antes o después de la cosecha se planta en el área cultivada. Las aplicaciones de herbicidas pueden incluir una solicitud de un herbicida inhibidor de AHAS, o combinaciones de los mismos.

[00159] El término "cantidad efectiva" significa una cantidad de herbicida suficiente para dar como resultado cualquier medida observable de control de

malezas o plantas no deseadas en un área cultivada. Una cantidad efectiva de un herbicida inhibidor de AHAS puede estar en el rango de entre alrededor de 50 g ia/ha a 500 g ia/ha, entre alrededor de 50 g ia/ha y alrededor de 400 g i.a./ha, o entre alrededor de 50 g ia/ha a alrededor de 300 g ia/ha. La cantidad efectiva de un herbicida inhibidor de AHAS también puede ser de alrededor de 70 g ia/ha, 140 g i.a./ha, o 280 g ia/ha. Las tasas efectivas de aplicación en los métodos de la presente invención para un herbicida inhibidor de AHAS pueden ser influenciadas por muchos factores, incluyendo el medio ambiente y deben determinarse bajo condiciones de uso reales. El control de malezas o plantas no deseadas puede obtenerse con una o más aplicaciones de un herbicida inhibidor de AHAS a una tasa similar o superior a la cantidad utilizada para este control en áreas que no tienen soja evento 127. Estas tasas de aplicación incluyen aquellas de 70 g ia/ha, 140 o 280 g ia/ha, o equivalentes. Las tasas de aplicación comercial típicas son de alrededor de 70 g ia/ha de herbicida inhibidor de AHAS, también conocidas como tasas de aplicación 1X.

[00160] En algunas realizaciones, una cantidad efectiva puede ser una cantidad de un herbicida inhibidor de AHAS mayor que la cantidad a la cual la maleza o planta no deseada a controlar es tolerante. Por ejemplo, en realizaciones en las cuales una maleza o planta no deseada es tolerante a una aplicación de 70 g ia/ha, pero es susceptible a una aplicación de 140 g ia/ha, una cantidad efectiva es entonces 140 g ia/ha.

[00161] En consecuencia, la presente invención proporciona métodos de control de malezas o plantas no deseadas crecidas en un área cultivada que comprenden aplicar una cantidad efectiva de un herbicida no selectivo al área cultivada que tiene una o más plantas de soja evento 127.

[00162] También se proporcionan métodos de control de malezas o plantas tolerantes a glifosato en un área cultivada que comprenden aplicar una cantidad efectiva de un herbicida inhibidor de AHAS a un área cultivada que tiene una o más plantas de soja evento 127.

[00163] También se proporciona un método de control de malezas o plantas tolerantes a herbicidas inhibidores de AHAS en un área cultivada que comprende aplicar una cantidad efectiva de un herbicida inhibidor de AHAS a un área cultivada con una o más plantas de soja evento 127. En estas realizaciones, la cantidad efectiva de herbicida inhibidor de AHAS se aplica en una cantidad suficiente para controlar las malezas, mientras que no tiene sustancialmente efecto sobre las plantas de soja evento 127.

[00164] En algunas realizaciones, las malezas pueden ser controladas antes de la siembra de semillas de soja evento 127 en un área. Por ejemplo, herbicidas no selectivos, como herbicidas inhibidores de AHAS, pueden aplicarse a un área antes de sembrar la semilla en una cantidad efectiva para reducir o eliminar malezas en un área antes de sembrar la semilla. Estas aplicaciones pueden ocurrir en cualquier cantidad de tiempo antes de la siembra, efectivo para controlar las malezas, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o más días antes de la siembra. Además, en estos métodos puede aplicarse cualquier combinación de composiciones agrícolas,

[00165] En otras realizaciones, las malezas pueden ser controladas después de la siembra de semillas de soja evento 127. Por ejemplo, los herbicidas inhibidores de AHAS pueden aplicarse a una planta de soja en crecimiento, partes de plantas, medio de cultivo (como el suelo) que rodea la planta en crecimiento y adyacente a la misma, o a un área, es decir, el medio ambiente local, en la cual una planta o plantas de soja evento 127 están creciendo, en una cantidad efectiva para controlar las malezas en el área. La planta de soja evento 127 en crecimiento puede estar en cualquier estadio de desarrollo. En algunas realizaciones, la soja en crecimiento está al menos en el estadio de primera hoja verdadera en el momento en que se aplica el herbicida. Además, en estos métodos puede aplicarse cualquier combinación de composiciones agrícolas.

[00166] Cuando se utilizan combinaciones de composiciones agrícolas en los métodos, estas combinaciones pueden incluir combinaciones de herbicidas, fungicidas, bactericidas, insecticidas, y similares. Por ejemplo, un herbicida inhibidor de AHAS puede ser combinado con otros herbicidas, como herbicidas inhibidores de 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), herbicidas inhibidores de glutamina sintasa (GS), herbicidas inhibidores de protoporfirinógeno [IX] oxidasa (PPO), herbicidas auxínicos, o combinaciones de los mismos.

## **IX. Métodos para aumentar el rendimiento**

[00167] También se proporcionan métodos para el rendimiento de una planta o plantas de soja que comprenden aplicar una cantidad efectiva de un herbicida inhibidor de AHAS a un área cultivada que tiene una o más plantas de soja evento 127 y cosechar semillas de las plantas de soja. En algunas realizaciones, el aumento en el rendimiento de la planta o plantas de soja es el resultado de una disminución de las malezas que crecen en el área local de la planta o plantas de soja, las cuales normalmente competirían con la planta o

plantas de soja.

[00168] Mediante el uso de estos métodos, puede aumentarse el rendimiento de la soja en un área en comparación con un área comparable que no tiene plantas de soja evento 127. El rendimiento de la soja puede aumentarse en cualquier cantidad, incluyendo entre otros, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 20%, 25% o más en comparación con el obtenido a partir de una superficie comparable en la cual se aplica una cantidad efectiva de un herbicida inhibidor de AHAS a un área que no tiene plantas de soja evento 127.

### **X. Composiciones químicas agrícolas**

[00169] La presente invención también proporciona composiciones agrícolas para aplicar a las plantas de soja evento 127 descritas. Estas composiciones pueden incluir herbicidas, fungicidas, bactericidas, fertilizantes, y similares. En una realización, las composiciones agrícolas son composiciones herbicidas que comprenden uno o más herbicidas o combinaciones de uno o más herbicidas con otra composición agrícola, como un fungicida, bactericidas, fertilizantes, y similares.

[00170] Puede aplicarse cualquier herbicida al cultivo de soja evento 127, parte de un cultivo, o el área cultivada que contiene una planta de soja evento 127. La clasificación de los herbicidas (es decir, la agrupación de herbicidas en clases y subclases) es bien conocida en el arte e incluye las clasificaciones de HRAC (Herbicide Resistance Action Committee - *Comité de Acción de Resistencia a Herbicidas*) y WSSA (Weed Science Society of America - Sociedad Americana de Ciencia de las Malezas). La clasificación de HRAC está disponible, por ejemplo, en Internet en el sitio web

[hracglobal.com/Publications/ClassificationofHerbicideModeofAction/tabid/222/Default.aspx](http://hracglobal.com/Publications/ClassificationofHerbicideModeofAction/tabid/222/Default.aspx).

Una versión abreviada de la clasificación de HARC (con notas sobre el grupo de WSSA correspondiente).

[00171] En algunas realizaciones, la presente invención proporciona métodos que comprenden el uso de al menos un herbicida inhibidor de AHAS seleccionado del grupo consistente en herbicidas imidazolinona, herbicidas sulfonilurea, herbicidas triazolpirimidina, herbicidas pirimidiniloxibenzoato, herbicidas sulfonilamino carboniltriaolinona, y mezclas de los mismos. En estos métodos, el herbicida inhibidor de AHAS puede ser aplicado por cualquier método conocido en la técnica, incluyendo entre otros, tratamiento de semillas, tratamiento

de suelos y tratamiento foliar.

[00172] En algunas realizaciones, el herbicida inhibidor de AHAS puede combinarse con una o más composiciones agrícolas adicionales, como composiciones herbicidas, fungicidas, bactericidas, antivirales adicionales, o combinaciones de las mismas. Los herbicidas adicionales para usar en las combinaciones incluyen cualquier herbicida, incluyendo herbicidas sulfamida, herbicidas organofosforados, y herbicidas benzotiadiazinona. Los herbicidas sulfamida incluyen entre otros a saflufenacilo. Los herbicidas organofosforados incluyen entre otros a glifosato y glufosinato. Los herbicidas benzotiadiazinona incluyen entre otros a bentazon. Los fungicidas para usar en estas combinaciones incluyen entre otros a piraclostrobina.

[00173] El tratamiento con combinaciones de composiciones herbicidas inhibidores de AHAS y/o con una o más composiciones de herbicidas inhibidores de AHAS y una o más composiciones agrícolas adicionales puede ocurrir por la aplicación de una mezcla de estas composiciones, la co-aplicación de estas composiciones, la aplicación secuencial de estas composiciones, o cualquier combinación de estas.

[00174] En algunas realizaciones, las composiciones de herbicidas inhibidores de AHAS comprenden al menos un A) herbicida inhibidor de AHAS y al menos un compuesto activo adicional, seleccionado entre B) herbicidas de clases b1) a b15):

- b1) inhibidores de la biosíntesis de lípidos;
- b2) inhibidores de acetolactato sintasa (inhibidores de AHAS);
- b3) inhibidores de la fotosíntesis;
- b4) inhibidores de protoporfirinógeno-IX oxidasa;
- b5) herbicidas blanqueantes;
- b6) inhibidores de enolpiruvilshiquimato 3-fosfato sintasa (inhibidores de EPSP);
- b7) inhibidores de glutamina sintasa;
- b8) inhibidores de 7,8-dihidropteroato sintasa (inhibidores de DHP);
- b9) inhibidores de la mitosis;
- b10) inhibidores de la síntesis de ácidos grasos de cadena larga (inhibidores de VLCFA);
- b11) inhibidores de la biosíntesis de celulosa;
- b12) herbicidas desacoplantes;
- b13) herbicidas auxina;

b14), inhibidores del transporte de auxina;

b15) otros herbicidas seleccionados del grupo formado por benzoilprop, flamprop, flamprop-M, bromobutida, clorflurenol, cinmetilina, metildimurón, etobenzanida, fosamina, metam, piributicarb, oxaziclomefona, dazomet, triaziflam y bromuro de metilo, y

las sales aceptables desde el punto de vista agrícola de los compuestos activos B y los derivados aceptables desde el punto de vista agrícola de los compuestos activos B, siempre que tengan un grupo carboxilo.

En otros casos, tal combinación de al menos un A herbicida inhibidor de AHAS y al menos un herbicida B puede utilizarse en combinación con un protector C (estos protectores pueden utilizarse también en combinación con al menos un herbicida inhibidor de AHAS). Los protectores C pueden ser seleccionados entre: benoxacor, cloquintocet, ciometrinil, diclormid, diciclonón, dietholate, fenclorazol, fenclorim, flurazol, fluxofenim, furilazol, isoxadifeno, mefenpir, mefenato, anhídrido naftálico, 2,2,5-trimetil-1-3-(dicloroacetil)-1,3-oxazolidina (R-29148), 4-(dicloroacetil)-1-oxa-4-azaespiro[4.5]decano (AD-67; MON 4660) y oxabetrinilo, las sales aceptables desde el punto de vista agrícola de los compuestos activos C y los derivados aceptables desde el punto de vista agrícola de los compuestos activos C, siempre que tengan un grupo carboxilo.

[00175] Los ejemplos de herbicidas B, que pueden utilizarse en combinación con compuestos inhibidores de AHAS son:

b1) del grupo de inhibidores de la biosíntesis de lípidos: clorazifop, clodinafop, clofop, cihalofop, diclofop, fenoxaprop, fenoxaprop-p, fentiaprop, fluazifop, fluazifop-P, haloxifop, haloxifop-P, isoxapirifop, metamifop, propaquizafop, quizalofop, quizalofop-P, trifop, alloxidim, butroxidim, cletodim, cloproxidim, cicloxidim, profoxidim, setoxidim, tepraloxidim, tralkoxidim, butilato, cicloato, dialato, dimepiperato, EPTC, esprocarb, etiolato, isopolinato, metiobencarb, molinato, orbencarb, pebulato, prosulfocarb, sulfalato, tiobencarb, tiocarbazilo, trialato, vernolato, benfuresato, etofumesato y bensulide;

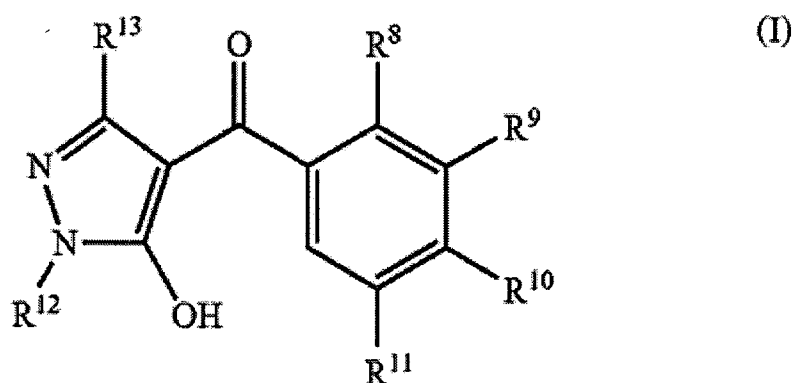
b2) del grupo de los inhibidores de AHAS: amidosulfurón, azimsulfuron, bensulfurón, clorimurón, clorsulfurón, cinosulfurón, ciclosulfamurón, etametsulfurón, etoxisulfurón, flazasulfurón, flupirsulfurón, foramsulfurón, halosulfurón, imazosulfurón, yodosulfurón, mesosulfurón, metsulfurón, nicosulfurón, oxasulfurón, primisulfurón, prosulfurón, pirazosulfurón, rimsulfurón, sulfometurón, sulfosulfurón, tifensulfurón, triasulfurón, tribenurón, trifloxisulfurón, triflusulfurón, tritosulfurón, imazametabenz, imazamox, imazapic, imazapir,

imazaquina, imazetapir, cloransulam, diclosulam, florasulam, flumetsulam, metosulam, penoxsulam, bispiribac, piriminobac, propoxycarbazona, flucarbazona, piribenzoxima, piriftalid y piritiobac;

b3) del grupo de inhibidores de la fotosíntesis: atratón, atrazina, ametrina, aziprotrina, cianazina, cianatrina, clorazina, ciprazina, desmetrina, dimetametrina, dipropetrina, eglinazina, ipazina, mesoprazina, metometón, metoprotrina, prociazina, proglinazina, prometón, prometrina, propazina, sebutilazina, secbumetón, simazina, simetón, simetrina, terbumetón, terbutilazina, terbutrina, trietazina, ametridiona, amibuzina, hexazinona, isometiozina, metamitrón, metribuzina, bromacil, isocil, lenacil, terbacil, brompirazón, cloridazón, dimidazón, desmedifam, fenisofam, fenmedifam, etil-fenmedifam, benztiazurón, butiurón, etidimurón, isourón, metabenztiazurón, monoisourón, terbutiourón, tiazaflurón, anisurón, buturón, clorbromurón, cloreturón, clorotolurón, cloroxurón, difenoxurón, dimefurón, diurón, fenurón, fluometurón, fluotiurón, isoproturón, linurón, metiurón, metobenzurón, metobromurón, metoxurón, monolinurón, monurón, neburón, paraflurón, fenobenzurón, sidurón, tetraflurón, tidiazurón, ciperquat, dietamquat, difenzoquat, dicuat, morfamquat, paraquat, bromobonil, bromoxinil, cloroxinil, iodobonil, ioxinil, amicarbazona, bromofenoxim, flumezina, metazol, bentazona, propanil, pentanoclor, piridato y piridafol;

b4) del grupo de inhibidores de protoporfirinógeno-IX oxidasa: acifluorfen, bifenox, clometoxifeno, clornitrofen, etoxifeno, fluorodifeno, fluoroglicofeno, fluoronitrofen, fomesafen, furiloxifeno, halosafen, lactofeno, nitrofen, nitrofluorfen, oxifluorfen, fluazolato, piraflufeno, etil-cinidón, flumiclorac, flumioxazina, flumipropina, flutiacet, tidiazimina, oxadiazón, oxadiargilo, azafenidina, carfentrazona, sulfentrazona, pentoxazona, benzfendizona, butafenacilo, piraclonil, profluazol, flufenpir, flupropacil, nipiraclofen y etnipromida;

[00176] b5) del grupo de herbicidas blanqueantes: metflurazón, norflurazón, flufenican, diflufenican, picolinafen, beflubutamida, fluridone, flurocloridona, flurtamona, mesotriona, sulcotriona, isoxaclortol, isoxaflutol, benzofenap, pirazolinato, pirazoxifeno, benzobiciclón, amitrol, clomazona, aclonifen, 4-(3-trifluorometilfenoxi)-2-(4-trifluorometilfenil)-pirimidina, y también derivados benzoílo sustituidos con 3-heterociclilo de la Fórmula I:



en la cual las variables R<sup>8</sup> a R<sup>13</sup> son las definidas a continuación: R<sup>8</sup>, R<sup>10</sup> son hidrógeno, halógeno, alquilop C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, haloalcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquiltio C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquilsulfinilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o alquilsulfonilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>; R<sup>9</sup> es un radical heterocíclico seleccionado del grupo que consiste de: tiazol-2-ilo, tiazol-4-ilo, tiazol-5-ilo, isoxazol-3-ilo, isoxazol-4-ilo, 10 isoxazol-5-ilo, 4,5-dihidroisoxazol-3-ilo, 4,5-dihidroisoxazol-4-ilo y 4,5-dihidroisoxazol-5-ilo, donde los nueve radicales mencionados pueden ser no sustituidos o mono- o polisustituidos, por ejemplo, mono-, di-, tri- o tetrasustituidos, por halógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, haloalcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> o alquiltio C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>; R<sup>11</sup> es hidrógeno, halógeno o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>; R<sup>12</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>; R<sup>13</sup> es hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>.

b6) del grupo de inhibidores de EPSP sintasa: glifosato;

b7) del grupo de inhibidores de glutamina sintasa: glufosinato y bilanafos;

b8) del grupo de inhibidores de DHP sintasa: asulam;

b9) del grupo de inhibidores de la mitosis: benfluralina, butralina, dinitramina, etalfluralina, flucloalina, isopropalina, metalpropalina, nitalina, orizalina, pendimetalina, prodiamina, profluralina, trifluralina, metil-amiprofós, butamifós, ditiopir, tiazopir, propizamida, tebutam, clortal, carbetamida, clorbufam, clorprofam y profam;

b10) del grupo de inhibidores de VLCFA: acetoclor, alaclor, butaclor, butenaclor, delaclor, dietatilo, dimetaclor, dimetenamid, dimetenamid-P, metazaclor, metolaclor, S-metolaclor, pretilaclor, propaclor, propisoclor, prinaclor, terbuclor, tenilclor, xilaclor, alidoclor, CDEA, epronaz, difenamid, napropamida, naproanilida, petoxamida, flufenacet, mefenacet, fentrazamida, anilofós, piperofós, cafenstrol, indanofan y tridifano;

b11) del grupo de inhibidores de la biosíntesis de celulosa: diclobenil, clortiamid, isoxaben y flupoxam;

b12) del grupo de herbicidas desacoplantes: dinofenato, dinoprop, dinosam, dinoseb, dinoterb, DNOC, etinofeno y medinoterb;

b13) del grupo de herbicidas auxina: clomeprop, 2,4-D, 2,4,5-T, MCPA,

MCPA tiioetilo, diclorprop, diclorprop-P, mecoprop, mecoprop-P, 2,4-DB, MCPB, cloramben, dicamba, 2,3,6-TBA, tricamba, quinclorac, quinmerac, clopiralid, fluroxipir, picloram, triclopir y benazolina;

b14) del grupo de inhibidores del transporte de auxina: naptalam, diflufenzopir;

b15) benzoilprop, flamprop, flamprop-M, bromobutida, clorflurenol, cinmetilina, metildimrón, etobenzanid, fosamine, metam, piributicarb, oxaziclomefona, dazomet, triaziflam y bromuro de metilo.

[00177] Los compuestos activos B de los grupos b1) a b15) y los compuestos activos C son herbicidas y protectores conocidos, véase, por ejemplo, The Compendium of Pesticide Common Names (disponible en internet en el sitio [hclrss.demon.co.uk/index.html](http://hclrss.demon.co.uk/index.html)); Farm Chemicals Handbook 2000 Vol. 86, Meister Publishing Company, 2000; B. Hock, C. Fedtke, R. R. Schmidt, Herbicide, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1995; W. H. Ahrens, Herbicide Handbook, 7th Edition, Weed Science Society of America, 1994; y K. K. Hatzios, Herbicide Handbook, Supplement to 7th Edition, Weed Science Society of America, 1998. La 2,2,5-trimetil-3-(dicloroacetil)-1,3-oxazolidina [CAS N° 52836-31-4] es conocida también con el nombre de R-29148. El 4-(Dicloroacetil)-1-oxa-4-azaespiro[4.5]decano [CAS N° 71526-07-03] es conocido también con los nombres de AD-67 y MON 4660. Los herbicidas blanqueantes de Fórmula II se describen en WO 96/26202, WO 97/41116, WO 97/41117 y WO 97/41118.

[00178] Como componentes activos C, las composiciones pueden comprender al menos uno de los compuestos listados a continuación: benoxacor, cloquintocet, diclormid, fenclorazol, fenclorim, fluxofenim, furilazol, isoxadifeno, mefenpir, 2,2,5-trimetil-3-(dicloroacetil)-1,3-oxazolidina, 4-(dicloroacetil)-1-oxa-4-azaespiro[4.5]decano y oxabetrinilo y/o una sal de los mismos aceptable desde el punto de vista agrícola y/o, en el caso de los compuestos que tienen un grupo COOH, un derivado aceptable desde el punto de vista agrícola.

[00179] Las composiciones que contiene combinaciones de principios activos pueden ser composiciones binarias y ternarias que comprenden al menos un compuesto inhibidor de AHAS como compuesto activo A y al menos un herbicida seleccionados de las clases b1) a b15) y, si corresponde, uno o más protectores C.

[00180] En composiciones binarias que comprenden al menos un compuesto inhibidor de AHAS como componente A y al menos un herbicida B, la relación de peso de los compuestos activos A:B puede estar en el rango de 1:500

a 10:1, en el rango de 1:100 a 10:1, en el rango de 1:50 a 10:1, o en el rango de 1:25 a 5:1.

[00181] En composiciones binarias que comprenden al menos un compuesto inhibidor de AHAS y al menos un protector C, la relación de peso de los compuestos activos A:C está generalmente en el rango de 1:100 a 10:1, de 1:50 a 10:1, o en el rango de 1:25 a 5:1.

[00182] En composiciones ternarias que comprenden un compuesto inhibidor de AHAS como componente A, al menos un herbicida B y al menos un protector C, las relaciones de peso relativas de los componentes A:B:C pueden estar en el rango de 10:1:1 a 1:500:10, de 10:1:1 a 1:100:10, de 10:1:1 a 1:50:1, o de 5:1:1 a 1:25:5. En una realización, en las composiciones ternarias, la relación de peso del herbicida B con respecto al protector C está en el rango de 50:1 a 1:10.

[00183] Las mezclas activas desde el punto de vista herbicida descritas en la Patente Estadounidense N° 7.375.058 (incorporada a la presente como referencia en su totalidad) también pueden utilizarse en tratamientos relacionados con plantas de soja evento 127.

[00184] Los herbicidas inhibidores de protoporfirinógeno [IX] oxidasa (PPO) también encuentran aplicación en las composiciones de la presente invención. Los herbicidas inhibidores de PPO son conocidos en el arte e incluyen, entre otros, herbicidas difeniléter (incluyendo herbicidas nitrofenil éter), como acifluorfen (ácido 5-[2-cloro-4-(trifluorometil)fenoxi]-2-nitrobenzoico), bifenox (5-(2,4-diclorofenoxi)-2-nitrobenzoato de metilo), DPEI (5-[2-cloro-4-(trifluorometil)fenoxi]-2-nitroacetofenona oxima-o-(ácido acético, éster metílico)), DPEII (5-[2-cloro-4-(trifluorometil)fenoxi]-3-metoxiftalida), etoxifen ((1S)-1-carboxietil 2-cloro-5-[2-cloro-4-(trifluorometil)fenoxi]benzoato), fomesafen (5-[2-cloro-4-(trifluorometil)fenoxi]-N-(metilsulfonil)-2-nitrobenzamida), lactofen (etil O-[5-(2-cloro- $\alpha,\alpha,\alpha$ -trifluoro-p-toliloxi)-2-nitrobenzoil]-DL-lactato), y oxifluorfen (2-cloro-1-(3-etoxi-4-nitrofenoxi)-4-(trifluorometil)benceno). Los herbicidas inhibidores de PPO también incluyen herbicidas dicarboximida como N-fenil-ftalimidas, flumiclorac (ácido [2-cloro-5-(ciclohex-1-eno-1,2-dicarboximido)-4-fluororofenoxi]acético), flumioxazin (N-(7-fluoro-3,4-dihidro-3-oxo-4-prop-2-inil-2H-1,4-benzoxazin-6-il)ciclohex-1-eno-1,2-dicarboxamida). Los herbicidas inhibidores de PPO incluyen además herbicidas triazolinona como carfentrazona (ácido  $\alpha$ ,2-dicloro-5-[4-(difluorometil)-4,5-dihidro-3-metil-5-oxo-1H-1,2,4-triazol-1-il]-4-fluorobencenpropanoico), y sulfentrazona (N-[2,4-dicloro-5-[4-(difluorometil)-4,5-dihidro-3-metil-5-oxo-1H-1,2,4-triazol-1-

il]fenil]metansulfonamida). Los herbicidas inhibidores de PPO incluyen también herbicidas fenilpirazol, incluyendo, entre otros, nipiraclofeno (1-[2,6-dicloro-4-(trifluorometil)fenil]-4-nitro-1H-pirazol-5-amina) y piraflufeno (ácido 2-cloro-5-(4-cloro-5-difluorometoxi-1-metilpirazol-3-il)-4-fluorofenoxiacético). Los herbicidas inhibidores de PPO incluyen también herbicidas oxadiazolona como oxadiazon (3-[2,4-dicloro-5-(1-metiletoxi)fenil]-5-(1,1-dimetiletil)-1,3,4-oxadiazol-2(3H)-ona) y oxadiargilo (5-ter-butil-3-[2,4-dicloro-5-(prop-2-inilo)fenil]-1,3,4-oxadiazol-2(3H)-ona). Los herbicidas inhibidores de PPO incluyen además herbicidas tiadiazolona como flutiacet (ácido [[2-cloro-4-fluoro-5-[(tetrahydro-3-oxo-1H,3H-[1,3,4]tiadiazolo[3,4-a]piridazin-1-iliden)amino]fenil]tio]acético); así como también los descritos en la sección III.4) de US2008254985 de Zagar y Sievernich (incorporada a la presente como referencia en su totalidad).

[00185] Los herbicidas auxínicos también encuentran aplicación en las composiciones de la presente invención. Los herbicidas auxínicos incluyen aquellos que comprenden principios activos herbicidas cuyo modo de acción es como auxinomiméticos o inhibidores de auxina (antiauxinas). Los ejemplos de herbicidas auxínicos incluyen, entre otros, picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico); dicamba (ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico); ácido clofibrico ((ácido p-clorofenoxi)isobutírico); ácido 2-(4-clorofenoxi)-2-metilpropanoico; benazolin (ácido 4-cloro-2-oxo-3-benzotiazolacético; ácido 4-cloro-2-oxobenzotiazolin-3-il-acético); TIBA (ácido 2,3,5-triiodobenzoico); 2,3,6-TBA (ácido 2,3,6-triclorobenzoico); triclopir (ácido 3,5,6-tricloro-2-piridiloxiacético); quinclorac (ácido 3,7-dicloroquinolin-8-carboxílico); y los herbicidas fenoxi auxinomiméticos o bloqueantes de auxina, por ejemplo, herbicidas fenoxiacéticos, fenoxipropiónicos y fenoxibutíricos herbicidas, incluyendo: 2,4-D (ácido (2,4-diclorofenoxi)acético), MCPA (ácido (4-cloro-2-metilfenoxi)acético), 2,4-DB (ácido 4-(2,4-diclorofenoxi)butírico), 2,4-DEP (tris[2-(2,4-diclorofenoxi)etil] fosfato), 4-CPA (ácido 4-clorofenoxiacético), 2,4,5-T (ácido (2,4,5-triclorofenoxi)acético), diclorprop (ácido 2-(2,4-diclorofenoxi)propanoico), fenoprop (ácido 2-(2,4,5-triclorofenoxi)propanoico), y mecoprop (ácido 2-(2-metil-4-cloro-fenoxi)propiónico).

[00186] Los ejemplos de combinaciones de composiciones agrícolas de la presente invención incluyen: imazapir e imazapic; imazapir y bentazon; imazapir, imazapic y bentazon; imazapir y piraclostrobina; imazapir, imazapic y piraclostrobina; imazapir y saflufenacilo; imazapir, imazapic y saflufenacilo; imazapic, saflufenacilo y glifosato; imazapir, imazapic, saflufenacilo y glifosato; imazapic y glifosato; imazapir y glifosato; imazapir, saflufenacilo y glifosato; y

saflufenacilo y glifosato.

[00187] Antes de la aplicación, el herbicida, como un herbicida inhibidor de AHAS, puede ser transformado a las formulaciones habituales, por ejemplo, soluciones, emulsiones, suspensiones, polvos, polvos, pastas y gránulos. La forma de utilización depende de la finalidad en particular; en cada caso la misma debe asegurar una distribución fina y pareja del compuesto de acuerdo con la invención.

[00188] Las formulaciones para usar en los métodos de la presente invención pueden prepararse en cualquier forma conocida, por ejemplo, mediante la extensión del compuesto activo con auxiliares adecuadas para la formulación de agroquímicos, como solventes y/o soportes, si se desea emulsionantes, tensioactivos y dispersantes, conservantes, agentes antiespumantes, agentes anticongelantes, para una formulación de tratamiento de semillas también, opcionalmente, colorantes y/o agentes ligantes y/o gelificantes.

[00189] Algunos ejemplos de solventes adecuados para usar en las formulaciones incluyen agua, solventes aromáticos (por ejemplo, productos Solvesso, xileno), parafinas (por ejemplo, fracciones de aceite mineral), alcoholes (por ejemplo, metanol, butanol, pentanol, alcohol bencílico), cetonas (por ejemplo, ciclohexanona, gamma-butirolactona), pirrolidonas (NMP, NOP), acetatos (diacetato de glicol), glicoles, dimetilamidas de ácidos grasos, ácidos grasos y ésteres de ácidos grasos. También pueden utilizarse mezclas de solventes.

[00190] Los ejemplos de soportes adecuados para usar en las formulaciones de la presente invención son minerales del suelo naturales (por ejemplo, caolines, arcillas, talco, tiza) y minerales del suelo sintéticos (por ejemplo, sílice de alta dispersión, silicatos).

[00191] Los emulsionantes adecuados para usar en las formulaciones de la presente invención incluyen emulsificantes no iónicos y aniónicos (por ejemplo, éteres de polioxietileno con alcoholes grasos, alquilsulfonatos y arilsulfonatos).

[00192] Los ejemplos de dispersantes para usar en las formulaciones de la presente invención incluyen licores residuales de lignina-sulfito y metilcelulosa.

[00193] Los tensioactivos adecuados para usar en las formulaciones de la presente invención incluyen sales de metales alcalinos, metales alcalino-térreos y de amonio de ácido lignosulfónico, ácido naftalensulfónico, ácido fenolsulfónico, ácido dibutilnaftalensulfónico, alquilarilsulfonatos, sulfatos de alquilo, alquilsulfonatos, sulfatos de alcoholes grasos, éteres glicólicos de ácidos grasos y alcoholes grasos sulfatados, además de condensados de derivados naftalén-sulfonados y de naftaleno con formaldehído, condensados de naftaleno o de ácido

naftalensulfónico con fenol y formaldehído, polioxietilén octilfenol éter, isooctilfenol etoxilado, octilfenol, nonilfenol, alquilfenol poliglicol éteres, tributilfenil poliglicol éter, triestearilfenil poliglicol éter, alcoholes de alquilaril poliéter, condensados de alcohol y alcohol graso con óxido de etileno, aceite de ricino etoxilado, polioxietilén alquil éteres, polioxipropileno etoxilado, acetal de alcohol laurílico con poliglicol éter, ésteres de sorbitol, licores residuales de lignosulfito y metilcelulosa.

[00194] Las sustancias adecuadas para la preparación de soluciones aspersionables directamente, emulsiones, pastas o dispersiones oleosas son fracciones de aceites minerales de mediano y alto punto de ebullición, como queroseno o aceite diesel, además de aceites de alquitrán de hulla y aceites de origen vegetal o animal, hidrocarburos alifáticos, cíclicos y aromáticos, por ejemplo, tolueno, xileno, parafina, tetrahidronaftaleno, naftalenos alquilados o sus derivados, metanol, etanol, propanol, butanol, ciclohexanol, ciclohexanona, isoforona, solventes altamente polares, por ejemplo, dimetilsulfóxido, N-metilpirrolidona o agua.

[00195] Pueden añadirse también a la formulación agentes anticongelantes, como glicerina, etilenglicol, propilenglicol y bactericidas.

[00196] Los agentes antiespumantes para usar en las formulaciones de la presente invención incluyen, por ejemplo, agentes antiespumantes en base a silicio o estearato de magnesio.

[00197] Los conservantes adecuados para usar en las formulaciones de la presente invención incluyen, por ejemplo, diclorofenol y bencilalcoholhemiformaldehído.

[00198] Las formulaciones para tratamiento de semillas de la presente invención pueden además incluir ligantes y, opcionalmente, colorantes.

[00199] Pueden añadirse ligantes a las formulaciones para semillas descritas a fin de mejorar la adherencia de los materiales activos a las semillas después del tratamiento. Los ligantes adecuados son copolímeros de bloque tensioactivos EO/PO, y también polivinilalcoholes, polivinilpirrolidonas, poliácridatos, polimetacrilatos, polibutenos, poliisobutilenos, poliestireno, polietilenaminas, polietilenamidas, polietileniminas (Lupasol®, Polymin®), poliéteres, poliuretanos, acetato de polivinilo, tilosa y copolímeros derivados de estos polímeros.

[00200] Opcionalmente, también pueden incluirse colorantes en la formulación. Los colorantes o tintes adecuados para formulaciones de tratamiento de semillas son Rodamina B, C.I. Pigmento Rojo 112, C.I. Solvente Rojo 1,

pigmento azul 15:4, pigmento azul 15:3, pigmento azul 15:2, pigmento azul 15:1, pigmento azul 80, pigmento amarillo 1, pigmento amarillo 13, pigmento rojo 112, pigmento rojo 48:2, pigmento rojo 48:1, pigmento rojo 57:1, pigmento rojo 53:1, pigmento anaranjado 43, pigmento anaranjado 34, pigmento anaranjado 5, pigmento verde 36, pigmento verde 7, pigmento blanco 6, pigmento marrón 25, violeta básico 10, violeta básico 49, rojo ácido 51, rojo ácido 52, rojo ácido 14, azul ácido 9, amarillo ácido 23, rojo básico 10, rojo básico 108.

[00201] Un ejemplo de un agente gelificante adecuado es carragenina (Satiagel®).

[00202] Los polvos, materiales para dispersión, y productos para espolvorear puede prepararse mezclando o moliendo en forma concomitante sustancias activas con un soporte sólido.

[00203] Pueden prepararse gránulos, por ejemplo gránulos recubiertos, gránulos impregnados y gránulos homogéneos mediante unión de los compuestos activos a soportes sólidos. Son ejemplos de soportes sólidos tierras minerales como geles de sílice, silicatos, talco, caolín, attaclay, piedra caliza, cal, yeso, bol, loess, arcilla, dolomita, tierra de diatomeas, sulfato de calcio, sulfato de magnesio, óxido de magnesio, materiales sintéticos del suelo, fertilizantes como por ejemplo sulfato de amonio, fosfato de amonio, nitrato de amonio, ureas, y productos de origen vegetal como harina de cereales, harina de corteza de árbol, harina de madera y harina de cáscara de nuez, polvos de celulosa y otros soportes sólidos.

[00204] En general, las formulaciones comprenden de 0,01 a 95% en peso, preferentemente de 0,1 a 90% en peso del herbicida, por ejemplo, el herbicida inhibidor de AHAS. Los herbicidas pueden ser empleados en una pureza de 90% a 100% en peso, preferentemente de 95% a 100% en peso (de acuerdo con el espectro de RMN). Para los propósitos de tratamiento de semillas, las formulaciones respectivas pueden ser diluidas 2-10 veces llevando a concentraciones en las preparaciones listas para usar de 0,01 a 60% en peso del compuesto activo, preferentemente 0,1 a 40% en peso.

[00205] Un herbicida inhibidor de AHAS de la presente invención puede utilizarse como tal, en la forma de sus formulaciones o las formas de uso preparadas a partir de las mismas, por ejemplo en forma de soluciones aspersionables directamente, polvos, suspensiones o dispersiones, emulsiones, dispersiones oleosas, pastas, productos espolvoreables, materiales para dispersión, o gránulos, mediante aspersión, atomización, espolvoreo, dispersión o vertido. Las formas de utilización dependen enteramente de los fines previstos, las

mismas están destinadas a asegurar en cada caso la mejor distribución posible del herbicida inhibidor de AHAS de acuerdo con la invención.

[00206] Las formas de uso acuosas pueden prepararse a partir de emulsiones concentradas, pastas o polvos humectables (polveros para aspersión, dispersiones oleosas) por adición de agua. Para preparar emulsiones, pastas o dispersiones oleosas, las sustancias, como tales o disueltas en un aceite o solvente, pueden ser homogeneizadas en agua por medio de un humectante, adhesivo, dispersante o emulsionante. Sin embargo, también es posible preparar concentrados compuestos de sustancia activa, humectante, adhesivo, dispersante o emulsionante y, si corresponde, solvente o aceite, y estos concentrados son adecuados para su dilución con agua.

[00207] Las concentraciones de compuesto activo en las preparaciones listas para usar pueden variar dentro de rangos relativamente amplios. En general, son de 0,0001 a 10%, preferentemente 0,01 a 1% en peso.

[00208] Los herbicidas inhibidores de AHAS de la presente invención también pueden utilizarse con éxito en el proceso de volumen ultra-bajo (*ultra-low volume* - ULV), siendo posible aplicar formulaciones que comprenden más de 95% en peso del componente activo, o aún aplicar el compuesto activo sin aditivos.

[00209] Los siguientes son ejemplos de formulaciones de herbicidas inhibidores de AHAS para usar en métodos de la presente invención:

[00210] 1. Productos para diluir con agua para aplicaciones foliares. A efectos del tratamiento de semillas, estos productos pueden ser aplicados a las semillas diluidos o sin diluir.

[00211] A) Concentrados solubles en agua (SL, LS)

Diez partes en peso del herbicida inhibidor de AHAS se disuelven en 90 partes en peso de agua o un solvente soluble en agua. Como alternativa, se añaden humectantes u otros auxiliares. El herbicida inhibidor de AHAS se disuelve por dilución con agua, mediante lo cual se obtiene una formulación con 10% (p/p) del herbicida inhibidor de AHAS.

[00212] B) Concentrados dispersables (DC)

Veinte partes en peso del herbicida inhibidor de AHAS se disuelven en 70 partes en peso de ciclohexanona con adición de 10 partes en peso de un dispersante, por ejemplo polivinilpirrolidona. La dilución con agua da una dispersión, mediante lo cual se obtiene una formulación con 20% (p/p) del herbicida inhibidor de AHAS.

[00213] C) Concentrados emulsionables (CE)

Quince partes en peso del herbicida inhibidor de AHAS se disuelven en 7 partes en peso de xileno con adición de dodecibencensulfonato de calcio y aceite de ricino etoxilado (en cada caso 5 partes en peso). La dilución con agua da una emulsión, mediante lo cual se obtiene una formulación con 15% (p/p) del herbicida inhibidor de AHAS.

[00214] D) Emulsiones (EW, EO, ES)

Veinticinco partes en peso del herbicida inhibidor de AHAS se disuelven en 35 partes en peso de xileno con adición dodecibencensulfonato de calcio y aceite de ricino etoxilado (en cada caso 5 partes en peso). Esta mezcla se introduce en 30 partes en peso de agua por medio de un equipo emulsificador (por ejemplo, Ultraturrax) y se convierte en una emulsión homogénea. La dilución con agua da una emulsión, mediante lo cual se obtiene una formulación con 25% (p/p) del herbicida inhibidor de AHAS.

[00215] E) Suspensiones (SC, OD, FS)

En un molino de bolas con agitación, 20 partes en peso del herbicida inhibidor de AHAS son triturados con adición de 10 partes en peso de dispersantes, humectantes y 70 partes en peso de agua o de un solvente orgánico para dar una suspensión fina del herbicida inhibidor de AHAS. La dilución con agua da una suspensión estable del herbicida inhibidor de AHAS, mediante lo cual se obtiene una formulación con 20% (p/p) del herbicida inhibidor de AHAS.

[00216] F) Gránulos dispersables en agua y gránulos solubles en agua (WG, SG)

Cincuenta partes en peso del herbicida inhibidor de AHAS son molidas finamente con adición de 50 partes en peso de dispersantes y humectantes y se transforman en gránulos dispersables en agua o solubles en agua por medio de dispositivos técnicos (por ejemplo, la extrusión, torre de pulverización, lecho fluido). La dilución con agua da una dispersión o solución estable del herbicida inhibidor de AHAS, mediante lo cual se obtiene una formulación con 50% (p/p) del herbicida inhibidor de AHAS.

[00217] G) Polvos dispersables en agua y polvos solubles en agua (WP, SP, SS, WS)

Setenta y cinco partes en peso del herbicida inhibidor de AHAS se muelen en un molino con rotor/estator con adición de 25 partes en peso de dispersantes, humectantes y gel de sílice. La dilución con agua da una dispersión o solución estable del herbicida inhibidor de AHAS, mediante lo cual se obtiene una formulación con 75% (p/p) del herbicida inhibidor de AHAS.

[00218] H) Formulaci3n en gel (GF)

En un molino de bolas con agitaci3n, 20 partes en peso del herbicida inhibidor de AHAS son triturados con adici3n de 10 partes en peso de dispersantes, 1 parte en peso de un agente gelificante, humectantes y 70 partes en peso de agua o de un solvente org3nico para dar una suspensi3n fina del herbicida inhibidor de AHAS. La diluci3n con agua da una suspensi3n estable del herbicida inhibidor de AHAS, mediante lo cual se obtiene una formulaci3n con 20% (p/p) del herbicida inhibidor de AHAS. Esta formulaci3n en gel es adecuada para usar como tratamiento para semillas.

[00219] 2. Productos a aplicar sin diluir para aplicaciones foliares. A los efectos del tratamiento de semillas, estos productos pueden ser aplicados a las semillas diluidos.

[00220] A) Polvos para espolvorear (DP, DS)

Cinco partes en peso del herbicida inhibidor de AHAS se muelen finamente y mezclan intimamente con 95 partes en peso de caol3n finamente dividido. Esto da un producto espolvoreable con 5% (p/p) del herbicida inhibidor de AHAS.

[00221] B) Gr3nulos (GR, FG, GG, MG)

Media parte en peso del herbicida inhibidor de AHAS es molida finamente y asociada con 95,5 partes en peso de soportes, mediante lo cual se obtiene una formulaci3n con 0,5% (p/p) del herbicida inhibidor de AHAS. Son m3todos corrientes la extrusi3n, secado por aspersi3n o lecho fluido. Esto produce gr3nulos que se aplicarán sin diluir para uso foliar.

[00222] Las formulaciones para tratamiento de semillas convencionales incluyen, por ejemplo, concentrados floables FS, soluciones LS, polvos para tratamiento en seco DS, polvos dispersables en agua para tratamiento en suspensi3n WS, polvos solubles en agua SS y emulsi3n ES y EC y formulaci3n en gel GF. Estas formulaciones pueden aplicarse a las semillas diluidas o sin diluir. La aplicaci3n a las semillas se lleva a cabo antes de la siembra o bien directamente sobre las semillas.

[00223] En una realizaci3n, se utiliza una formulaci3n FS para tratamiento de semillas. Por lo general, una formulaci3n FS puede comprender 1-800 g/l de principio activo, 1-200 g/l de tensioactivo, 0 a 200 g/l de agente anticongelante, 0 a 400 g/l de ligante, 0 a 200 g/l de un pigmento y hasta 1 litro de solvente, preferentemente agua.

[00224] Para el tratamiento de semillas, las semillas de plantas de soja evento 127 de la presente invenci3n son tratadas con herbicidas, como herbicidas

seleccionados del grupo que consiste de herbicidas inhibidores de AHAS como amidosulfurón, azimsulfurón, bensulfurón, clorimurón, clorsulfurón, cinosulfurón, ciclosulfamurón, etametsulfurón, etoxisulfurón, flazasulfurón, flupirsulfurón, foramsulfurón, halosulfurón, imazosulfurón, iodosulfurón, mesosulfurón, metsulfurón, nicosulfurón, oxasulfurón, primisulfurón, prosulfurón, pirazosulfurón, rimsulfurón, sulfometurón, sulfosulfurón, tifensulfurón, triasulfurón, tribenurón, trifloxisulfurón, triflusulfurón, tritosulfurón, imazametabenz, imazamox, imazapic, imazapir, imazaquina, imazetapir, cloransulam, diclosulam, florasulam, flumetsulam, metosulam, penoxsulam, bispiribac, piriminobac, propoxicarbazona, flucarbazona, piribenzoxima, piriftalid, piritiobac, y mezclas de los mismos, o con una formulación que comprende un herbicida inhibidor de AHAS.

[00225] El término tratamiento de semillas comprende todas las técnicas adecuadas de tratamiento de semillas conocidas en el arte, tales como desinfección de semillas (*"seed dressing"*), recubrimiento de semillas, espolvoreo de semillas, remojo de semillas y granulación de semillas.

[00226] De acuerdo con una variante de la presente invención, un tema adicional de la invención es un método de tratamiento del suelo mediante la aplicación, en particular en la sembradora de una formulación granular que contiene el herbicida inhibidor de AHAS como una composición/formulación (por ejemplo, una formulación granular, con opcionalmente uno o más sólidos o líquidos, soportes aceptables desde el punto de vista agrícola y/o, opcionalmente, con uno o más tensioactivos aceptables desde el punto de vista agrícola. Este método es empleado ventajosamente, por ejemplo, en semilleros de cereales, maíz, algodón y girasol.

[00227] La presente invención comprende también semillas recubiertas o que contienen una formulación para tratamiento de semillas que comprende al menos un herbicida inhibidor de AHAS seleccionado del grupo que consiste de amidosulfurón, azimsulfurón, bensulfurón, clorimurón, clorsulfurón, cinosulfurón, ciclosulfamurón, etametsulfurón, etoxisulfurón, flazasulfurón, flupirsulfurón, foramsulfurón, halo sulfurón, imazosulfurón, iodosulfurón, mesosulfurón, metsulfurón, nicosulfurón, oxasulfurón, primisulfurón, prosulfurón, pirazosulfurón, rimsulfurón, sulfometurón, sulfosulfurón, tifensulfurón, triasulfurón, tribenurón, trifloxisulfurón, triflusulfurón, tritosulfurón, imazametabenz, imazamox, imazapic , imazapir, imazaquina, imazetapir, cloransulam, diclosulam, florasulam, flumetsulam, metosulam, penoxsulam, bispiribac, piriminobac, propoxicarbazona, flucarbazona, piribenzoxima, piriftalida y piritiobac.

[00228] El término "semilla" comprende semillas y propágulos de plantas de todo tipo incluyendo entre otros semillas sexuales, fragmentos de semillas, retoños, bulbos, frutos, tubérculos, esquejes, brotes, y similares. En una realización preferida se emplean sexuales. "Semillas sexuales" se refiere a un óvulo maduro de una planta que contiene un embrión, y que se encuentra encerrado dentro de la cubierta o testa de una semilla, así como a estructuras reproductivas similares a semillas que pueden contener a este encerrado en un pericarpio o cáscara, por ejemplo, como una carióspside o aquenio .

[00229] El término "recubierto con y/o que contiene" generalmente significa que el principio activo está en su mayor parte sobre la superficie del producto de propagación en el momento de la aplicación, aunque una parte mayor o menor de los componentes pueden penetrar en el producto de propagación, dependiendo del método de aplicación. Cuando el producto de propagación mencionado se planta o vuelve a plantar, puede absorber el principio activo.

[00230] La aplicación para tratamiento de semillas con el herbicida inhibidor de AHAS o con una formulación que comprende el herbicida inhibidor de AHAS se lleva a cabo mediante aspersión o espolvoreado de las semillas antes de sembrar las plantas y antes de la emergencia de las mismas.

[00231] En el tratamiento de semillas, las formulaciones correspondientes son aplicadas por el tratamiento de semillas con una cantidad efectiva de herbicida inhibidor de AHAS o de una formulación que comprende el herbicida inhibidor de AHAS. En la presente, las tasas de aplicación son generalmente de 0,1 g a 10 kg de la i.a. (o de la mezcla de la i.a. o de la formulación) por 100 kg de semillas, preferentemente de 1 g a 5 kg por cada 100 kg de semilla, en particular de 1 g hasta 2,5 kg por 100 kg de semilla. Para cultivos específicos como lechuga, la tasa puede ser superior.

[00232] Cualquier formulación herbicida aplicada a una planta de soja evento 127 puede ser preparada como una composición de "mezcla de tanque". En estas realizaciones, cada componente o una combinación de componentes pueden almacenarse separadamente unos de otros. Los componentes pueden ser mezclados con otros antes de la aplicación. Por lo general, dicha mezcla se produce poco antes de la aplicación. En un proceso de mezcla de tanque, cada componente antes de la mezcla por lo general está presente en el agua o un solvente orgánico apropiado. Los métodos y orientaciones para la preparación de estas formulaciones son conocidos en el arte.

[00233] Los métodos permiten además el desarrollo de combinaciones

herbicidas para utilizar con plantas de soja evento 127. En esos métodos, se evalúan las condiciones ambientales en un área cultivada. Las condiciones ambientales que pueden ser evaluadas incluyen, entre otras, problemas referidos a la contaminación de aguas subterráneas y de superficie, uso previsto del cultivo, tolerancia de los cultivos, residuos del suelo, malezas presentes en el área de cultivo, textura del suelo, pH del suelo, cantidad de materia orgánica en el suelo, equipos de aplicación, y prácticas de labranza. Luego de la evaluación de las condiciones ambientales, puede aplicarse una cantidad efectiva de una combinación de herbicidas al cultivo, parte del cultivo, semillas del cultivo o al área de cultivo.

[00234] En algunas realizaciones, el herbicida aplicado a las plantas de soja evento 127 sirve para prevenir el inicio del crecimiento de malezas o plantas no deseadas susceptibles y/o sirve para causar daños a las malezas o plantas no deseadas que crecen en el área de interés. En algunas realizaciones, el herbicida o mezcla herbicida ejerce estos efectos en las malezas o plantas no deseadas que afectan los cultivos que posteriormente son plantados en el área de interés (es decir, el campo o el área de cultivo). En los métodos, no es necesario que la aplicación de la combinación herbicida ocurra al mismo tiempo. En tanto que el campo en el cual se siembra el cultivo contenga cantidades detectables del primer herbicida y el segundo herbicida se aplique en algún momento durante el período en el que el cultivo está en el área de cultivo, se considera que el cultivo ha sido tratado con una mezcla de herbicidas de acuerdo con la invención. De este modo, los métodos proporcionados abarcan aplicaciones de herbicidas que son “pre-emergentes”, “post-emergentes”, “de incorporación pre-siembra” y/o que comprenden el tratamiento de semillas antes de la siembra.

[00235] Además, se proporcionan métodos para el recubrimiento de semillas de plantas de soja evento 127. Los métodos comprenden recubrir una semilla con una cantidad efectiva de un herbicida o una combinación de herbicidas (como se describe en otra parte en la presente). Las semillas pueden ser plantadas luego en un área de cultivo. Se proporcionan además semillas de plantas de evento 127 que tienen un recubrimiento que comprende una cantidad efectiva de un herbicida o una combinación de herbicidas (como se describe en otra parte en la presente).

[00236] “Pre-emergente” se refiere a un herbicida que se aplica a un área de interés (por ejemplo, un campo o área de cultivo), antes de que una planta emerja visiblemente del suelo y/o antes de la germinación de la semilla. “Post-

emergente" se refiere a un herbicida que se aplica a un área después de que una planta emerja visiblemente del suelo. En algunos casos, los términos "pre-emergente" y "post-emergente" se usan con referencia a una maleza o planta no deseada en un área de interés y, en algunos casos, estos términos se usan con referencia a una planta de cultivo en un área de interés. Cuando se utilizan con referencia a una maleza o planta no deseadas, estos términos pueden aplicarse a sólo un tipo determinado de maleza o especie de maleza o planta no deseada que esté presente o se considere que está presente en el área de interés. Aunque puede aplicarse cualquier herbicida en un tratamiento pre-emergente y/o post-emergente, se sabe que algunos herbicidas son más efectivos en el control de una maleza o malezas o plantas no deseadas cuando se aplican ya sea en la pre-emergencia o en la post-emergencia. Por ejemplo, el rimsulfurón tiene actividad tanto pre-emergente como post-emergente, mientras que otros herbicidas tienen predominantemente actividad pre-emergente (metolaclor) o post-emergente (glifosato). Estas propiedades de los herbicidas en particular se conocen en el arte y son fácilmente determinadas por un experto en la materia. Además, un experto en la materia podrá fácilmente seleccionar los herbicidas y tiempos de aplicación apropiados para usar con las plantas transgénicas de la invención y/o en áreas en las cuales las plantas transgénicas de la invención van a sembrarse. "Incorporación pre-siembra" implica la incorporación de compuestos al suelo antes de la siembra.

[00237] Por consiguiente, se proporcionan métodos mejorados de cultivo y/o control de malezas o plantas no deseadas, como por ejemplo, "quema pre-siembra", en la cual se trata un área con uno o más herbicidas antes de la siembra del cultivo de interés para un mejor control de las malezas o plantas no deseadas. Se proporcionan también métodos de cultivo y/o control de malezas o plantas no deseadas que son "sin labranza" o "de baja labranza" (también conocidos como "de labranza reducida"). En estos métodos, la tierra no se cultiva o se cultiva con menos frecuencia durante el ciclo de crecimiento en comparación con los métodos tradicionales, estos métodos pueden ahorrar costos en los que de lo contrario se incurriría debido al cultivo adicional, incluyendo costos de mano de obra y combustible.

[00238] Los métodos comprenden el uso de aplicaciones simultáneas y/o secuenciales de múltiples clases de herbicidas. En algunas realizaciones, los métodos involucran el tratamiento de una planta de la invención y/o un área de interés (por ejemplo, un campo o área de cultivo) y/o malezas y/o plantas no

deseadas con sólo un herbicida u otro producto químico, como por ejemplo, un herbicida imidazolinona.

[00239] El momento en el cual se aplica un herbicida a un área de interés (y a cualquier planta en la misma) puede ser importante en la optimización del control de malezas o plantas indeseables. El momento en el cual se aplica un herbicida puede ser determinado con referencia al tamaño de las plantas y/o el estadio de crecimiento y/o desarrollo de las plantas en el área de interés, por ejemplo, las plantas de cultivo o las malezas o las plantas no deseadas que crecen en el área. Los estadios de crecimiento y/o desarrollo de las plantas son conocidos en el arte. Por ejemplo, las plantas de soja normalmente progresan a través de estadios de crecimiento vegetativo conocidos como  $V_E$  (emergencia),  $V_C$  (unifoliada),  $V_1$  (primer trifoliada), y  $V_2$  a  $V_N$ . La soja luego cambia a la fase de crecimiento reproductivo en respuesta a señales del fotoperíodo; los estadios reproductivos son  $R_1$  (principio de la floración),  $R_2$  (floración plena),  $R_3$  (principio de la formación de vainas),  $R_4$  (formación de vainas plena),  $R_5$  (comienzo de la formación de semillas),  $R_6$  (formación de semillas plena),  $R_7$  (comienzo de la madurez) y  $R_8$  (madurez plena). Así, por ejemplo, el momento en cual se aplica un herbicida u otro producto químico a un área de interés en que crecen plantas puede ser el momento en el que todas o algunas de las plantas en un área en particular han alcanzado por lo menos un tamaño y/o un estadio de crecimiento y/o desarrollo determinados, o el momento en el que algunas o todas las plantas en un área en particular aún no han alcanzado un tamaño y/o un estadio de crecimiento y/o desarrollo determinados.

[00240] En algunas realizaciones, las plantas de soja evento 127 muestran mejoras en la tolerancia a los tratamientos herbicidas post-emergentes. Por ejemplo, las plantas de evento 127 pueden ser tolerantes a dosis más altas de herbicida, tolerantes a una gama mayor de herbicidas (es decir, tolerancia a más productos químicos inhibidores de AHA), y/o pueden ser tolerantes a dosis de herbicida aplicadas en momentos anteriores o posteriores del desarrollo en comparación con una planta control apropiada.

[00241] Diferentes productos químicos como los herbicidas tienen diferentes efectos "residuales", es decir, diferentes cantidades de tiempo en los cuales el tratamiento con el producto químico o herbicida continúa teniendo efecto sobre las plantas en cultivo en el área tratada. Estos efectos pueden ser deseables o no, dependiendo de la finalidad futura deseado del área tratada (por ejemplo, el campo o área de cultivo). De este modo, puede elegirse un esquema

de rotación de cultivos en base a los efectos residuales de los tratamientos que se utilizarán para cada cultivo y su efecto sobre el cultivo que posteriormente se cultivará en la misma área. Un experto en la materia está familiarizado con las técnicas que pueden utilizarse para evaluar el efecto residual de un herbicida, por ejemplo, los herbicidas que actúan inhibiendo la AHAS varían en sus niveles de actividad residual. Las actividades residuales de los diversos herbicidas son conocidas en el arte, y también se sabe que varían con diferentes factores ambientales como, por ejemplo, niveles de humedad del suelo, temperatura, pH y composición del suelo (textura y materia orgánica). Las plantas de soja evento 127 encuentran utilidad particular en métodos de cultivo en los cuales es beneficiosa una mayor tolerancia a la actividad residual de un herbicida.

[00242] Además, las plantas de soja evento 127 de la presente invención proporcionan mayor tolerancia al tratamiento con otros productos químicos utilizados en cultivos junto con tratamientos herbicidas, como protectores, adyuvantes como sulfonato de amonio, concentrado oleoso para, y similares.

[00243] También, los métodos descritos puede comprender el uso de un herbicida inhibidor de AHAS o una mezcla de herbicidas, así como uno o más insecticidas, fungicidas, nematicidas, bactericidas, acaricidas, reguladores de crecimiento, quimioesterilizantes, semioquímicos, repelentes, atrayentes, feromonas, estimulantes de la alimentación u otros compuestos activos desde el punto de vista biológico, o bacterias virus u hongos entomopatógenos, para formar una mezcla de múltiples componentes que brinda un espectro aún más amplio de protección agrícola. Los ejemplos de estos protectores agrícolas que pueden utilizarse en los métodos incluyen: insecticidas, como abamectina, acefato, acetamiprid, amidoflumet (S-1955), avermectina, azadiractina, metil-azinfós, bifentrina, bifenazato, buprofezina, carbofurano, cartap, clorfenapir, clorfluazurón, clorpirifós, metil-clorpirifós, cromafenozida, clotianidina, ciflumetofeno, ciflutrina, beta-ciflutrina, cihalotrina, lambda-cihalotrina, cipermetrina, ciromazina, deltametrina, diafenthiurón, diazinón, dieldrina, diflubenzurón, dimeflutrina, dimetoato, dinotefuran, diofenolan, emamectina, endosulfán, esfenvalerato, etiprol, fenotiocarb, fenoxicarb, fenpropatrina, fenvalerato, fipronil, flonicamid, flubendiamida, flucitrinato, tau-fluvalinato, flufenerim (UR-50701), flufenoxurón, fonofós, halofenozida, hexaflomuro, hidrametilnón, imidacloprid, indoxacarb, isofenfós, lufenurón, malatión, metaflumizona, metaldehído, metamidofós, metidatión, metomilo, metopreno, metoxiclor, metoflutrina, monocrotofós, metoxifenoazida, nitenpiram, nitiazina, novalurón, noviflumurón (XDE-007), oxamilo,

paratión, metil-paratión, permetrina, forato, fosalona, fosmet, fosfamidón, pirimicarb, profenofós, proflutrina, pimetrozina, pirafluprol, piretrina, piridalil, piriprol, piriproxifeno, rotenona, rianodina, espinosad, espiroclorfenol, espiromesifeno (BSN 2060), espirotetramat, sulprofós, tebufenozida, teflubenzurón, teflutrina, terbufós, tetraclorvinfós, tiacloprid, tiametoxam, tiodicarb, tiosultap-sodio, tralometrina, triazamato, triclorfón y triflumurón; fungicidas como acibenzolar, aldimorf, amisulbrom, azaconazol, azoxistrobina, benalaxilo, benomilo, bentiavalicarb, isopropil-bentiavalicarb, binomial, bifenilo, bitertanol, blastidina-S, caldo bordelés (sulfato de cobre tribásico), boscalid/nicobifeno, bromuconazol, bupirimato, butiobato, carboxina, carpropamid, captafol, captano, carbendazima, cloroneb, clorotalonilo, clozolinato, clotrimazol, oxiclورو de cobre, sales de cobre como sulfato de cobre e hidróxido de cobre, ciazofamida, cyflunamid, cimoxanilo, ciproconazol, ciprodinilo, diclofluanida, diclocimet, diclomezina, diclorano, dietofencarb, difenoconazol, dimetomorf, dimoxistrobina, diniconazol, diniconazol-M, dinocap, discostrobina, ditianón, dodemorph, dodina, econazol, etaconazol, edifenfós, epoxiconazol, etaboxam, etirimol, etridiazol, famoxadona, fenamidona, fenarimol, fenbuconazol, fencaramid, fenfuram, fenhexamida, fenoxanilo, fenpiclonilo, fenpropidina, fenpropimorf, acetato de fentina, hidróxido de fentina, ferbam, ferfurazoato, ferimzona, fluazinam, fludioxonilo, flumetover, fluopicolida, fluoxastrobina, fluquinconazol, flusilazol, flusulfamida, flutolanilo, flutriafol, folpet, fosetil-aluminio, fuberidazol, furalaxilo, furametapir, hexaconazol, himexazol, guazatina, imazalilo, imibenconazol, iminoctadina, iodicarb, ipconazol, iprobenfós, iprodiona, iprovalicarb, isoconazol, isoprothiolano, kasugamicina, metil-kresoxim, mancozeb, mandipropamid, maneb, mapanipirina, mefenoxam, mepronilo, metalaxilo, metconazol, metasulfocarb, metiram, metominostrobina/fenominostrobina, mepanipirim, metrafenona, miconazol, miclobutanilo, neo-asozin (metanoarsonato férrico), nuarimol, octilinona, ofurace, orisastrobina, oxadixilo, ácido oxolínico, oxpoconazol, oxicarboxina, paclobutrazol, penconazol, pencicurón, pentiopirad, perfurazoato, ácido fosfónico, ftalida, picobenzamida, picoxistrobina, polioxina, probenazol, procloraz, procimidona, propamocarb, clorhidrato de propamocarb, propiconazol, propineb, proquinazid, protioconazol, piraclostrobina, priazofós, pirifenox, pirimetanilo, pirifenox, pirolnitrina, piroquilona, quinconazol, quinoxifeno, quintozeno, siltiofam, simeconazol, espiroxamina, estreptomycin, azufre, tebuconazol, tecrazeno, tecloftalam, tecnaceno, tetraconazol, tiabendazol, tifulzamida, tiofanato, metil-tiofanato, thiram, tiadinilo, metil-tolclofós, tolifluanida,

triadimefón, triadimenol, triarimol, triazóxido, tridemorf, triciclazol trimopramida, trifloxistrobina, triforina, triticonazol, uniconazol, validamicina, vinclozolina, zineb, ziram y zoxamida; nematicidas como aldicarb, oxamilo y fenamifós; bactericidas como estreptomicina, acaricidas como amitraz, quinometionato, clorobencilato, cihexatina, dicofol, dienoclor, etoxazol, fenazaquina, óxido de fenbutatina, fenpropatrina, fenpiroximato, hexitiazox, propargita, piridaben y tebufenpirad; y agentes biológicos incluyendo bacterias entomopatógenas, como *Bacillus thuringiensis* subsp. Aizawai, *Bacillus thuringiensis* subsp. Kurstaki, y endotoxinas delta encapsuladas de *Bacillus thuringiensis* (por ejemplo, Cellcap, MPV, MPVII); hongos entomopatógenos como hongo muscardina verde; y virus entomopatógenos incluyendo baculovirus, virus nucleopolihedro (VPN), como HzNPV, AfNPV, y virus de granulosis (GV) como CpGV. Las relaciones de peso de estos diversos componentes de mezclado asociados a otras composiciones (por ejemplo, herbicidas) utilizadas en los métodos normalmente son de entre 100:1 y 1:100, o de entre 30:1 y 1:30, de entre 10:1 y 1:10, o de entre 4:1 y 1:4.

[00244] Se proporcionan además composiciones que comprenden una cantidad biológicamente efectiva de un herbicida inhibidor de AHAS de interés o una mezcla de herbicidas, y una cantidad efectiva de al menos un compuesto o agente activo desde el punto de vista biológico adicionales, y que pueden comprender también al menos un tensioactivo, un diluyente sólido o un diluyente líquido. Los ejemplos de estos compuestos o agentes activos desde el punto de vista biológico son: insecticidas, como abamectina, acefato, acetamiprid, amidoflomet (S-1955), avermectina, azadiractina, azinfos-metil, bifentrina, binfenazato, buprofezina, carbofurano, clorfenapir, clorfluazurón, clorpirifós, metil-clorpirifos, cromafenozida, clotianidina, ciflutrina, beta-ciflutrina, cihalotrina, lambda-cihalotrina, cipermetrina, ciromazina, deltametrina, diafenthiurón, diazinón, diflubenzurón, dimetoato, diofenolan, emamectina, endosulfán, esfenvalerato, etiprol, fenoticarb, fenoxicarb, fenpropatrina, fenvalerato, fipronil, flonicamid, flucitrinato, tau-fluvalinato, flufenerim (UR-50701), flufenoxurón, fonofós, halofenozida, hexaflumurón, imidacloprid, indoxacarb, isofenfós, lufenurón, malatión, metaldehído, metamidofós, metidatión, metomilo, metopreno, metoxiclor, monocrotofós, metoxifenoazida, nitiazina, novalurón, noviflumurón (XDE-007), oxamilo, paratión, metil-paratión, permetrina, forato, fosadona, fosmet, fosfamidón, pirimicarb, profenofós, pimetozina, piridalilo, piriproxifeno, rotenona, espinosad, spiromesifín (BSN 2060), sulprofós, tebufenozida, teflubenzurón, teflutrina, terbufós, tetraclorvinfós, tiacloprid, tiametoxam, tiodicarb, tiosultap-sodio,

tralometrína, triclorfón y triflumurón; fungicidas como acibenzolar, azoxistrobina, benomilo, blasticidín-S, caldo bordelés (sulfato de cobre tribásico), bromuconazol, carpropamid, captafol, captán, carbendazima, cloroneb, clorotalonil, oxiclóruo de cobre, sales de cobre, ciflufenamid, cimoxanil, ciproconazol, ciprodinil, (S)-3,5-dicloro-N-(3-cloro-1-etil-1-metil-2-oxopropil)-4-metilbenzamida (HR 7281), diclocimet (S-2900), diclomezina, diclorán, difenoconazol, (S)-3,5-dihidro-5-metil-2-(metiltio)-5-fenil-3-(fenil-amino)-4H-imidazol-4-ona (RP 407213), dimetomorf, dimoxistrobina, diniconazol, diniconazol-M, dodina, edifenfós, epoxiconazol, famoxadona, fenamidona, fenarimol, fenbuconazole, fencaramid (SZX0722), fenpiclonil, fenpropidina, fenpropimorf, acetato de fentina, hidróxido de fentina, fluazinam, fludioxonil, flumetover (RPA 403397), flumorf/flumorlín (SYP-L190), fluoxastrobina (HEC 5725), fluquinconazol, flusilazol, flutolanil, flutriafol, folpet, fosetil-aluminio, furalaxil, furametapir (S-82658), hexaconazol, ipconazol, iprobenfós, iprodiona, isoprotiolano, kasugamicina, metil-kresoxim, mancozeb, maneb, mefenoxam, mepronil, metalaxil, metconazol, metomino-estrobina/fenominoestrobina (SSF-126), metrafenona (AC375839), miclobutanil, neo-asozin (metanoarsonato férrico), nicobifeno (BAS 510), orisastrobina, oxadixilo, penconazol, pencicurón, probenazol, procloraz, propamocarb, propiconazol, proquinazid (DPX-KQ926), protioconazol (JAU 6476), pirifenox, piraclostrobina, pirimetanil, piroquión, quinoxifeno, espiroxamina, azufre, tebuconazol, tetraconazol, tiabendazol, tifluzamida, metil-tiofanato, tiram, tiadinil, triadimefón, triadimenol, triciclazol, trifloxistrobina, triticonazol, validamicina y vinclozolina; nematocidas como aldicarb, oxamil y fenamifós; bactericidas como estreptomicina; acaricidas como amitraz, quinometionat, clorobencilato, cihexatina, dicofol, dienoclor, etoxazol, fenazaquina, óxido de fenbutatina, fenpropatrina, fenpiroximato, hexitiazox, propargita, piridaben y tebufenpirad; y biológicos agentes incluyendo bacteria entomopatógenas como *Bacillus thuringiensis* subsp. *Aizawai*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki*, y endotoxinas delta encapsuladas de *Bacillus thuringiensis* (por ejemplo, Cellcap, MPV, MPVII); hongos entomopatógenos como hongos muscardina verde; y virus entomopatógenos como baculovirus, virus nucleopolihedro (VPN), como HzNPV, AfNPV, y virus de granulosis (GV) como CpGV. Los métodos pueden incluir también el uso de las plantas transformadas genéticamente para expresar proteínas tóxicas para plagas de invertebrados (por ejemplo, endotoxinas delta de *Bacillus thuringiensis*). En estas realizaciones, el efecto de la aplicación exógena de compuestos para control de plagas de invertebrados puede ser sinérgico con las proteínas de la toxina

expresada.

[00245] Por lo tanto, los métodos pueden emplear un herbicida inhibidor de AHAS o una combinación de herbicidas inhibidores de AHAS y además puede incluir el uso de insecticidas y/o fungicidas, y/u otros productos químicos agrícolas tales como fertilizantes. El uso de estos tratamientos combinados puede ampliar el espectro de actividad frente a especies de malezas adicionales y suprimir la proliferación de cualquier biotipo resistente.

[00246] Las realizaciones se definen a continuación con mayor detalle en los siguientes Ejemplos. Debe entenderse que estos Ejemplos se dan a modo de ilustración solamente. A partir de la discusión anterior y de estos Ejemplos, un experto en la materia puede determinar las características esenciales y, sin apartarse del espíritu y alcance de la misma, puede efectuar diversos cambios y modificaciones de las realizaciones de la invención para adaptarlas a diferentes usos y condiciones. De esta manera, las diversas modificaciones de las realizaciones de la invención, además de las mostradas y descritas en la presente, serán evidentes para los expertos en el arte a partir de la descripción anterior. Estas modificaciones están también destinadas a entrar en el ámbito de las reivindicaciones anexas.

## **Ejemplos**

### **Ejemplo 1: Preparación de plantas transgénicas**

[00247] Las plantas de soja (*Glycine max* L.) transgénicas se desarrollaron usando un fragmento lineal (*PvuII*) de ADN del plásmido pAC321 que contiene una secuencia de codificación de la subunidad grande de acetohidroxiácido sintasa (AHASL) mutante que proporciona resistencia a los herbicidas imidazolinona. El plásmido pAC321 contiene una secuencia de codificación de un gen mutante de *Arabidopsis thaliana*, AHASL (*csr1-2*) que tiene una asparagina en la posición correspondiente a la posición 653, en lugar de la serina nativa (S653N). La secuencia de codificación AHAS (S653N) está bajo el control de la secuencia promotora de AHAS de *A. thaliana* nativa y la secuencia de terminación de la transcripción. Véase, por ejemplo, Publicación Estadounidense N ° 2005/0034187, la cual se incorpora a la presente en su totalidad como referencia. El fragmento *PvuII* incluye el promotor de *Arabidopsis AHASL*, la secuencia de codificación AHASL (*csr1-2*) de *Arabidopsis* de tolerancia a herbicidas y el terminador de *Arabidopsis AHASL*. Este promotor, la secuencia de codificación y el casete de terminación se denominan en la presente casete *csr1-2*.

[00248] Se utilizó el tejido axial embriogénico derivado del meristema apical de una sola semilla de soja de la variedad comercial “Conquista” para la transformación biolística. Se utilizó la transformación biolística (bombardeo con microproyectiles o partículas) (Aragão, FJL, et al., Theor. Appl. Genet. 1996; 93:142-150) para producir eventos de transformación de soja que contienen el gen *csr1-2*. Antes del bombardeo, el ADN que contiene el fragmento de gen *csr1-2* se precipitó sobre partículas microscópicas de oro. El ADN precipitado y las partículas se colocaron luego en un macro-soporte de plástico y aceleraron a alta velocidad de modo que el macro-soporte fuera retenido por una malla de detención. Las partículas con ADN pudieron continuar su trayectoria y eventual penetración e incorporación en las células de la planta de soja. Las células bombardeadas se transfirieron a un medio selectivo que contenía el equivalente a 50 g ia/ha de imazapir, un herbicida imidazolinona, y sólo las células transformadas con el gen *csr1-2* continuaron creciendo. A partir de este proceso se identificó una planta tolerante T0 que se denominó Soja evento 127 (Tabla 1).

**Ejemplo 2: Desarrollo de líneas**

[00249] El transformante inicial de soja evento 127 se mantuvo por auto-cruzamiento (“autofecundación”) hasta la generación T4 según se presenta en la Tabla 1 a continuación.

**Tabla 1:** Desarrollo de las primeras generaciones de soja evento 127

| Generación | Criterios de selección                            | Material seleccionado para avance                                                 |
|------------|---------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| T0         | 50 g ia/ha de imazapir                            | semilla T1 de 1 planta T0                                                         |
| T1         | 100 g ia/ha de imazapir                           | semilla T2 a granel de 3 plantas T1                                               |
| T2         | 100 g ia/ha de imazapir                           | semilla T3 de 10 plantas T2 individuales                                          |
| T3         | 100 g ia/ha de imazapir                           | semilla T4 a granel de 10 plantas T3 por cada una de 10 familias T2:3 (E01 a E10) |
| T4         | 50 semillas T4 de cada una de las 9 familias T2:3 |                                                                                   |

[00250] El análisis genético de semillas de nueve plantas T3 (E01, E02, E03, E04, E05, E06, E07, E09 y E10), reveló que la segregación del transgén no siempre siguen patrones mendelianos simples, lo cual sugiere que hay más de un locus activo. La progenie T4 de plantas T3 (E09, E10 y E05) que mostró segregación mendeliana para la tolerancia al imazapir y que tenía un fenotipo normal fue cruzada con variedades no transgénicas (BRS137, Conquista y BR97-7066) para desarrollar cuatro poblaciones (Tabla 2, Figura 2).

**Tabla 2:** Desarrollo e identificación de poblaciones de soja que contienen el evento 127

| Cruza                    | F1 | F2      | F3         | F4      | F5            |
|--------------------------|----|---------|------------|---------|---------------|
| T4-E09<br>X<br>BRS 137   | F1 | IMI01P1 | V2-1       | P9-1    | V03-541       |
|                          |    |         |            |         | V03-565 a 567 |
|                          |    |         | V2-2       | P9-2    | V03-542       |
|                          |    |         |            |         | V03-568 a 570 |
|                          |    |         | V3-1       | P9-3    | V03-543       |
|                          |    |         |            |         | V03-571 a 573 |
| T4-E10<br>X<br>Conquista | F1 | IMI245  | V288 (211) | V03-546 | V03-545       |
|                          |    |         |            |         | V03-575 a 576 |
| T4-E10<br>X<br>Conquista | F1 | IMI209  | V283 (193) | V03-551 | V03-602 a 611 |
|                          |    |         |            |         | V03-586 a 601 |
| T4-E05<br>X<br>BR97-7066 | F1 | IMI63   | V03-447    | V03-613 |               |
|                          |    |         | V03-448    | V03-614 |               |
|                          |    |         |            | V03-615 |               |
| T4-E09<br>X<br>Conquista | F1 | IMI141  | V259 (125) | V03-547 |               |
|                          |    |         | V260 (126) | V03-548 |               |
|                          |    |         | V261 (131) | V03-549 |               |
|                          |    |         | V261 (130) | V03-550 |               |
|                          |    |         | V260 (128) | V03-563 |               |

[00251] En las generaciones F2 y F3, se seleccionaron familias y plantas individuales que tenían un fenotipo normal y tolerancia a imazapir en el invernadero. El patrón de segregación (38 tolerantes:13 no tolerantes) para la tolerancia al imazapir (100 g i.a./ha) en la población F2 de una cruza entre

Conquista transgénica (T4-E10) x Conquista no transgénica mostró que un solo gen dominante en la línea transgénica-V03 603 (CV-603), que contiene 127 eventos, controla la tolerancia a imazapir.

[00252] Pruebas de campo subsiguientes utilizando líneas F4 y/o F5 de cada una de las cuatro cruzas (Tabla 2) apoyan la selección de la línea V03-603, que contiene el evento 127 como línea de soja de elite para análisis y desarrollo posteriores. Los ensayos de campo se plantaron en cuatro ubicaciones usando un diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones y un diseño de tratamiento de parcelas divididas. Las entradas fueron parcelas completas y las tasas de aplicación de imazapir (0, 70, 240 o 280 g ia/ha) fueron las subparcelas. Las plantas se aspersaron 18-21 días después de sembradas y se evaluaron 14 días después de la aplicación. Las plantas se examinaron en cuanto a porcentaje de lesiones (0 = ausencia de plantas muertas en la parcela a 100 = todas las plantas muertas en la parcela). Los datos adicionales recopilados incluyeron altura de la planta, rendimiento de semillas, tamaño de las semillas, días hasta la floración y días hasta la madurez.

**Tabla 3:** Porcentaje de lesiones en líneas de soja que contienen evento 127 14 días después de la aplicación de tasas diferentes de imazapir

| Línea     |    | Ubicación                    |     |      |    |              |     |      |    |              |      |    |    | Media entre las ubicaciones |      |      |  |
|-----------|----|------------------------------|-----|------|----|--------------|-----|------|----|--------------|------|----|----|-----------------------------|------|------|--|
|           |    | Londrina                     |     |      |    | Campinas (1) |     |      |    | Campinas (2) |      |    |    |                             |      |      |  |
|           |    |                              |     |      |    |              |     |      |    |              |      |    |    |                             |      |      |  |
|           |    | Tasa de imazapir (g i.a./ha) |     |      |    |              |     |      |    |              |      |    |    |                             |      |      |  |
| 0         | 70 | 140                          | 280 | 0    | 70 | 140          | 280 | 0    | 70 | 140          | 280  | 0  | 70 | 140                         | 280  |      |  |
| V03-541   | 0  | 1,7                          | 10  | 16,7 | 0  | 1            | 14  | 32,3 | 0  | 3,7          | 13,3 | 33 | 0  | 2,1                         | 12,4 | 27.3 |  |
| V03-542   | 0  | 0                            | 4,3 | 10   | 0  | 1,3          | 9   | 21   | 0  | 2,3          | 7    | 28 | 0  | 1,2                         | 6,8  | 19.7 |  |
| V03-543   | 0  | 0                            | 2,7 | 8,3  | 0  | 1,3          | 4,7 | 18,3 | 0  | 2,3          | 5    | 18 | 0  | 1,2                         | 4,1  | 14.9 |  |
| V03-544   | 0  | 0                            | 3,3 | 9    | 0  | 0,7          | 3   | 14,7 | 0  | 1,7          | 5    | 15 | 0  | 0,8                         | 3,8  | 12.9 |  |
| V03-545   | 0  | 0                            | 8,3 | 15   | 0  | 0            | 7   | 18   | 0  | 2,3          | 6    | 23 | 0  | 0,8                         | 7,1  | 18.7 |  |
| Conquista | 0  | 90                           | 95  | 98   | 0  | 90           | 90  | 90   | 0  | 95           | 95   | 95 | 0  | 91,7                        | 93,3 | 94,3 |  |

**Tabla 4:** Porcentaje de lesiones en líneas de soja que contienen evento 127 14 días después de la aplicación de diferentes tasas de imazapir

| Línea     |         | Ubicación                    |    |     |      |              |     |      |      | Media entre las ubicaciones |     |      |      |
|-----------|---------|------------------------------|----|-----|------|--------------|-----|------|------|-----------------------------|-----|------|------|
|           |         | Londrina                     |    |     |      | Ponta Grossa |     |      |      |                             |     |      |      |
|           |         | Tasa de imazapir (g i.a./ha) |    |     |      |              |     |      |      |                             |     |      |      |
|           |         | 0                            | 70 | 140 | 280  | 0            | 70  | 140  | 280  | 0                           | 70  | 140  | 280  |
|           | V03-589 | 0                            | 0  | 4,7 | 9,3  | 0            | 3,3 | 10   | 23,3 | 0                           | 1,7 | 7,4  | 16.3 |
|           | V03-590 | 0                            | 0  | 4,7 | 11,7 | 0            | 1,7 | 8,3  | 18,3 | 0                           | 0,9 | 6,5  | 15   |
|           | V03-598 | 0                            | 0  | 4,3 | 9    | 0            | 1,7 | 11,7 | 18,3 | 0                           | 0,9 | 8    | 13.7 |
|           | V03-602 | 0                            | 0  | 4,3 | 12,3 | 0            | 1,7 | 11,7 | 20   | 0                           | 0,9 | 8    | 16.2 |
|           | V03-603 | 0                            | 0  | 5,7 | 13,3 | 0            | 1,7 | 6,7  | 16,7 | 0                           | 0,9 | 6,2  | 15.0 |
|           | V03-607 | 0                            | 4  | 8,3 | 15,7 | 0            | 3,3 | 13,3 | 23,3 | 0                           | 3,7 | 10,8 | 19.5 |
|           | V03-610 | 0                            | 0  | 7,3 | 12,3 | 0            | 8,3 | 13,3 | 18,3 | 0                           | 4,2 | 10,3 | 15.3 |
| Conquista |         | 0                            | 90 | 95  | 98   | 0            | 90  | 90   | 90   | 0                           | 90  | 92,5 | 94,0 |

ds

**Tabla 5:** Porcentaje de lesiones en líneas de soja que contienen evento 127 14 días después de la aplicación de tasas diferentes de imazapir

| Línea     |     | Ubicación                    |     |     |      |              |     |      |      |              |    |     |      |              |      |      |      | Media entre las ubicaciones |      |      |      |
|-----------|-----|------------------------------|-----|-----|------|--------------|-----|------|------|--------------|----|-----|------|--------------|------|------|------|-----------------------------|------|------|------|
|           |     | Londrina                     |     |     |      | Ponta Grossa |     |      |      | Campinas (1) |    |     |      | Campinas (2) |      |      |      |                             |      |      |      |
|           |     | Tasa de imazapyr (g i.a./ha) |     |     |      |              |     |      |      |              |    |     |      |              |      |      |      |                             |      |      |      |
|           |     | 0                            | 70  | 140 | 280  | 0            | 70  | 140  | 280  | 0            | 70 | 140 | 280  | 0            | 70   | 140  | 280  | 0                           | 70   | 140  | 280  |
|           | 613 | 0                            | 1,7 | 6,7 | 12,3 | 0            | 0   | 6,7  | 21,7 | 0            | 0  | 6   | 17,7 | 0            | 1,7  | 5    | 17   | 0                           | 0,9  | 6,1  | 17,2 |
|           | 614 | 0                            | 0   | 8,3 | 15   | 0            | 3,3 | 11,7 | 23,3 | 0            | 0  | 4,3 | 16,3 | 0            | 1,3  | 7    | 18   | 0                           | 1,2  | 7,8  | 18,2 |
|           | 615 | 0                            | 1,7 | 9   | 13,7 | 0            | 0   | 11,7 | 23,3 | 0            | 0  | 8,3 | 18,7 | 0            | 2    | 9    | 20   | 0                           | 0,9  | 9,5  | 18,9 |
| Conquista |     | 0                            | 90  | 95  | 98   | 0            | 90  | 90   | 90   | 0            | 95 | 95  | 95   | 0            | 81,7 | 83,3 | 88,3 | 0                           | 89,2 | 90,8 | 92,8 |

### **Ejemplo 3: Caracterización molecular**

#### **A: Métodos de aislamiento y cuantificación de ADN y ARN**

[00253] Se aisló el ADN de tejido foliar de soja mediante una modificación del método de bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB) (Carlson et al., 1991). El tejido foliar desecado con gel de sílica fue congelado con nitrógeno líquido y molido con un equipo Autogrinder (Autogen; Holliston, MA). Se incubó el tejido con un buffer de extracción precalentado consistente en CTA. 2% (p/v), Tris-HCl 100mM, NaCl 1,4M, polivinilpirrolidona (PVP) 1% (p/v), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 20mM, pH 9,5 (5 ml/60 mg de tejido foliar desecado) y  $\beta$ -mercaptoetanol (10  $\mu$ l/ml de buffer) a 74°C durante 20 min. Después de la centrifugación a 2440 x g durante 10 min, el sobrenadante se extrajo dos veces con un volumen igual de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). El ADN se precipitó con 0,7 volúmenes de isopropanol y se disolvió en buffer TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8,0) con 0,5 mg/ml de ARNasa A (Invitrogen, Carlsbad, CA) añadido hasta una concentración final de alrededor de 500 ng/ $\mu$ l. El ADN aislado se cuantificó con colorante Hoechst 33258 (Invitrogen) usándose ADN de timo de ternera (Invitrogen) como estándar de ADN en un fluorómetro de microplacas Packard FluoroCount™ BF10000 (Packard Instrument Company, Meriden, CT) de acuerdo con el manual del usuario del fluorómetro.

[00254] El ARN se extrajo de hojas jóvenes desecadas con gel de sílice provenientes de plantas de las generaciones F7 y F8 de Evento 127 y de hojas de la variedad de soja parental no transgénica Conquista con el equipo Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA). Se congelaron con nitrógeno líquido alrededor de 25 mg de tejido foliar desecado con gel de sílice y se molieron con un equipo Autogrinder. El procedimiento de aislamiento de ARN total se llevó a cabo de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La digestión con ADNasa en columna se realizó con un equipo RNase-Free DNase (Qiagen) para eliminar cualquier ADN genómico de soja de la preparación de ARN total de acuerdo con la recomendación del manual del usuario de RNeasy Mini Kit. El ARN aislado se cuantificó midiendo la absorbancia a 260 nm con un espectrofotómetro BioMate™ 3 (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA).

#### **B: Aislamiento de sondas y métodos de marcación**

[00255] La ubicación de los fragmentos de ADN utilizados como sondas transgén se indica en la Figura 1B. Las sondas de los esqueletos de los vectores se indican en la Figura 5C. Los cebadores de PCR para usar en la generación de

las sondas del transgén y de los vectores identificados se proporcionan en la Tabla 3. En conjunto, estas cinco sondas superpuestas abarcan el plásmido completo. Específicamente, la sonda 1 abarca la región promotora *AHASL*, la sonda 2 la secuencia de codificación *csr1-2*, la sonda 3 la región de terminación *AHASL*, y las sondas 4 y 5 en conjunto cubren todo el esqueleto del vector (VB). Los fragmentos de ADN de las sondas fueron generados mediante amplificación por PCR utilizando el plásmido pAC321 como plantilla. Las sondas (25-50 ng de cada una) se radiomarcaron con 50 µCi de (α-<sup>32</sup>P)-dCTP (3000 Ci/mmol) (MP Biomedicals, Irvine, CA) utilizando el Sistema de Marcación Rediprime™ II DNA (Amersham, Piscataway, NJ) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las sondas marcadas se purificaron con un Filtro de Tubo de Centrifuga Spin-X® (Corning Costar Corporation, Acton, MA).

**Tabla 6:** Cebadores utilizados para generar sondas para análisis por transferencia tipo Southern

| Propósito               | Dirección | Secuencia 5'-3'<br>del cebador | Posición<br>(SEC ID NO: 1) | SEC<br>ID NO: |
|-------------------------|-----------|--------------------------------|----------------------------|---------------|
| Sonda 1<br>5' UTR       | Directa   | TGCGTTATCCCCTGATTCTG           | 8261-8280                  | 7             |
|                         | Inversa   | TGTTGGGGTTTAGGGAG              | 2597-2613                  | 8             |
| Sonda 2<br><i>AHASL</i> | Directa   | CGAAGGCTCAATCACAAATAC          | 2269-2289                  | 9             |
|                         | Inversa   | AGCAGGCAGATCAACAAC             | 4604-4621                  | 10            |
| Sonda 3<br>3' UTR       | Directa   | GAACATGTGTTGCCGATGAT           | 4416-4435                  | 11            |
|                         | Inversa   | CGCAACTGTTGGGAAGGG             | 5949-5966                  | 12            |
| Sonda 4<br>VP1          | Directa   | GTTTTACAACGTCGTGACTG           | 5839-5858                  | 13            |
|                         | Inversa   | CGGTTAGCTCCTTCGGTC             | 6997-7014                  | 14            |
| Sonda 5<br>VP2          | Directa   | CACTGCGGCCAACTTACT             | 6962-6979                  | 15            |
|                         | Inversa   | CTTGCGGTAATCATGGTC             | 8592-8609                  | 16            |

C: Número de copias, integridad y estabilidad del inserto

[00256] Se utilizaron análisis de transferencia tipo Southern para determinar el número de copias y la integridad del casete de expresión de *csr1-2*, así como para confirmar la ausencia del esqueleto del plásmido en el Evento 127. Se emplearon las enzimas de restricción NcoI, SpeI y XbaI para digerir el ADN genómico obtenido de una planta de evento 127 plantas y control no transgénico Conquista. El fragmento de transformación *PvuII* de pAC321 estaba alineado con el inserto de soja evento 127 mostrado en la Figura 3. El fragmento de *PvuII* del

plásmido pAC321 que se utilizó para transformar la soja se muestra en la parte superior de la Figura 3. Partes de este fragmento que no están contenidos dentro del inserto del transgén en la Soja evento 127 se indican con casilleros llenos con rayas diagonales. Las características del inserto del transgén y el ADN genómico de soja flanqueante en la Soja evento 127 se muestran en la parte inferior de la figura. El ADN entre las líneas punteadas verticales que se dibujan entre los mapas del fragmento de transformación *PvuII* y la región de inserción del transgén es común a ambos fragmentos de ADN. Se indican los sitios de restricción relevantes para el análisis transferencia tipo Southern. El sistema de numeración del fragmento de transformación *PvuII* corresponde al del mapa del plásmido pAC321 de la Figura 1. El sistema de numeración para el inserto de Soja evento 127 corresponde al de la Figura 8, donde #1 es el primer nucleótido en el extremo 5' de la secuencia genómica flanqueante de soja (las secuencias flanqueantes se indican mediante casilleros de color gris). Un solo sitio de restricción *NcoI* en el casete *csr1-2* se encuentra en el extremo 5' de la secuencia de codificación *csr1-2*; se predijo que la digestión del ADN genómico de un evento 127 con *NcoI* generará dos fragmentos que contienen ADN del casete *csr1-2*. Ambos fragmentos se definen por el sitio de *NcoI* en el casete *csr1-2* y por los sitios de *NcoI* más cercanos sitios en la secuencia genómica de soja flanqueante. Hay un sitio de restricción de *SpeI* en la secuencia 5' del genoma de soja flanqueante y dos sitios de restricción de *SpeI* corriente abajo del UTR 3' de *AHASL* en el evento 127. Los sitios de restricción de *XbaI* flanquean el casete de expresión *csr1-2* completo. El número y tamaño de los fragmentos de ADN que se espera detectar por hibridización por Southern se listan en la Tabla 7 a continuación.

**Tabla 7:** Número y tamaño de los fragmentos de ADN que se espera detectar por hibridización por Southern

| Figura         | Sonda  | Enzima de Restricción | Tamaño pronosticado de fragmento del inserto de Evento 127 (pb) <sup>a</sup> | Tamaño observado de fragmento de Evento 127 | Tamaño pronosticado de fragmento del Plásmido pAC321 (pb) | Tamaño observado de fragmento de plásmido |
|----------------|--------|-----------------------|------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| 4 <sup>a</sup> | 5' UTR | Ncol                  | >2760                                                                        | ~4500                                       | 8669                                                      | ~9000                                     |
|                |        | SpeI                  | 4352                                                                         | ~4400                                       | 8292                                                      | ~8500                                     |
|                |        | XbaI                  | 10242                                                                        | ~10000                                      | 5711 <sup>b</sup><br>2958                                 | ~5500<br>~3000                            |
| 4B             | AHAS   | Ncol                  | >7896                                                                        | ~9000                                       | 8669                                                      | ~9000                                     |
|                |        | SpeI                  | 4352<br>885                                                                  | ~4400<br>~800 <sup>c</sup>                  | 8292                                                      | ~8500                                     |
|                |        | XbaI                  | 10242                                                                        | ~10000                                      | 5711                                                      | ~5500                                     |
| 4C             | 3' UTR | Ncol                  | >7896                                                                        | ~9000                                       | 8669                                                      | ~9000                                     |
|                |        | SpeI                  | 4352                                                                         | ~4400                                       | 8292<br>280<br>97                                         | ~8500                                     |
|                |        | XbaI                  | 10242                                                                        | ~10000                                      | 5711 <sup>b</sup><br>2958                                 | ~5500<br>~3000                            |
| 5 <sup>a</sup> | VP1    | Ncol                  | ninguno                                                                      | ninguno                                     | 8669                                                      | ~9000                                     |
|                |        | SpeI                  | ninguno                                                                      | ninguno                                     | 8292                                                      | ~8500                                     |
|                |        | XbaI                  | ninguno                                                                      | ninguno                                     | 2958                                                      | ~3000                                     |
| 5B             | VP2    | Ncol                  | ninguno                                                                      | ninguno                                     | 8669                                                      | ~9000                                     |
|                |        | SpeI                  | ninguno                                                                      | ninguno                                     | 8292                                                      | ~8500                                     |
|                |        | XbaI                  | ninguno                                                                      | ninguno                                     | 2958                                                      | ~3000                                     |

<sup>a</sup> El tamaño pronosticado del fragmento se calcula basándose en el inserto clonado y las secuencias flanqueantes del Evento 127.

<sup>b</sup> La sonda de 5' UTR y la sonda de 3' UTR se superponen un sitio XbaI y por lo tanto hibridizan con ambos fragmentos XbaI del plásmido.

<sup>c</sup> El análisis de secuencia del inserto del Evento 127 indica que una pequeña porción de la región de codificación *csr1-2* se duplicó inmediatamente corriente arriba del sitio de integración del transgén 3', lo cual confirma la identidad de la banda de 800 pb observada en estas transferencias tipo Southern.

[00257] Los tamaños pronosticados de los fragmentos se estiman

basándose en el inserto clonado y en las secuencias flanqueantes en plantas de evento 127. La sonda 5' UTR y la sonda 3' UTR se superponen con un sitio XbaI y por lo tanto hibridizan con ambos fragmentos XbaI del plásmido pAC321 (marcados con puntos en el carril 11 de las Figuras 4A y 4C). El análisis de secuencia de la región del evento 127 indicó que una pequeña porción de la región de codificación *csr1-2* se duplicó inmediatamente corriente arriba del sitio de integración del transgén 3', lo cual confirma la identidad de la banda de 800 pb identificada en los resultados de la transferencia tipo Southern.

[00258] El ADN genómico (7 µg) de la generación F8 del Evento 127 y de Conquista control no transgénico fue digerido durante una noche en un volumen de 40 µl con las enzimas de restricción antes mencionados (8 unidades/ µg ADN) en las condiciones especificadas por los fabricantes de enzimas (New England Biolabs, Ipswich, MA; o Amersham). Losa digeridos de restricción se separaron por electroforesis en geles de agarosa 0,8% de 10 cm de largo. El ADN fue aún más fragmentado por inmersión de los geles en HCl 0,25N durante 20 minutos y se desnaturalizó con NaOH 0,4N durante 30 min. Los geles se enjuagaron con solución de NaCl/citrato de sodio (SSC) 2X y el ADN desnaturalizado fue transferido a Hybond N + membrana de nylon (Amersham) utilizando NaOH 0,4N como buffer de transferencia. La hibridización por Southern se llevó a cabo según Sambrook *et al.* (1989). Las membranas se prehybridizaron a 65°C durante 2-4 horas e hibridizaron a 65°C durante una noche en 20-30 ml (alrededor de 0,2 ml/cm<sup>2</sup>) de buffer de hibridización (SSC 2X, SDS 0,6%, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50mM, solución de Denhardt 1X, EDTA 2,5mM, sulfato de dextrano 5%, pH 7,2) en un Horno de Hibridización Hybaid MAXI 14 (Thermo Electron Corporation). Después de la hibridización, las membranas se lavaron con SSC 2X, SDS 0,5% (1 ml/cm<sup>2</sup>) a temperatura ambiente durante 15 minutos, SSC 2X, SDS 0,1% (4 ml/cm<sup>2</sup>) a 65°C durante 30 minutos, y finalmente con SSC 0,1X, SDS 0,1% (4 ml/cm<sup>2</sup>) a 65°C durante 15 min. Después del lavado, las membranas se envolvieron en plástico y expusieron a una película Hyperfilm™ MP (Amersham) durante 2-5 días, dependiendo de la intensidad de la señal radiactiva, en casetes con pantallas de intensificación a -80 °C.

[00259] Los análisis por transferencia tipo Southern también se realizaron como se describe anteriormente para controlar la estabilidad del inserto a través de múltiples generaciones. El material vegetal se obtuvo de las generaciones T4, F4, F8 y F9 (Figura 2). El ADN genómico de estas muestras fue digerido con NcoI y SpeI (como se describió anteriormente) y se llevó a cabo un análisis por

transferencia tipo Southern como se describió anteriormente.

[00260] El número de copias del inserto en el Evento 127 se evaluó mediante análisis por transferencia tipo Southern del ADN genómico de las plantas de la generación F8 de Evento 127 digerido con enzimas de restricción NcoI, SpeI y XbaI utilizando el método descrito anteriormente.

[00261] Los resultados de los análisis por transferencia tipo Southern se proporcionan en las Figuras 4A, 4B y 4C. El ADN genómico de la variedad de soja no transgénica Conquista (carriles 1, 5 y 9); Conquista inoculada con una (carriles 2, 6 y 10) o dos equivalentes de copias del genoma de pAC321 (carriles 3, 7 y 11); y ADN genómico de Soja evento 127 de la generación F8 (líneas 4, 8 y 12) fue digerido con las enzimas de restricción NcoI (1-4), SpeI (5-8) y XbaI (9-12) según se describió. Las transferencias se hibridizaron con sonda 5' UTR (Figura 4 A), sonda AHAS (Figura 4 B) y sonda 3' UTR (Figura 4 C). Los carriles primero y última (con la marca M) contienen una escalera ("*ladder*")  $\lambda$ /HindIII; los tamaños de banda se indican en kilobases. La Figura 4 D indica regiones de homología entre las sondas de hibridización por Southern Sur y el inserto de evento 127. La flecha en la Figura 4 B, indica un fragmento SpeI de aproximadamente 885 pb que contiene un fragmento adicional de 376 pb de *csr1-2* presente en el evento 127 en la unión de la secuencia flanqueante 3'.

[00262] El ADN de Conquista no transgénica digerido con las tres enzimas de restricción e hibridizado con las tres sondas no mostró ninguna señal, indicando que el gen *AHASL* de soja endógeno y el gen de la subunidad *Sec61* y de soja endógeno se detectan en las condiciones de rigurosidad de las transferencias tipo Southern utilizadas (Figura 4, carriles 1, 5 y 9). Las muestras de ADN de la generación F8 de evento 127 tratadas con las diferentes enzimas y combinaciones de sondas dieron bandas individuales (Figura 4A, B y C, carriles 4, 8 y 12) a excepción del digerido de SpeI hibridizado con la sonda de la secuencia de codificación de *AHASL*, la cual tenía una pequeña banda adicional de alrededor de 800 pb (Figura 4B, carril 8, flecha). Este fragmento de SpeI de 800 pb que hibridiza con *AHASL* concuerda con la observación de que un pequeño fragmento de la secuencia de codificación *AHASL* se repite en la unión de la secuencia flanqueante 3' en el evento 127 (véase la sección en Secuencia Completa; Ejemplo 3E). Todas las bandas principales tuvieron intensidades aproximadamente similares a la correspondiente a un equivalente de copias del genoma de pAC321.

[00263] El ADN genómico del evento 127 que fue digerido con NcoI y

sondeado con At *AHASL* UTR 5' produjo una banda de hibridización de aproximadamente 4,5 kb de tamaño. El tamaño de esta banda concuerda con la producción de un fragmento de ADN único definido por el sitio NcoI dentro del inserto (nt 2761, Figura 4D) y un sitio NcoI de aproximadamente 4,5 kb corriente arriba en la secuencia flanqueante genómica de soja 5'. El mismo digerido sondeado con la secuencia de codificación At *AHASL* o At *AHASL* 3'UTR produjo una banda de hibridización de aproximadamente 9,0 kb de tamaño. El tamaño de esta banda concuerda con un fragmento de ADN único definido por el sitio NcoI en el inserto (nt 2761, Figura 4D) y un sitio NcoI de aproximadamente 9,0 kb corriente abajo en la secuencia flanqueante de soja 3'.

[00264] La digestión del ADN genómico de evento 127 con *SpeI* y el sondeado con At *AHASL* UTR 5' produjo una banda de hibridización de tamaño aproximado de 4,4 kb. Esto concuerda con la producción de un único fragmento de ADN a partir de un sitio *SpeI* en el inserto (nt 5620, Figura 4 D) y un sitio de restricción *SpeI* de aproximadamente 4,4 kb corriente arriba en la secuencia flanqueante de ADN 5' del genoma de soja (nt 1268, Figura 4 D). La presencia de este sitio *SpeI* corriente arriba fue confirmada en el análisis de la secuencia flanqueante 5' del evento 127 (ver sección en Secuencia Flanqueante; Ejemplo 3D). El mismo digerido sondeado con la secuencia de codificación At *AHASL* o At *AHASL* 3' UTR también produjo una banda de hibridización de 4,4 kb correspondiente al mismo fragmento descrito anteriormente. Además, se detectó una banda de hibridización de tamaño aproximado de 0,8 kb cuando el digerido de *SpeI* fue sondeado con la secuencia de codificación *AHASL*, lo cual concuerda con un único fragmento de ADN tratado con *SpeI* que contiene el segmento de 376 pb del gen *csr1-2* en la unión de la secuencia de ADN flanqueante 3'. Este fragmento de hibridización se produjo a partir del sitio *SpeI* en el inserto de ADN y un sitio *SpeI* de 0,8 kb corriente abajo en el genoma de soja (nt 5620 - 6505, Figura 4 D). La banda de hibridización de 0,8 kb no fue detectada por la sonda At *AHASL* 3' UTR, lo cual indica que el ADN de At *AHASL* 3' UTR no estaba incluido en el fragmento de 0,8 kb, y el sitio de *SpeI* NT 5620 en el inserto es adyacente al segmento de 376 pb del gen *csr1-2*. Por lo tanto, los sitios de la enzima de restricción *SpeI* en el nucleótido 5622 y 5719 en el fragmento lineal de *PvuII* de plásmido pAC321 utilizado para la transformación (mostrado en la Figura 1B) no fueron incluidos en el inserto de ADN en el genoma de evento 127. Esto fue confirmado por análisis de secuencia de ADN del inserto de ADN (ver sección Secuencia Completa; Ejemplo 3E). Los fragmentos de *SpeI* más pequeños

pronosticados de 280 y 97 pb en los controles inoculados con pAC321 produciría señal por debajo del nivel de detección utilizando este método.

[00265] El ADN genómico del Evento 127 al digerirse con XbaI y sondearse con At *AHASL* 5' UTR muestra una banda de hibridización única de un tamaño aproximado de 10 kb. En base a las posiciones de los sitios de restricción XbaI en el ADN lineal utilizadas para la transformación (Figura 1B), se esperaba una banda de hibridización de alrededor de 5,7 kb, producida a partir del inserto de ADN en el genoma de evento 127. Sin embargo, el análisis de secuencia de ADN del inserto de ADN en el evento de 127 mostró que ninguno de los sitios de restricción XbaI en el ADN de transformación lineal estaba incluido en el inserto de ADN (ver sección Secuencia Completa; Ejemplo 3E). Por lo tanto, la banda de hibridización de 10 kb fue producida a partir de sitios de restricción XbaI dentro de las secuencias de ADN 5' y 3' que flanquean el inserto (nt 410 y 10652, Figura 4D). En consecuencia, el mismo digerido sondeado con la secuencia de codificación At *AHASL* o At *AHASL* 3' UTR produjo la misma banda de hibridización de 10 kb correspondiente al fragmento de ADN descrito con anterioridad.

[00266] El análisis del número y tamaño de todas las bandas de hibridización en la transferencia tipo Southern mostrada en la Figura 4 concuerda con la integración de un solo inserto de ADN en el genoma de soja evento 127 que contiene una única copia funcional del gen *csr1-2*, así como las secuencias de codificación de la proteína SEC61y en el extremo 5' del gen *csr1-2*, y un solo fragmento de ADN que contiene un segmento de 376 pb del gen *csr1-2* en el extremo 3' del inserto.

[00267] Aunque la transformación se llevó a cabo con el fragmento de restricción *PvuII* de pAC321 que no incluía el ADN esqueleto del vector, se efectuaron estudios por transferencia tipo Southern para confirmar la ausencia de ADN vector del plásmido pAC321 en el genoma de evento 127. A fin de determinar si había algún esqueleto vector integrado en el Evento 127, el mismo conjunto de transferencias utilizadas para el análisis por Southern descrito anteriormente (Figura 4) se hibridizó con dos sondas específicas del esqueleto del vector (Figura 5). Como era de esperar, no se detectaron bandas de hibridización en carriles que contienen ADN genómico de Conquista no transgénico. El ADN genómico de Conquista no transgénico inoculado con uno o dos equivalentes de copias de genoma del plásmido pAC321 de transformación mostró bandas de hibridización de los tamaños previstos (Tabla 7). Se hibridizó la transferencia con una sonda VP1 (figura 5 A) y una sonda VP2 (Figura 5 B). No se detectaron

bandas de hibridización en el ADN de la generación F8 de evento 127, lo cual indica que no se integró ADN esqueleto del vector en el genoma de soja en este evento. La Figura 5 C indica las posiciones de las sondas VP1 y VP2 en relación a los componentes de pAC321.

[00268] A fin de determinar la estabilidad del inserto en el evento 127, se sometieron muestras de ADN de cuatro generaciones diferentes, T4, F4, F8 y F9 (Figura 2) a análisis de transferencia tipo Southern. Las muestras de ADN genómico se digirieron con NcoI y SpeI y se sondearon con sondas de At AHASL 5' UTR, secuencia de codificación At AHASL o At AHASL 3' UTR que abarcaban todo el fragmento de ADN utilizado para la transformación (Figura 1B). La combinación de estas enzimas de restricción y sondas proporciona una huella digital única para el inserto de ADN en el evento 127 (Figura 4). El ADN genómico de Conquista no transgénico se utilizó como control negativo y Conquista inoculado con uno y dos equivalentes de copia del genoma de pAC321 se utilizó como control positivo (Figura 6). Se detectaron múltiples bandas de ADN de la generación T4 de evento 124 digerido con NcoI o SpeI con las tres sondas, lo cual indica que la generación T4 contiene múltiples copias del casete *csr1-2*. Sin embargo, el ADN de las generaciones F4, F8 y F9 mostró el mismo patrón por Southern (Figura 6) observado previamente en el análisis del inserto y número de copias (Figura 4). Este resultado indica que las copias múltiples del inserto en la generación T4 se segregaron en la progenie de la cruce entre T4 y Conquista, y que sólo una sola copia se mantiene en el segregante seleccionado. Además, esta única copia es heredada en forma estable en las generaciones posteriores.

D: Secuencia genómica flanqueante de los extremos 5' y 3' del inserto de ADN

[00269] Se utilizó una PCR inversa para obtener la secuencia de ADN genómico de soja que flanquean el casete la *csr1-2* insertado (Triglia *et al.*, 1988). El ADN genómico (1 µg) de la generación F7 de evento 127 se digirió con 15 unidades de XbaI, SpeI, HindIII, NcoI, EcoRI, BamHI o BglII en volúmenes de reacción de 20 µl durante 3 horas. Los digeridos de XbaI, HindIII, NcoI y EcoRI se incubaron a 65°C durante 20 minutos para inactivar las enzimas mientras que los digeridos de BamHI y BglII fueron sometidos a precipitación con isopropanol. Se agregó directamente T4 ADN ligasa (800 unidades, New England Biolabs) a cada reacción de digestión. También se agregó agua para llevar el volumen de

reacción a 200 µl. Las reacciones se incubaron a 16°C durante la noche y el ADN circular se utilizó directamente como plantilla para la PCR inversa. Las secuencias flanqueantes del transgén se amplificaron con el kit GeneAmp® XL PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA). La PCR primaria de 100 µl contenía buffer de PCR suministrado por el fabricante 1X, 200 µM de cada dNTP, 25 ng de fragmentos de ADN genómico circular, acetato de magnesio 1,2 mM, 2 unidades de rTth ADN polimerasa XL, y 0,2 µM cada cebador de PCR primaria. La PCR anidada de 100 µl contenía los mismos componentes que la PCR primaria, excepto que se usaron como plantilla 10 µl de una dilución 1:50 de la PCR primaria. Las PCR primaria y anidada se llevaron a cabo con el equipo GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Las secuencias de los cebadores primarios y anidados se proporcionan en la Tabla 4 a continuación. Después de una etapa inicial de desnaturalización de un minuto a 94°C, se efectuaron 30 ciclos de 94°C durante 15 seg, 60°C durante 8 minutos y 72°C durante 2 min seguidos de una etapa de extensión final de 10 min a 72°C.

**Tabla 8:** Cebadores utilizados para la obtención de datos de secuencias de ADN flanqueantes

| Propósito                      | Dirección      | Secuencia del Cebador                                           | Posición (Fig. 8) | SEC ID NO: |
|--------------------------------|----------------|-----------------------------------------------------------------|-------------------|------------|
| Flanco en 5' digerido con NcoI | Directo 1° PCR | GCAGCTTGTATCCATTCTCTTAACC                                       | 2450-2474         | 17         |
|                                | Inverso 1° PCR | TTGTTGATTGGGATGAAAACGA                                          | 1657-1678         | 18         |
|                                | Directo 2° PCR | Igual que el 1° cebador de PCR directo (IPCR digerido con NcoI) |                   | 17         |
|                                | Inverso 2° PCR | ACGAAGAATCCAACGAATCCC                                           | 1631-1651         | 19         |
| Flanco en 3' digerido con XbaI | Directo 1° PCR | AAGGAAATCCAGAAGCACTAATCA                                        | 5517-5540         | 20         |
|                                | Inverso 1° PCR | TAATGCGAGATCAATTACCTC                                           | 1718-1738         | 21         |
|                                | Directo 2° PCR | Igual que el 1° cebador de PCR directo (IPCR digerido con XbaI) |                   | 20         |
|                                | Inverso 2° PCR | CAATTACCTCGTAAAGAAAGTACTA                                       | 1703-1727         | 22         |

[00270] Después de completadas las reacciones de PCR, los productos se purificaron con Zymo DNA Clean & Concentrator™-5 (Zymo Research; Orange, CA). Los productos de PCR fueron secuenciados directamente o después de la clonación. Cuando los productos de PCR o los fragmentos clonados eran de más de 1 kb, se empleó un paseo con cebador para obtener la secuencia de longitud

completa. Se secuenciaron ambas cadenas de ADN para obtener una calidad de secuencia de más de 40 Phred en cada base. La secuenciación se realizó con los equipos BigDye™ Terminador v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit y ABI 3730 DNA Analyzer de Applied Biosystems.

[00271] El producto de PCR flanqueante 3' amplificado a partir del digerido por XbaI fue de alrededor de 6 kb y la amplificación fue demasiado débil para obtener suficiente ADN para la secuenciación directa. Por lo tanto, el producto de PCR se digirió con SpeI y los fragmentos de restricción resultantes, uno de alrededor de 800 pb y el otro de alrededor de 5,2 kb, fueron tratados con ADN Polimerasa I, Fragmento Grande (Klenow) (New England Biolabs) para generar extremos romos y se clonaron en el vector de clonación pCR®-Blunt II- TOPO (Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit, Invitrogen). Se verificaron diez clones de cada fragmento mediante digestión por restricción y se secuenciaron por paseo con cebadores. La unión de los fragmentos de restricción se confirmó mediante amplificación por PCR y secuenciación a través de la unión.

[00272] Se amplificó un fragmento de ADN de 3 kb por PCR inversa a partir del digerido por NcoI circularizado intramolecularmente de ADN genómico de generación F7 de evento 127. La secuenciación de ambos extremos del fragmento indicó que fue amplificado específicamente a partir del lado 5' del inserto del transgén. El fragmento fue secuenciado adicionalmente para obtener 1,3 kb de la secuencia genómica flanqueante de soja 5'. Un fragmento de ADN de 6 kb amplificado por PCR inversa a partir del digerido por XbaI del ADN genómico de la generación F7 de evento 127 y fue totalmente secuenciado después de la subclonación. La secuencia obtenida indica que flanquea el inserto en el lado 3'. Se efectuó el análisis por PCR del ADN de la variedad Conquista no transgénica utilizando cebadores de las regiones flanqueantes 5' y 3' para confirmar que la secuencia flanqueante era nativa del genoma de la planta (datos no mostrados).

[00273] La secuencia completa de inserto del transgén de Soja evento 127 con la secuencia flanqueante 5' y 3' se muestra en la Figura 8 (SEC ID NO: 1). El análisis por BLAST de la secuencia flanqueante 5' investigada confrontado con las bases de datos de ADN públicas disponibles (todas las secuencias de GenBank+ EMBL + DDBJ + PDB) y las bases de datos de ADN patentadas de BASF Plant Science reveló una región de identidad de secuencia con un marcador de secuencia expresada (*expressed sequence tag* - EST) de soja patentado, confirmando que el origen de la secuencia flanqueante identificada es ADN de soja nativo. La secuencia fue analizada adicionalmente para predecir marcos de

lectura abierta. Los resultados indicaron que existe un ORF de 315 pb, de los nucleótidos 941 a 1255 de la secuencia flanqueante, corriente arriba del extremo 5' de la inserción. La alineación de la secuencia flanqueante 5' con la secuencia de transformación reveló que el punto de integración está en el nucleótido 1312 (Figura 8, SEC ID NO: 1), el cual se encuentra 60 pb corriente abajo del codón de finalización del ORF predicho.

[00274] El análisis de la secuencia flanqueante 3' mostró que, antes del punto de integración 3', hay un segmento de secuencia de 376 pb que difiere de una porción de la secuencia de codificación *csr1-2* (nucleótidos 3768-4143 de la Figura 8, SEC ID NO: 1) en sólo un único nucleótido. La inserción de esta secuencia de 376 pb en la unión de la secuencia flanqueante 3' generó un ORF de 501 pb que se extiende a partir del inserto del transgén en la secuencia flanqueante 3'. La transcripción potencial de este ORF fue investigada por RT-PCR. El análisis por BLAST de la secuencia flanqueante 3' investigada confrontado con las bases de datos de ADN públicas disponibles (todas las secuencias de GenBank+ EMBL + DDBJ + PDB) y las bases de datos de ADN patentadas de BASF Plant Science reveló una región de similitud de secuencia en la secuencia flanqueante 3' proximal a un gen de catalasa de soja (Nº de Acceso Z12021). Sin embargo, el punto de integración es de aproximadamente 500 pb corriente arriba del gen homólogo potencial y la secuencia de codificación putativa es alrededor de 2,4 kb corriente abajo del punto de integración. Por lo tanto, incluso si el homólogo de catalasa posible es un gen activo, es poco probable que sea afectado por la inserción. Además, una región de la secuencia flanqueante 3' distal compartía identidad de secuencia con un EST de soja patentado.

[00275] Se realizaron estudios para amplificar por PCR el sitio de integración del Evento 127 a partir del genoma de Conquista no transgénico. Las series de cebadores de PCR A y B que incluían un cebador en la región flanqueante 5' y un segundo cebador en la región flanqueante 3' para amplificar el sitio de inserción no produjeron un producto de ADN amplificado utilizando ADN genómico de la variedad Conquista no transgénica como plantilla. La serie de cebadores de PCR C con cebadores específicos para la secuencia flanqueante 3' no generaron un producto de amplificación del ADN de la variedad Conquista no transgénica, mientras que el amplicón esperado se produjo con el ADN genómico del evento 127 (datos no mostrados). Esto demuestra que el fragmento de ADN amplificado por la serie de cebadores C está presente en el evento 127, pero no existe en el mismo contexto en el genoma de Conquista, lo cual sugiere que ha

ocurrido un reordenamiento del ADN en el sitio de inserción en el evento 127. Esto concuerda con la identificación de un segmento de 376 pb de secuencia duplicada de la región de codificación *csr1-2* cerca de la unión del ADN insertado y el ADN genómico de soja.

E. Secuencia completa del inserto de ADN

[00276] Se diseñaron seis amplicones generados por PCR para abarcar toda la inserción, así como las uniones con las secuencias genómicas de soja adyacentes (Figura 7). La secuencia completa del ADN insertado se obtuvo mediante amplificación por PCR de estos seis fragmentos superpuestos seguido por análisis de secuencia de ADN. Las secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación por PCR se proporcionan en la Tabla 5. Los amplicones de PCR que contenían diferencias en las secuencias con respecto a la secuencia del fragmento de transformación fueron re-amplificados con rTth ADN polimerasa XL. Los productos de PCR se purificaron con el equipo Zymo DNA Clean & Concentrator™-5 y se secuenciaron en ambas hebras a un nivel de calidad de Phred 40 por secuenciación directa y paseo con cebadores. La secuenciación del ADN se realizó como se describe anteriormente.

Tabla 9: Cebadores utilizados para la amplificación del inserto de ADN de Evento 127

| Propósito | Dirección | Secuencia del cebador  | Posición (Fig. 8) | SEC ID NO: |
|-----------|-----------|------------------------|-------------------|------------|
| PCR1      | Directo   | GCTTGATATGCCTTTTGGT TC | 5265-5285         | 23         |
|           | Inverso   | TTGTCTTCCCTCATTGGAC    | 6150-6168         | 24         |
| PCR2      | Directo   | GACGAGATATTCCCGAAC     | 4544-4561         | 25         |
|           | Inverso   | GTCTGATTAGTGCTTCTG G   | 5525-5543         | 26         |
| PCR3      | Directo   | CCCTGTTGCGAGTACGTT GA  | 3739-3758         | 27         |
|           | Inverso   | CTTCCGTTATGACATCGTT G  | 4732-4751         | 28         |
| PCR4      | Directo   | AACCACTCCCTCTCCAAC     | 2980-2997         | 29         |
|           | Inverso   | CTGATGATAGCCACTGCC     | 4266-4283         | 30         |
| PCR5      | Directo   | TTCGTTGCTCTGGTGTC      | 2062-2079         | 31         |

|      |         |                            |               |    |
|------|---------|----------------------------|---------------|----|
|      | Inverso | ACGGTTTCTACGCCTTG          | 3089-<br>3105 | 32 |
| PCR6 | Directo | GAAAATAGGAAGTTTAGG<br>CTTG | 1000-<br>1021 | 33 |
|      | Inverso | GGGCTGATAATGTCGTTT<br>G    | 2229-<br>2247 | 34 |

[00277] Aunque el análisis de transferencia tipo Southern sugirió que el inserto del transgén contenía el casete de expresión *csr1-2* completo, se realizó la clonación y secuenciación del inserto para confirmar su integridad. La secuencia completa del ADN insertado se obtuvo mediante amplificación por PCR de seis amplicones superpuestos con Taq ADN Polimerasa (Figura 7). La secuencia de inserción completa de Soja evento 127 es de 4758 pb de longitud y distinta a la inserción del fragmento de 376 pb de *csr1-2* en el punto de integración 3', la secuencia es idéntica a la secuencia del fragmento de transformación, salvo en tres mutaciones puntuales (Figura 8, SEC ID NO: 1). Una de las mutaciones puntuales es una mutación de G por A en la secuencia de codificación *AHASL*, lo cual resulta en un cambio de aminoácido de R<sub>272</sub> a K<sub>272</sub>. Esta es una sustitución de aminoácido conservadora y no tiene impacto sobre la tolerancia a herbicidas o las propiedades enzimáticas de la proteína At AHAS. Las otras dos mutaciones incluyen una mutación de G por A y una mutación de G por C, las cuales se encuentran corriente abajo del 3'UTR del gen *csr1-2* y por consiguiente son genéticamente silenciosas.

[00278] Se llevaron a cabo experimentos para determinar en qué punto de la producción y el desarrollo del cultivo de Soja evento 127 ocurre la mutación de G por A en la secuencia de codificación *AHASL*. Inicialmente, la reacción PCR4 (Figura 7) utilizada en la secuenciación del inserto se realizó con ADN genómico de generaciones T4 y F8 de evento 127 como plantilla y los productos de PCR fueron secuenciados. La secuencia de la generación T4 de evento 127 T4 no difería de la secuencia esperada (pAC321). Considerando que la generación T4 contiene múltiples copias del inserto y el producto PCR4 es probablemente una combinación de secuencias de diversas copias del inserto, se diseñó un amplicón de PCR de 2,5 kb específico del locus de evento 127 con cebador directo (5'-GCCCTCCTTATTTATCCCCTTA-3'; SEC ID NO:35) en la secuencia flanqueante 5' y un cebador inverso (5'-ACAAACCTACCCAATTCATCGC-3'; SEC ID NO:36) en la secuencia de codificación *csr1-2*. Los productos de PCR fueron secuenciados directamente. La comparación de secuencias reveló que la mutación de G por A también existe en la generación T4 de evento 127, lo cual

indica que la mutación ocurrió en algún momento antes de la generación T4 (datos no mostrados) y se ha mantenido durante las ocho generaciones subsiguientes.

[00279] La secuencia de transformación inicial contiene un segmento de 2,5 kb que originalmente fue designado como promotor de *AHASL* y 5' UTR. Análisis de secuencia recientes han revelado que este segmento de secuencia también contiene un gen de *Arabidopsis* no designado anteriormente que codifica la subunidad gamma de SEC61, una proteína de transporte multimérica. La secuencia de inserto de evento 127 contiene la mayoría del gen de la subunidad y de AtSec61 incluyendo la secuencia de codificación completa. El AtSec61y 5' UTR, designado por el Recurso de Información de *Arabidopsis*, comienza 18 nucleótidos corriente abajo desde el sitio de integración del transgén 5'. Como tal, es poco probable que el inserto contenga el promotor nativo completo para el gen AtSec61y.

[00280] Se evaluó por RT-PCR la posible transcripción del gen de la subunidad y AtSEC61 de *Arabidopsis* encontrado en el inserto de Soja evento 127. La RT-PCR se llevó a cabo utilizando ARN total tratado con ADNasa extraído de la generación F7 de evento 127 como plantilla. Se utilizaron cebadores específicos para dos genes endógenos de soja, *lota* y *GmSec61* y, como controles positivos para confirmar la calidad de la plantilla de ARN. El ARN total de tejido foliar y de raíz de *Arabidopsis* sin tratamiento con ADNasa también se utilizó como control positivo. Los resultados mostraron que ambos controles positivos de soja endógenos, *lota* y *GmSec61* y fueron fuertemente transcritos en tejido foliar de soja joven mientras que el gen de la subunidad y de AtSec61 en la generación F7 de evento 127 se transcribió sólo débilmente. La flecha en la Figura 9 indica el producto de RT-PCR débil correspondiente a la subunidad y de AtSec61 amplificado a partir de evento 127. La banda de ADN amplificado de la subunidad y de AtSec61, de 393 pb, de la generación F7 de evento 127 es del mismo tamaño que la amplificada a partir de hojas y raíces de *Arabidopsis* (Figura 9). El mismo par de cebadores también amplificó una banda del tamaño esperado, 965 pb, a partir del ADN genómico contaminante en muestras de hojas y raíces de *Arabidopsis*. Para confirmar la identidad del producto de RT-PCR de evento 127, se lo secuenció y comparó con la secuencia de ARNm pronosticada de la subunidad y de AtSec61 (datos no presentados). Ambas secuencias se aparearon, lo cual indica que la subunidad y de AtSec61 es débilmente transcrita en hojas de evento 127.

[00281] La inserción de una porción de 376 pb de la secuencia de

codificación *csr1-2* cerca de la unión de la secuencia flanqueante 3' (Figura 7) creó un ORF de 501 pb. Se investigó mediante análisis por RT-PCR la posible transcripción de este ORF. La RT-PCR se llevó a cabo con dos cantidades diferentes de plantilla de ARN, 500 ng y 125 ng. El ADN genómico de la generación F8 de evento 127 se usó también en una reacción de control positiva con cebadores de ORF específicos. Cebadores específicos para el gen *lota* de soja se utilizaron en reacciones de control positivas para confirmar la calidad de la plantilla de ARN. Los cebadores específicos de ORF amplificaron un fragmento de 435 pb de ADN genómico de evento 127. Sin embargo, no se observó producto de RT-PCR detectable utilizando ARN total de tejido foliar joven como plantilla, lo cual sugiere que el ORF no se expresa en evento 127 (Figura 10).

F. Ensayo de PCR para detección cualitativa específica de un evento

[00282] Se desarrolló una PCR específica para un evento utilizando la información obtenida a partir de la secuencia flanqueante y de la secuencia de inserción del ADN. Se diseñaron cuatro pares de cebadores con un cebador de cada par en la secuencia flanqueante de soja 5' y el otro en el casete *csr1-2*. Las secuencias de los cebadores para usar en la PCR específica del evento se proporcionan a continuación en la Tabla 10.

Tabla 10: Cebadores utilizados para la PCR específica de un evento

| Propósito   | Dirección | Secuencia del cebador                      | Posición (Fig. 8) | SEC ID NO: |
|-------------|-----------|--------------------------------------------|-------------------|------------|
| Evento PCR1 | Directo   | GAAAATAGGAAGTTTAGGCT<br>TG                 | 1000-1021         | 37         |
|             | Inverso   | CACTGCTCTTAGCGAAATCT<br>C                  | 1426-1446         | 38         |
| Evento PCR2 | Directo   | GCCCTCCTTATTTATCCCCTT<br>A                 | 1210-1231         | 39         |
|             | Inverso   | GCCGTACGCACAGCTACTTT<br>C                  | 1592-1612         | 40         |
| Evento PCR3 | Directo   | ATAGGAAAGCGCAAAGCTG<br>CGAAGCTGCTCTTAGCGAA | 1128-1145         | 41         |
|             | Inverso   | AT                                         | 1429-1450         | 42         |
| Evento PCR4 | Directo   | GCCCTCCTTATTTATCCCCTT<br>A                 | 1210-1231         | 43         |
|             | Inverso   | AGGATCGATTGCGGAATCA                        | 1403-1421         | 44         |

[00283] Los cebadores se diseñaron para amplificar productos de PCR de entre alrededor de 200 a alrededor de 400 pb de longitud. Se utilizó el ADN

genómico de evento 127 y variedad Conquista no transgénica como plantilla. Las PCR se llevaron a cabo en un volumen total de 25 µl con 25 ng de la plantilla de ADN, 200 µM de cada dNTP, 0,4 µM de cada cebador y 1 unidad de Taq ADN polimerasa por reacción. Después de una desnaturalización inicial de 4 min a 94°C, se realizaron 30 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 60°C (Evento PCR1 y 3) o 66°C (Evento PCR2 y 4) durante 30 segundos, y 72°C durante 45 segundos, seguido de una extensión final de 10 min a 72°C. Se analizaron cuatro plantas de Soja evento 127 y de variedad Conquista no transgénica de seis lugares diferentes de siembra por PCR cualitativa utilizando la serie de cebadores "Evento PCR3".

[00284] Las cuatro PCR generaron productos del tamaño esperado específicamente a partir de Soja evento 127 (Figura 11), sugiriendo que puede utilizarse cualquiera de las cuatro series de cebadores para la detección de una molécula de ácido nucleico de evento 127 en una muestra. El producto 3 de la PCR específica para un evento se validó adicionalmente con muestras de plantas de soja de evento 127 y variedad Conquista no transgénica recogidas en seis lugares de siembra diferente. Los resultados mostraron que el producto 3 de PCR fue amplificado específicamente en las 24 muestras de soja evento 127, pero no en la variedad Conquista control no transgénica (Figuras 11 B y C).

#### G. Ensayo por PCR para la detección cuantitativa específica de un evento

[00285] La PCR cuantitativa específica de un evento ha sido diseñada para detectar y cuantificar con precisión y exactitud ácido nucleico de evento 127 en un lote mixto de semillas en caso de haber ácido nucleico de soja evento 127 en la muestra en una cantidad de entre 0,08% y 5% de la cantidad total de ácido nucleico presente en la misma. En este método, se usan dos pares de cebadores junto con sondas intervinientes. Las secuencias de los cebadores para usar en la PCR específica de un evento se proporcionan a continuación en la Tabla 11.

Tabla 11: Cebadores utilizados para el análisis de Q-PCR

| Propósito    | Dirección | Secuencia del cebador      | Posición (Fig. 8) | SEC ID NO: |
|--------------|-----------|----------------------------|-------------------|------------|
| PCR-evento   | Directo   | AACAGAAGTTTCCGTTGAGCTTTAAG | 6030-             | 45         |
|              |           | AC                         | 6057              |            |
|              | Sonda     | TTTGGGGAAGCTGTCCCATGCCC    | 6059-             | 46         |
|              |           |                            | 6081              |            |
| PCR-endógeno | Inverso   | CATTCGTAGCTCGGATCGTGTAC    | 6095-             | 47         |
|              |           |                            | 6117              |            |
| PCR-endógeno | Directo   | CCAGCTTCGCCGCTTCCTTC       | NA                | 48         |
|              | Sonda     | CTTCACCTTCTATGCCCCTGACAC   | NA                | 49         |
|              | Inverso   | GAAGGCAAGCCCATCTGCAAGCC    | NA                | 50         |

[00286] En este ensayo basado en Taq-Man, el nivel de producto de la PCR específica para un evento se compara con el de un control endógeno durante cada ciclo de reacción en dos mezclas de reacción diferentes.

[00287] El formato de ensayo hace uso de curvas estándares para cada uno de los dos sistemas de PCR, cada curva estándar se compone de cuatro puntos de estándar, cada uno derivado de mediciones por triplicado. Los estándares son producidos preparando soluciones de 20 ng/μl de ADN genómico total que contiene 10% de ADN de soja evento 127 (estándar 1) y diluciones 1:5 seriadas subsiguientes con buffer de dilución (estándares 2 a 4).

Se procesan tres controles sin plantilla (*no-template controls* - NTC) por sistema para verificar la pureza de los reactivos. Cada muestra (desconocido) se analiza a 100 ng de ADN genómico por reacción.

[00288] Las sondas de PCR evento y endógeno se conjugan con FAM (excitación 495 nm, emisión, 520 nm). Los cebadores están diseñados para producir amplicones cortos de menos de 100 pb de longitud. Se diluye una mezcla de ADN genómico de soja evento 127 (10%) y Conquista (no transgénica) (90%) a 20 ng/ μl. Para la curva estándar, esta se diluyó con 10 ng/μl de ADN de esperma de salmón a 20, 4, y 0,8 ng de ADN de soja (el volumen de reacción es de 5 μl). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en volúmenes de 25 μl en placas de 96 pocillos, con todos los componentes estándares (mezcla patrón de TaqMan Universal PCR con uracilo-N-glicosilasa (AmpErase ® UNG, ABI)). En la PCR

evento, los cebadores se añaden a una concentración de 400 nM y las sondas a 100 nM. En la PCR endógeno, los cebadores se añaden a una concentración de 150 nM y las sondas a 50 nM. Los ensayos se ejecutan en un equipo Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System. Después de un ciclo inicial único de 2 min a 50°C y 10 min a 95°C, se realizaron 45 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 60 segundos. Se analizaron por PCR cuantitativa tres muestras de soja evento 127 y de la variedad Conquista no transgénica y las mezclas.

#### H. Análisis de duplicación y gen SEC61 y

[00289] Se realizó una RT-PCR para determinar si se transcribieron la duplicación de 376 pb de una porción de la secuencia de codificación *csr1-2* o el gen AtSec61 y presente en la soja evento 127. El ARN total se utilizó como plantilla para la RT-PCR utilizando el equipo Qiagen OneStep RT-PCR Kit (Qiagen). Para el análisis por RT-PCR de la secuencia de codificación de AtSec61 y, se utilizaron también muestras de ARN total de hojas y raíces de Arabidopsis como controles positivos. Las muestras de ARN total de Arabidopsis se prepararon con reactivo TRIzol (Invitrogen) sin tratamiento con ADNasa. Las reacciones de RT-PCR contenían buffer Qiagen OneStep RT-PCR 1X, 400 µM de cada dNTP, 0,6 µM de cada cebador, 2 µl de mezcla de enzimas Qiagen OneStep RT-PCR, y 500 ng o 125 ng de ARN total en un volumen total de 50 µl. La RT-PCR se llevó a cabo utilizando el equipo GeneAmp PCR System 9700. Luego de un paso de transcripción inversa de 30 min a 50°C, se efectuó la amplificación por PCR bajo las siguientes condiciones: un paso de desnaturalización de 15 min a 95°C, 30 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 64°C durante 30 segundos, y 72°C durante un minuto, y una extensión de 10 minutos a 72°C. Las secuencias de los cebadores utilizados para el análisis de RT-PCR se proporcionan en la Tabla 12.

[00290] Se utilizaron la subunidad Sec61y de soja endógena y genes Iota como controles positivos. El gen de la subunidad Iota de soja se expresa en forma constitutiva y ubicua en la soja (Yamamoto y Knap, 2001).

Tabla 12: Cebadores utilizados para al análisis de RT-PCR

| Propósito                | Dirección | Secuencia del cebador   | Posición<br>(Fig. 8)            | SEC<br>ID<br>NO: |
|--------------------------|-----------|-------------------------|---------------------------------|------------------|
| RT-PCR<br><i>AtSec61</i> | Directo   | ACGAACCTGCTGAAACCCTAAT  | 1338-<br>1359                   | 51               |
|                          | Inverso   | TAAGAATGGAGAATTTGGCTACA | 2280-<br>2302                   | 52               |
| RT-PCR<br><i>lota</i>    | Directo   | TGAAGCAGCAGCTGAGTTTCGC  | N/A*                            | 53               |
|                          | Inverso   | GGCAGTCTGAACCGTCTCCTC   | N/A                             | 54               |
| RT-PCR<br><i>GmSec61</i> | Directo   | GCTTGGGAGACAGAGAAAGAGA  | N/A*                            | 55               |
|                          | Inverso   | CCTTTTGCTTGACAACCTGAAT  | N/A                             | 56               |
| RT-PCR<br>ORF501         | Directo   | TTGGAATGCATGGGACTGT     | 3807-<br>3825,<br>5733-<br>5751 | 57               |
|                          | Inverso   | TGTCTTCCCTCATTGGACTG    | 6148-<br>6167                   | 58               |

\* N/A - no aplicable. Este es un control positivo; se espera que la serie de cebadores amplifique el ADNc derivado de un transcripto de soja endógeno no relacionado con el inserto de evento 127.

I. Análisis por PCR del sitio de integración

[00291] Se llevaron a cabo tres reacciones de PCR para caracterizar el sitio de inserción en la variedad Conquista de soja no transgénica. Los cebadores de PCR utilizados en este estudio se obtuvieron a partir de la secuencia de ADN que se determinó para las regiones genómicas 5' y 3' que flanquean el casete de expresión nuevo en el genoma del evento 127.

[00292] Los cebadores dePCR para PCRA (véase la Tabla 13 a continuación) fueron diseñados de manera que el cebador directo pueda unirse en la secuencia flanqueante 5' y el cebador inverso pueda unirse en la secuencia flanqueante 3' inmediatamente después del punto de integración 3'. Los cebadores para PCRB se diseñaron de manera que el cebador directo pueda unirse en la secuencia flanqueante 5', mientras que el cebador inverso pueda unirse cerca del extremo distal de la secuencia flanqueante 3'. Ambos cebadores para PCRC se diseñaron para unirse en la secuencia flanqueante 3'.

Tabla 13: Cebadores utilizados para el análisis del sitio de integración

| Propósito | Dirección | Secuencia del cebador | Posición<br>(Fig. 8) | SEC<br>ID<br>NO: |
|-----------|-----------|-----------------------|----------------------|------------------|
| PCRA      | Directo   | CCACAATGTGCCAATTAAGT  | 936-955              | 59               |
|           | Inverso   | GCGTGTTTCTTTAGCATCA   | 6.319-<br>6.337      | 60               |
| PCRB      | Directo   | CTCCTTCGCCGTTTAGTGTA  | 1.109-<br>1.128      | 61               |
|           | Inverso   | GTTTCGCGTTTAGGGTTCC   | 10.098-<br>10.116    | 62               |
| PCRC      | Directo   | ATAAGCCAATTTGGGTCTGCC | 8.312-<br>8.332      | 63               |
|           | Inverso   | GTTTCGCGTTTAGGGTTCC   | 10.098-<br>10.116    | 64               |

[00293] Se llevaron a cabo una PCRA y una PCRC con Qiagen Taq ADN polimerasa y una PCR2 con el kit GeneAmp® XL PCR. Se utilizaron 25 ng de ADN de evento 127 o de Conquista en todas las amplificaciones por PCR. En la PCR con Qiagen Taq ADN polimerasa, la reacción contenía buffer Qiagen PCR 1X, 200 µM de cada dNTP, 0,4 µM de cada cebador y 1 unidad de Taq ADN polimerasa en un volumen total de 25 µl. Después de un paso de desnaturalización inicial de 4 minutos a 94°C, se realizaron 30 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 66°C durante 45 segundos y 72°C durante 2 min seguido de un paso de extensión final de 10 minutos a 72°C.

[00294] En la PCR con el kit GeneAmp® XL PCR, la reacción contenía los mismos componentes utilizados en la clonación de la secuencia flanqueante, excepto por la plantilla de ADN. Después de un paso de desnaturalización inicial de 1 min a 94°C, se efectuaron 30 ciclos a 94°C durante 1 min y 66°C durante 10 minutos seguido de una extensión final de 10 minutos a 72°C.

J. Análisis de bioinformática

[00295] Se realizó el montaje de la secuencia de ADN con Staden Pregap4 y Gap4 (Staden, 1996). La alineación de las secuencias de inserción clonadas y esperadas se llevó a cabo con el software LI-COR AlignIR (Licor Biotechnology,

Lincoln, NE). Se investigaron las secuencias flanqueantes confrontándolas con bases de datos de ADN públicas disponibles (todas las secuencias de GenBank + EMBL + DDBJ + PDB) y las bases de datos de ADN patentadas de BASF Plant Science mediante análisis por BLAST (Altschul *et al.*, 1997). Los marcos de lectura abierta de 30 codones o más se identificaron con la función análisis de ORF de Vector NTI v9.0 (Invitrogen).

[00296] Tomando como base los resultados de estos experimentos, la soja evento 127 contiene una sola copia de un inserto de 4.758 pb que comprende el casete de expresión completo de *csr1-2*, así como el 5' UTR, la secuencia de codificación completa, y el 3' UTR del gen de la subunidad  $\gamma$  de AtSec61. Una repetición de 376 pb de la secuencia de codificación del gen *csr1-2* también está integrado en la unión 3' con la secuencia flanqueante. No se encontró una secuencia esqueleto del vector integrada en el genoma de la soja. El inserto se heredó en forma estable a través de ocho generaciones de cultivo, lo cual demuestra que el mismo está integrado en forma estable en el genoma de la soja. Hay tres mutaciones puntuales en el casete de expresión *csr1-2*: una mutación conservadora en la secuencia de codificación *AHASL* que no tiene impacto sobre la tolerancia a herbicidas o las propiedades enzimáticas de la proteína *AHASL* mutante, y dos mutaciones corriente abajo del 3' UTR. Parece haber ocurrido un reordenamiento del ADN genómico de la soja en el ADN que flanquea el extremo 3' del inserto, y esto tuvo lugar muy probablemente durante el proceso de integración del ADN. El inserto contiene la secuencia de codificación del gen de la subunidad  $\gamma$  de AtSec61, que fue incluida en el fragmento de ADN utilizado para la transformación. Este gen se transcribe sólo débilmente. Un fragmento de 376 pb de la secuencia de codificación *csr1-2* creó un nuevo ORF de 501 pb. Los experimentos de RT-PCR indicaron que no hay transcripción detectable de este ORF.

#### **Ejemplo 4: Control de malezas**

##### **A. Ejemplo 4A: Aplicación post-emergente**

[00297] Se establecieron tres experimentos de campo en tres lugares diferentes en la región central de Brasil: Estación de Investigación Agrícola (*Agricultural Research Station* - ARS) en Santo Antonio de Posse, SP, Embrapa Arroz y Frijoles (CNPAP) en Santo Antonio de Goiás, GO y Embrapa-Epamig (CTTP) en Uberaba, MG. La infestación de malezas en cada sitio se presenta en la Tabla 13.

**Tabla 13.** Infestación de malezas en cada sitio cuando se aplicaron los los

herbicidas - en la post-emergencia temprana

| Ubicaciones | Malezas (infestación - planta/metro <sup>2</sup> ) |
|-------------|----------------------------------------------------|
| ARS         | CYPRO (25), RCHBR (12) y IPOGR (14)                |
| CNPAF       | COMBE (18) y BOILF (22)                            |
| CTTP        | EPHHL (21) y SIDRH (17)                            |

[00298] CYPRO = *Cyperus rotundus*; BOILF = *Spermacoce latifolia*; COMBE = *Commelina benghalensis*; EPHHL = *Euphorbia heterophylla*; SIDRH = *Sida rombifolia*; RCHBR = *Richardia brasiliensis*; IPOGR = *Ipomoea grandifolia*.

[00299] Todos los procedimientos desde la siembra hasta la cosecha fueron similares para las tres ubicaciones. Los herbicidas se aplicaron en la post-emergencia temprana, cuando las malezas presentaban 2 a 4 hojas y el cultivo de soja tenía la primera hoja trifoliada completamente abierta. Se empleó un diseño de bloques completamente aleatorio con tres repeticiones. Los principales tratamientos se presentan en la Tabla 15.

**Tabla 15.** Principales tratamientos aplicados en la post-emergencia temprana de las malezas:

| Tratamientos                   | Tasa (g ia/ha) | Formulación       |
|--------------------------------|----------------|-------------------|
| 1. Imazapir                    | 72             | 480 g/l – AS      |
| 2. Imazapir + imazapic (Kifix) | 70             | 525+175 g/kg - WG |
| 3. Glifosato                   | 540            | 360 g/l - AS      |

[00300] Los herbicidas imidazolinona se aplicaron a soja tolerante a imidazolinona (derivada del evento 127) y el glifosato se aplicó a soja Roundup Ready (Valiosa RR), plantada una al lado de la otra en cada lugar. Los herbicidas imidazolinona (imazapir y Kifix) se aplicaron con un adyuvante no iónico - Dash - a 0,25% v/v. Se utilizó una mochila con CO<sub>2</sub> con 80.015 boquillas de baja presión que suministraban 170 l/ha a 190 kPa en todas las aplicaciones de herbicidas. Todas las semillas de soja se sembraron a 5 cm de profundidad a una población de 380.000 semillas/ha con un espaciamiento de filas de 50 cm.

[00301] Las lesiones en los cultivos se evaluaron 15 y 30 días después de la aplicación (*days after application* - DDA), basándose en una escala de 0 a 100, donde 0 es ausencia de lesión y 100 es muerte del cultivo. La eficacia del herbicida se evaluó a los 15, 30 y 60 DAA basándose en una escala de 0 a 100, donde 0 es ausencia de control y 100 es control total.

[00302] La Tabla 16 muestra la eficiencia de estos tratamientos claves en las malezas presentes en las áreas en el momento de aplicación del herbicida. De acuerdo con estos resultados, imazapir y una combinación de imazapir + imazapic tuvieron eficacia similar. A los 30 DAA ambos productos fueron muy eficientes sobre estas siete malezas importantes de Brasil: CYPRO (87%), COMBE (87-90%), EPHHL (85-87%), IPOGR (90-91%), BOILF (82-83 %), SIDRH (86-87%) y RCHBR (83%). A los 60 DAA, los herbicidas imidazolinona fueron superiores al glifosato sobre CYPRO, COMBE, RCHBR e IPOGR cuando se aplicaron en la post-emergencia.

**Tabla 16.** Eficacia de imazapir, una combinación de imazapir + imazapic y glifosato aplicados en la post-emergencia en soja (Evento 127 y RR).

| Malezas             |               | CYPRO |    |    | BOILF |    |    | COMBE |    |    |
|---------------------|---------------|-------|----|----|-------|----|----|-------|----|----|
| Productos           | g ia/ha - DAT | 15    | 30 | 60 | 15    | 30 | 60 | 15    | 30 | 60 |
| Imazapir            | 72            | 95    | 87 | 81 | 88    | 83 | 75 | 93    | 87 | 80 |
| Imazapir + imazapic | 70            | 97    | 88 | 82 | 88    | 82 | 73 | 91    | 90 | 83 |
| Glifosato           | 540           | 67    | 43 | 35 | 82    | 75 | 68 | 70    | 61 | 50 |

| Malezas             |               | EPHHL |    |    | SIDRH |    |    | RCHBR |    |    | IPOGR |    |    |
|---------------------|---------------|-------|----|----|-------|----|----|-------|----|----|-------|----|----|
| Productos           | g ia/ha - DAT | 15    | 30 | 60 | 15    | 30 | 60 | 15    | 30 | 60 | 15    | 30 | 60 |
| Imazapir            | 72            | 92    | 85 | 83 | 94    | 87 | 81 | 86    | 83 | 77 | 96    | 91 | 85 |
| Imazapir + imazapic | 70            | 98    | 87 | 83 | 93    | 86 | 82 | 92    | 83 | 75 | 97    | 90 | 84 |
| Glifosato           | 540           | 85    | 77 | 72 | 82    | 77 | 70 | 78    | 57 | 43 | 90    | 87 | 73 |

Ejemplo 4B: Aplicaciones para quema

[00303] Se establecieron tres experimentos de campo en tres lugares diferentes en la región central de Brasil: Estación de Investigación Agrícola (*Agricultural Research Station - ARS*) en Santo Antonio de Posse, SP, Embrapa Arroz y Frijoles (CNPAF) en Santo Antonio de Goiás, GO y Embrapa-Epamig (CTTP) en Uberaba, MG. La infestación de malezas en cada sitio se presenta en la Tabla 17.

**Tabla 17.** Infestación de malezas en cada sitio cuando se aplicaron los herbicidas - en la quema:

| Ubicaciones | Malezas (infestación - planta/metro <sup>2</sup> ) |
|-------------|----------------------------------------------------|
| ARS         | CYPRO (23), EPHHL (15) y GASPA (32)                |
| CNPAF       | DIGHO (24), COMBE (15) y IPOGR (11)                |
| CTTP        | BRAPL (41) y BIDPI (25)                            |

[00304] BRAPL = *Brachiaria plantaginea*; DIGHO = *Digitaria horizontalis*; CYPRO = *Cyperus rotundus*; COMBE = *Commelina benghalensis*; EPHHL = *Euphorbia heterophylla*; IPOGR = *Ipomoea grandifolia*; GASPA = *Galinsoga parviflora*; BIDPI = *Bidens pilosa*.

[00305] Todos los procedimientos desde la siembra hasta la cosecha fueron similares para las tres ubicaciones. Los herbicidas se aplicaron en la quema cinco días antes de la siembra de soja.

[00306] Se empleó un diseño de bloques completamente aleatorio con tres repeticiones. Los principales tratamientos se listan en la Tabla 18.

**Tabla 18.** Principales tratamientos aplicados en la quema - 5 días antes de la siembra:

| Tratamientos           | Tasa (g ia/ha) | Formulación       |
|------------------------|----------------|-------------------|
| 1. Glifosato           | 1080           | 360 g/l – AS      |
| 2. Imazapic            | 70             | 700 g/kg - WG     |
| 3. Imazapic + imazapir | 70             | 525+175 g/kg - WG |

[00307] La soja tolerante a imidazolinona derivada del evento 127 se plantó a 5 cm de profundidad a una población de 380.000 semillas/ha con un espaciamiento de filas de 50 cm. Los herbicidas imidazolinonas se aplicaron con un adyuvante no iónico, Dash, a 0,25% v/v. Se utilizó una mochila con CO<sub>2</sub> con 80.015 boquillas de baja presión que suministraban 170 l/ha a 190 kPa en todas las aplicaciones de herbicidas (Tabla 18).

[00308] Las lesiones en los cultivos se evaluaron 15 y 30 días después de la aplicación (*days after application* - DDA), basándose en una escala de 0 a 100, donde 0 es ausencia de lesión y 100 es muerte del cultivo. La eficacia del herbicida se evaluó a los 15, 30 y 60 DAA basándose en una escala de 0 a 100, donde 0 es ausencia de control y 100 es control total.

[00309] La Tabla 19 muestra la eficiencia de estos tratamientos claves

sobre las malezas presentes en las áreas en la aplicación para quemado. Los resultados a los 30 y 60 DAA mostraron el efecto residual de los herbicidas imidazolinona en comparación con el glifosato. A los 30 DAA, una combinación de imazapir + imazapic fue un poco mejor que imazapic, pero ambos fueron eficientes sobre BRAPL (85%), DIGHO (95%), CYPRO (88%), COMBE (75-94%), EPHHL (95%), IPOGR (75%), GASPA (84-95%) y BIDPI (79-93%). El glifosato no tuvo actividad residual y no fue eficiente sobre estas 8 malezas a los 30 y 60 DAA.

**Tabla 19.** Eficacia (%) de imazapic, combinación de imazapir + imazapic y glifosato aplicados en la quema sobre malezas claves de Brasil

| Malezas             |               | BRAPL |    | DIGHO |    | CYPRO |    | COMBE |    |
|---------------------|---------------|-------|----|-------|----|-------|----|-------|----|
| Productos           | g ia/ha - DAT | 30    | 60 | 30    | 60 | 30    | 60 | 30    | 60 |
| Glifosato           | 1080          | 53    | 25 | 60    | 41 | 60    | 53 | 38    | 22 |
| Imazapic            | 70            | 85    | 79 | 95    | 86 | 88    | 76 | 75    | 64 |
| Imazapic + imazapir | 70            | 87    | 82 | 98    | 87 | 95    | 87 | 94    | 87 |

| Malezas             |               | EPHHL |    | IPOGR |    | GASPA |    | BIDPI |    |
|---------------------|---------------|-------|----|-------|----|-------|----|-------|----|
| Productos           | g ia/ha - DAT | 30    | 60 | 30    | 60 | 30    | 60 | 30    | 60 |
| Glifosato           | 1080          | 15    | 7  | 23    | 15 | 19    | 12 | 25    | 21 |
| Imazapic            | 70            | 98    | 86 | 75    | 73 | 84    | 78 | 79    | 73 |
| Imazapic + imazapir | 70            | 95    | 82 | 91    | 83 | 95    | 81 | 93    | 82 |

Ejemplo 4C: Control de plantas tolerantes a glifosato

[00310] Se llevaron a cabo estudios en invernadero para determinar si los herbicidas imidazolinona podrían utilizarse en el control de malezas no deseadas tolerantes a glifosato y cultivos en un área cultivada. Se plantaron semillas de plantas resistentes a glifosato en macetas de 4,5 pulgadas utilizando una mezcla metro para aplicación en post-emergencia y suelo de Carolina del Norte para aplicación en pre-emergencia con fertilizantes de liberación lenta sobre la superficie del suelo. Las plantas se mantuvieron en un invernadero con riego elevado.

[00311] Se sometieron cinco plantas individuales de soja resistente a glifosato, maíz y cola de caballo a tratamientos de aspersion con glifosato, imazapir o imazapic aplicados en post-emergencia o pre-emergencia. Las

aspersiones en post-emergencia se llevaron a cabo en el estadio de dos hojas verdaderas para el maíz y la soja y en el estadio de nueve hojas verdaderas para cola de caballo. El glifosato se aplicó a una tasa de 774 g ea/ha, mientras que los herbicidas imazapir e imazapic se aplicaron a tasas de 20 g ia/ha, 40 g ia/ha, 80 g ia/ha, 160 g ia/ha y 240 g i.a./ha. La tasa de lesiones global porcentual se determinó visualmente 14 días después del tratamiento (*days after treatment* - DAT) y 25 días después del tratamiento (DAT). Las plantas control sin tratamiento no presentaban lesión a la vista en ninguno de los estudios. Los resultados de las pruebas en post-emergencia se resumen en la Tabla 20 y los resultados del estudio en pre-emergencia se resumen en la Tabla 21. Los resultados se presentan como promedios de las 5 plantas individuales.

**Tabla 20:** Tasa de lesiones en la aplicación en post-emergencia de los herbicidas glifosato e imidazolinona

|                 |     | Tasa Global de Lesiones (%) |          |    |    |     |     |          |    |    |     |     |
|-----------------|-----|-----------------------------|----------|----|----|-----|-----|----------|----|----|-----|-----|
|                 |     | Gly                         | Imazapyr |    |    |     |     | Imazapic |    |    |     |     |
|                 | DAT | 774                         | 20       | 40 | 80 | 120 | 240 | 20       | 40 | 80 | 160 | 240 |
|                 |     |                             |          |    |    |     |     |          |    |    |     |     |
| Soja            | 14  | 1                           | 75       | 96 | 97 | 98  | 99  | 35       | 61 | 71 | 87  | 96  |
| Maíz            | 14  | 1                           | 96       | 98 | 99 | 100 | 100 | 83       | 87 | 93 | 99  | 99  |
| Cola de caballo | 14  | 34                          | 70       | 79 | 90 | 96  | 97  | 56       | 59 | 80 | 92  | 94  |
| Cola de caballo | 25  | 16                          | 44       | 73 | 97 | 99  | 99  | 27       | 28 | 69 | 77  | 88  |

**Tabla 21:** Tasa de lesiones en la aplicación en pre-emergencia de los herbicidas glifosato e imidazolinona

|                 |     | Tasa Global de Lesiones (%) |          |     |     |     |     |          |     |     |     |     |
|-----------------|-----|-----------------------------|----------|-----|-----|-----|-----|----------|-----|-----|-----|-----|
|                 |     | Gly                         | Imazapyr |     |     |     |     | Imazapic |     |     |     |     |
|                 | DAT | 774                         | 20       | 40  | 80  | 120 | 240 | 20       | 40  | 80  | 160 | 240 |
|                 |     |                             |          |     |     |     |     |          |     |     |     |     |
| Soja            | 14  | 0                           | 41       | 43  | 66  | 83  | 87  | 12       | 39  | 60  | 70  | 81  |
| Maíz            | 14  | 0                           | 37       | 47  | 65  | 81  | 91  | 32       | 38  | 67  | 86  | 90  |
| Cola de caballo | 14  | N/D                         | N/D      | N/D | N/D | N/D | N/D | N/D      | N/D | N/D | N/D | N/D |
| Cola de caballo | 25  | 0                           | 46       | 63  | 84  | 96  | 88  | 65       | 90  | 99  | 99  | 99  |

[00312] Estos resultados indican que los herbicidas imidazolinona pueden utilizarse para el control de malezas tolerantes a glifosato y cultivos en la pre- o post-emergencia. Una ventaja es la posibilidad de utilizar herbicidas imidazolinona con plantas de evento 127 para el control de malezas y plantas no deseadas

resistentes en las cuales el glifosato no es efectivo para el control.

Ejemplo 4D: Aumento de la producción de soja usando Soja evento 127

[00313] Se llevaron a cabo ensayos de campo para evaluar las características agronómicas, fenotípicas y fenológicas de una línea de soja transgénica con tolerancia a herbicidas imidazolinona (evento 127) con respecto a un control isogénico no transgénico (nulo) y a otras variedades de soja no transgénicas (convencionales) (verificaciones). Con este fin, se realizaron estudios en lugares de campo en Brasil que son representativos de áreas de producción de soja comercial y a los cuales se adaptaron todos los genotipos.

[00314] Cinco tratamientos se repitieron cuatro veces (Tabla 22) en un diseño de bloques completos aleatorios en todas las ubicaciones de campo. Cada parcela consistía de seis filas de 8 m de largo con un espaciado de 0,5 m entre las filas de la misma parcela y un espaciado de 1,0 m entre las filas de parcelas adyacentes. Se determinaron las características fenotípicas y agronómicas de plantas de las filas 3 y 4.

[00315] Los cinco tratamientos incluidos en estas evaluaciones representaron una combinación de genotipos de soja específicos y formulaciones de herbicidas (herbicidas imidazolinona y no imidazolinona) requeridos para generar datos apropiados a fin de cumplir los objetivos de estos estudios.

[00316] En estas evaluaciones se utilizaron dos tratamientos herbicidas: 1) imazapir, aspersionado a una tasa de 70 g ia/ha, y 2) Volt, una combinación de bentazona (400 g i.a./ha) y acifluorfenó (170 g i.a./ha), aspersionado a una tasa de 570 g i.a./ha. Los diferentes genotipos de soja y formulaciones de herbicidas se combinaron para generar cinco tratamientos (Tabla 22). Estos cinco tratamientos (T1, T2, T3, T4, T5) constituían una repetición completa en el diseño experimental.

**Tabla 22.** Tratamientos experimentales (entradas) incluidos en cada ensayo de campo de soja.

| Tratamiento        | Genotipo              | Herbicida             |
|--------------------|-----------------------|-----------------------|
| Tratamiento 1 (T1) | Evento 127            | Imazapir (70 g ia/ha) |
| Tratamiento 2 (T2) | Evento 127            | Volt (570 g ia/ha)    |
| Tratamiento 3 (T3) | Control isogénico     | Volt (570 g ia/ha)    |
| Tratamiento 4 (T4) | Monsoy 8001           | Volt (570 g ia/ha)    |
| Tratamiento 5 (T5) | Coodetec 217 (CD 217) | Volt (570 g ia/ha)    |

[00317] Los experimentos se sembraron en siete Estaciones Experimentales en Brasil (Tabla 23). Las estaciones están ubicadas en regiones que son representativas de áreas de producción de soja a las cuales se adaptaron los genotipos de soja. Todos los lugares tenían un Certificado de Calidad en Bioseguridad (*Certificate of Quality in Biosafety* - CQB), una infraestructura determinada, instalaciones de laboratorio y equipo de campo, y personal experimentado en investigación agrícola y capacitación en bioseguridad.

**Tabla 23.** Localización de las estaciones experimentales con ubicación, experimento y códigos de CQB.

| CIUDAD, ESTADO             | UBICACIÓN (EXPERIMENTO) CÓDIGO |
|----------------------------|--------------------------------|
| Santo Antonio de Posse, SP | EEA (011)                      |
| Ponta Grossa, PR           | SNT (008)                      |
| Londrina, PR               | CNPSO (010)                    |
| Uberaba, MG                | CTTP (012)                     |
| Brasilia, DF               | CNPH (016)                     |
| Santo Antônio de Goiás, GO | CNPAF (014)                    |
| Sete Lagoas, MG            | CNPMS (013)                    |

[00318] Las similitudes fenotípicas, fenológicas y agronómicas del control isogénico del evento 127 y las variedades de verificación se determinaron mediante el registro de diversas características empleadas habitualmente para describir el fenotipo y el comportamiento de un genotipo de soja. Las características se registraron en todas las parcelas de todas las ubicaciones (a menos que se indique lo contrario). Se utilizó una prueba de Tukey para comparar las medias de las fuentes de variación de las cuales se determinó por ANOVA que presentaban un efecto significativo sobre una característica en particular.

[00319] En promedio en las ubicaciones, el rendimiento del evento 127 con imazapir (T1) o con Volt (T2) y el rendimiento del control isogénico con imazapir (T3) no fueron significativamente diferentes para Germinación, Población Final, Tallo Verde, Acame, Días hasta la Floración, Días hasta la Maduración o Rendimiento (Tabla 24). Solamente para Altura de la Planta y Tamaño de la Semilla T1 difirió significativamente de T3, y solamente para Tamaño de la Semilla T2 difirió significativamente de T3. Además, ninguna de las diferencias en las medias de las características en las ubicaciones para T1 y T2 fueron

significativamente diferentes (Tabla 24).

**Tabla 24.** Medias de tratamiento en la ubicación de cada característica evaluada.

| Tratamiento <sup>‡</sup> | Característica <sup>†</sup> |           |            |       |           |      |           |        |             |
|--------------------------|-----------------------------|-----------|------------|-------|-----------|------|-----------|--------|-------------|
|                          | G                           | FS        | PH         | GS    | L         | DF   | DM        | 100SW  | Rendimiento |
| T1                       | 85,0<br>a <sup>§</sup>      | 90,7<br>a | 79,0<br>bc | 4,5 a | 1,5<br>ab | 45 a | 126<br>a  | 19,7 a | 3748 a      |
| T2                       | 85,8<br>a                   | 90,5<br>a | 83,4<br>ab | 2,0 a | 1,6<br>ab | 45 a | 126<br>a  | 18,8 a | 3816 a      |
| T3                       | 88,3<br>a                   | 94,6<br>a | 86,0<br>a  | 1,1 a | 1,9 a     | 45 a | 125<br>ab | 16,9 b | 3463 a      |
| T4                       | 87,9<br>a                   | 93,5<br>a | 79,0<br>bc | 1,6 a | 1,1 b     | 45 a | 122<br>c  | 13,2 c | 3502 a      |
| T5                       | 85,9<br>a                   | 91,4<br>a | 74,7<br>c  | 0,9 a | 2,1 a     | 46 a | 122<br>bc | 13,5 c | 3570 a      |

<sup>†</sup> G = germinación inicial (%), FS = población final de las plantas, PH = altura de la planta (cm); GS = tallo verde (%), L = grado de acame, DF = días hasta la floración plena (ciclo vegetativo); DM = días hasta la maduración plena (ciclo total); 100SW = tamaño de la semilla (peso de 100 semillas (g)); y Rendimiento = rendimiento del grano (kg/ha).

<sup>‡</sup> T1 = BPS-CV-127-9 tratado con imazapir, T2 = BPS-CV-127-9 tratado con Volt, T3 = Control de isolínea tratado con Volt, T4 = Monsoy 8001 tratado con Volt, T5 = Coodetec 217 tratado con Volt.

<sup>§</sup> Las medias seguidas por la misma letra no difieren significativamente por la prueba de Tukey con 5% de probabilidad.

[00320] Los resultados de este estudio indican que las líneas de soja que contienen evento 127 pueden utilizarse para mantener niveles de rendimiento después de la aplicación de herbicidas imidazolinona con actividad residual, que son equivalentes a otras variedades comerciales en ausencia de la aplicación de estos herbicidas.

Ejemplo 5: Ensayo de PCR en gel para detección cuantitativa específica de un evento

[00321] Se desarrolló un método de ensayo cualitativo por PCR en gel para

usar en la detección de ácidos nucleicos de evento 127 en muestras de semillas y granos. El método fue capaz de detectar 0,05% de ADN de soja evento 127 en una mezcla de ADN de soja no transgénica.

[00322] Las muestras de granos y semillas se molieron en un vaso de molienda de 25 ml durante 30 segundos a 30 Hz utilizando un molino mezclador MM 400 (Retsch; Haan, Alemania) para obtener un polvo homogéneo. Se extrajo el ADN genómico de 0,1-1 g de muestras de grano molido usando buffer CTAB (bromuro de cetil trimetil amonio) seguido de extracción con cloroformo:octanol y precipitación con alcohol. El precipitado resultante se disolvió y los inhibidores restantes se retiraron mediante cromatografía de intercambio aniónico utilizando una columna de flujo por gravedad Genomic-tip 20/G (Qiagen, Hilden, Alemania).

[00323] La concentración y pureza del ADN se analizaron con un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Alemania) determinando la relación de absorbancia de luz de la muestra a las longitudes de onda de 260 y 280 nm ( $A_{260/280}$ ) y 260 y 230 nm ( $A_{260/230}$ ). El ADN con relaciones de  $A_{260/280}$  cercanas a 1,8 y  $A_{260/230}$  superiores a 1,8 fue seleccionado para una PCR subsiguiente.

[00324] Se desarrolló otra serie de cebadores para amplificar una región específica de evento 127 y se utilizó un gen específico de soja como control endógeno. El ensayo de PCR específico de un evento está dirigido a la unión de inserto del transgén-ADN genómico de soja nativo característica del evento 127. Todas las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo en un equipo T1 Thermal Cycler (Biometra, Göttingen, Alemania). Se utilizaron 100 ng de ADN genómico como plantilla en cada una de las reacciones de PCR.

[00325] Se empleó un sistema de PCR específico para soja para detectar el gen lectina (*Le1*) de *Glycine max* (soja), (Nº de Acceso a GenBank K00821) como sistema de referencia. Las secuencias de cebadores y las condiciones de ciclado en PCR para la PCR del gen de lectina fueron adaptadas de Hird *et al.* (J. AOAC Int., 86: 66-71 (2003)). Las secuencias de los cebadores fueron SoyLec-F (5'- TGGTCGCGCCCTCTACTC) (SEC ID NO: 65) y SoyLec-R (5'- GGCGAAGCTGGCAACG) (SEC ID NO: 66). Los cebadores fueron diseñados para amplificar un fragmento específico para soja de 70 pares de bases (pb).

[00326] Las PCR para los controles endógeno se realizaron en un volumen total de 20 µl con 100 ng de DNA genómico, 200 µM de dNTP, 2 mM de  $MgCl_2$ , 500 nM de cada cebador y 1 unidad de Taq ADN polimerasa por reacción. Después de una desnaturalización inicial de 2 min a 94°C, se efectuaron 32 ciclos

de 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos, y 72°C durante 30 segundos, seguido de una extensión final de 1 min a 72°C.

[00327] Las reacciones utilizando los cebadores y condiciones antes mencionadas se efectuaron con muestras de ADN individuales obtenidas de arroz (*Oryza sativa*), colza (*Brassica napus*), algodón (*Gossypium hirsutum*, 2 líneas diferentes), maíz (*Zea mays*), soja Conquista, soja evento 127, y sin plantilla de ADN (como control) y se llevaron a cabo en un gel de agarosa. Se obtuvo un producto de 70 pares de bases en muestras de ADN de plantas de soja (Conquista y evento 127), mientras que no se obtuvo producto de amplificación en las otras muestras. Por consiguiente, los cebadores de control endógeno son capaces de detectar ADN genómico de soja en forma específica.

[00328] El ensayo específico para un evento correspondiente a soja evento 127 se estableció en la unión del inserto 5' con el ADN genómico de soja. El sitio de unión del cebador directo se encuentra dentro del ADN genómico de soja nativo (127-61F: 5' – GGGCAAAC TAGT CTCGTAATATAT) (SEC ID NO: 67) y el sitio de unión del cebador inverso se encuentra en el inserto 127 (127-176R: 5' – CGGAATTGGTAATCGAAATT) (SEC ID NO: 68). La reacción amplifica un fragmento de 116 pares de bases (pb).

[00329] La especificidad de los cebadores específicos de eventos (127-61F y 127-176R) se determinó con 100 ng de ADN genómico (de arroz (*Oryza sativa*), colza (*Brassica napus*), algodón (*Gossypium hirsutum*), maíz (*Zea mays*), Soja GTS 40-3-2, Soja 305423, Soja 356043, Soja A2704-12, Soja Conquista, Soja evento 127, y un control sin plantilla). La PCR para las reacciones específicas de un evento se realizó en un volumen total de 20 µl con 100 ng de plantilla de ADN, 200 µM de dNTP, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, 500 nM de cada cebador y 1 unidad de Taq ADN polimerasa por reacción. Después de una desnaturalización inicial de 2 min a 94°C, se efectuaron 32 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 56°C durante 30 segundos, y 72°C durante 30 segundos, seguido de una extensión final de 1 min a 72°C.

[00330] La presencia o ausencia de soja evento 127 en las muestras se determinó mediante la separación de un fragmento de PCR de 116 pb específico de evento 127 en un gel de agarosa al 4% teñido con bromuro de etidio.

[00331] Se obtuvo un fragmento de PCR de 116 pb específico de evento 127 en todas las reacciones correspondientes a muestras de soja evento 127, mientras que no se obtuvieron fragmentos de PCR específicos de evento 127 en ninguna de las otras muestras. Por lo tanto, los cebadores específicos del evento

127-61F y 127-176R son capaces de detectar específicamente ADN de plantas de soja evento 127. Una búsqueda de secuencias de nucleótidos utilizando la secuencia amplificada del amplicón específico del evento no ha identificado ningún apareamiento con 100% de identidad utilizando un análisis por Herramienta de Búsqueda de Alineamientos Locales Básicos ADN-ADN (*DNA-DNA Basic Local Alignment Search Total* - BLASTN).

[00332] A fin de determinar el límite de detección de las reacciones que utilizan los cebadores 127-61F y 127-176R, se produjeron estándares con un contenido definido de ADN de evento 127 (100%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05% y 0%) por diluciones seriadas de ADN de evento 127 con ADN de Conquista. En cada dilución, se realizaron 22 amplificaciones por PCR repetidas en las condiciones discutidas anteriormente. Se procesó un control sin plantilla de ADN (*no-DNA template control* - NTC) por sistema para verificar la pureza de los reactivos.

[00333] Los productos de PCR específicos de evento 127 (fragmento de 116 pb) fueron detectados en todas las diluciones examinadas en un rango de 0,05% a 100% de ADN de evento 127. Como era de esperar, no se detectaron bandas específicas de evento 127 en muestras de soja no transgénica o en los controles sin plantilla de ADN (NTC), aunque se mostró que todas las muestras de soja no transgénica presentan ADN amplificable mediante la presencia del amplicón esperado en una amplificación por PCR específica de soja. La menor cantidad de ADN de evento 127 en una muestra que puede detectarse de manera fiable utilizando los cebadores 127-61F y 127-176R es de 0,05%.

[00334] La PCR específica del evento utilizando cebadores 127-61F y 127-176R demuestra un límite de detección (*limit of detection* - LOD) relativo  $<0,1\%$  con 95% de confianza. Además, los cebadores 127-61F y 127-176R no amplifican productos de PCR detectables en las reacciones con referencia de evento 127 de 0% (100% de soja no transgénica) o de control sin plantilla.

[00335] A fin de evaluar la influencia de la variación de la temperatura de apareamiento en las reacciones de PCR, se analizaron cuatro muestras (0%, 0,05%, 1%, y 100% de ADN de evento de soja 127 diluidas en un fondo de ADN de soja Conquista no transgénico) por triplicado en experimentos con temperaturas de apareamiento de 54°C y 58°C. Los resultados demuestran que las temperaturas de apareamiento que se desvían de la temperatura de apareamiento óptima por  $\pm 2^\circ\text{C}$  dan como resultado una detección correcta del 100% de ADN específico de evento 127.

[00336] A fin de evaluar la influencia de las diferentes plataformas de PCR,

se analizaron tres muestras (0,05%, 1% y 100% de ADN de soja evento 127 diluido con un fondo de ADN de soja Conquista no transgénico) por triplicado utilizando un equipo ABI 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania). Se incluyeron como controles una muestra de evento 127 0% (100% de ADN de Conquista) y una muestra sin plantilla de ADN.

[00337] Los resultados demuestran buen rendimiento del ensayo de PCR específico de evento 127 usando cebadores 127-61F y 127-176R en diferentes instrumentos de PCR. El límite de detección relativo fue de 0,05% en las tres reacciones. Como era de esperar, no se detectaron productos de PCR en muestras que contienen ADN de evento 127 0% en un fondo de ADN de soja no transgénica o en controles sin plantilla.

[00338] A fin de evaluar la reproducibilidad del ensayo entre laboratorios (transferibilidad inter-laboratorio), se realizaron dos experimentos independientes en un laboratorio separado. Se analizaron diferentes muestras con un contenido de 0,05% a 100% de ADN de evento 127 en un fondo de ADN de soja no transgénica por duplicado en dos experimentos independientes usando 100 ng de ADN genómico por reacción en un termociclador de ADN Engine Dyad (BioRad, Munich, Alemania). Los resultados indican una buena reproducibilidad del ensayo entre laboratorios (transferibilidad inter-laboratorio). Los resultados demostraron 100% de resultados positivos con muestras de ADN de evento 127 100%, 1% y 0,5%. Además, se obtuvieron al menos 95% de resultados positivos con muestras de ADN de evento 127 0,1% y 0,05% (suponiendo que LOD relativo es  $\leq 0,05\%$ ), y no se obtuvieron resultados positivos en muestras de ADN de evento 127 0% o en los controles sin plantilla.

[00339] El método cualitativo de detección por PCR en gel, específico para un evento, que utiliza cebadores 127-61F y 127-176R es capaz de detectar la secuencia objetivo específica de evento 127 en una mezcla de 0,05% de ADN de evento 127 en un fondo de ADN de soja no transgénica. Ninguna de las muestras que contienen solamente ADN de soja no transgénica u otros eventos transgénicos generó un producto de PCR detectable, específico de evento 127, lo cual demuestra experimentalmente la especificidad del método.

#### Ejemplo 6: Aumento en la salud de las plantas utilizando Soja evento 127 con combinaciones de imidazolinonas y estrobilurinas

[00340] Las planta de soja evento 127 se trataron con (1) un herbicida o herbicidas imidazolinona, (2) un fungicida estrobilurina, y (3) una combinación de un herbicida o herbicidas imidazolinona junto con un fungicida estrobilurina.

[00341] Las plantas de soja evento 127 se cultivaron en macetas de 25 cm de diámetro con 5 plantas/maceta. Las diversas aplicaciones de herbicida(s) y/o fungicida (descritas a continuación en la Tabla 25) tuvieron lugar 23 días después de la siembra para los tratamientos 1-16 y 24 días después de la siembra para los tratamientos 17-32.

Tabla 25

| Nº de Tratamiento | Principios activos en el tratamiento                 | Tasa de aplicación del principio activo (gramos de principio activo/hectárea) |
|-------------------|------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| 1                 | Ninguno (control)                                    |                                                                               |
| 2                 | Piraclostrobina                                      | 50 g a/ha                                                                     |
| 3                 | Piraclostrobina                                      | 75 g a/ha                                                                     |
| 4                 | Piraclostrobina                                      | 150 g a/ha                                                                    |
| 5                 | Imazapir                                             | 36 g/ha                                                                       |
| 6                 | Imazapir                                             | 72 g a/ha                                                                     |
| 7                 | Imazapir                                             | 144 g a/ha                                                                    |
| 8                 | Imazapir<br>Piraclostrobina                          | 36 g a/ha<br>50 g a/ha                                                        |
| 9                 | Imazapir<br>Piraclostrobina                          | 36 g a/ha<br>75 g a/ha                                                        |
| 10                | Imazapir<br>Piraclostrobina                          | 36 g a/ha<br>150 g a/ha                                                       |
| 11                | Imazapir<br>Piraclostrobina                          | 72 g a/ha<br>50 g a/ha                                                        |
| 12                | Imazapir<br>Piraclostrobina                          | 72 g a/ha<br>75 g a/ha                                                        |
| 13                | Imazapir<br>Piraclostrobina                          | 72 g a/ha<br>150 g a/ha                                                       |
| 14                | Imazapir<br>Piraclostrobina                          | 144 g a/ha<br>150 g a/ha                                                      |
| 15                | Imazapir<br>Piraclostrobina                          | 144 g a/ha<br>75 g a/ha                                                       |
| 16                | Imazapir<br>Piraclostrobina                          | 144 g a/ha<br>150 g a/ha                                                      |
| 17                | Ninguno (control)                                    |                                                                               |
| 18                | Piraclostrobina                                      | 50 g a/ha                                                                     |
| 19                | Piraclostrobina                                      | 75 g a/ha                                                                     |
| 20                | Piraclostrobina                                      | 150 g a/ha                                                                    |
| 21                | Imazapic + Imazapir (1:3 en peso)                    | 35 g a/ha                                                                     |
| 22                | Imazapic + Imazapir (1:3 en peso)                    | 70 g a/ha                                                                     |
| 23                | Imazapic + Imazapir (1:3 en peso)                    | 140 g a/ha                                                                    |
| 24                | Imazapic + Imazapir (1:3 en peso)<br>Piraclostrobina | 35 g a/ha<br>50 g a/ha                                                        |
| 25                | Imazapic + Imazapir (1:3 en peso)<br>Piraclostrobina | 35 g a/ha<br>75 g a/ha                                                        |
| 26                | Imazapic + Imazapir (1:3 en peso)<br>Piraclostrobina | 35 g a/ha<br>150 g a/ha                                                       |

|    |                                                      |                          |
|----|------------------------------------------------------|--------------------------|
| 27 | Imazapic + Imazapir (1:3 en peso)<br>Piraclostrobina | 70 g a/ha<br>50 g a/ha   |
| 28 | Imazapic + Imazapir (1:3 en peso)<br>Piraclostrobina | 70 g a/ha<br>75 g a/ha   |
| 29 | Imazapic + Imazapir (1:3 en peso)<br>Piraclostrobina | 75 g a/ha<br>150 g a/ha  |
| 30 | Imazapic + Imazapir (1:3 en peso)<br>Piraclostrobina | 140 g a/ha<br>50 g a/ha  |
| 31 | Imazapic + Imazapir (1:3 en peso)<br>Piraclostrobina | 140 g a/ha<br>75 g a/ha  |
| 32 | Imazapic + Imazapir (1:3 en peso)<br>Piraclostrobina | 140 g a/ha<br>150 g a/ha |

[00342] A los 1, 7 y 14 días después de la aplicación (DDA), las plantas fueron evaluadas en cuanto a fitotoxicidad, vigor, altura de la planta, fotosíntesis relativa, SPAD relativo (es decir, una medida relativa de clorofila/verdor de las hojas) y conductancia estomática.

[00343] Como se muestra en la Tabla 26 a continuación, la adición de piraclostrobina a los tratamientos con imazapic o con imazapic más imazapir aumentó notablemente la fotosíntesis neta, incrementó el verdor global de la planta (SPAD relativo), y aumentó la conductancia estomática con respecto a ciertos tratamientos sin piraclostrobina en puntos de tiempo determinados.

Tabla 26

|                          | Tratamiento sin<br>Piraclostrobina (%<br>relativo) | Tratamiento relativo<br>con Piraclostrobina<br>(% relativo) |
|--------------------------|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| FOTOSÍNTESIS<br>RELATIVA |                                                    |                                                             |
| 1 DAA                    | 22 (38,5%)                                         | 27 (63,9%)                                                  |
|                          | 23 (44,1%)                                         | 30 (69,3%)                                                  |
| 7 DAA                    | 7 (74,7%)                                          | 14 (93,1%)                                                  |
|                          | 23 (69,9%)                                         | 31 (85,8%)<br>32 (86,1%)                                    |
| 14 DAA                   | 7 (85,1%)                                          | 14 (97,5%)                                                  |
| SPAD RELATIVO            |                                                    |                                                             |
| 1 DAA                    | 5 (89,6%)                                          | 9 (103,5%)<br>10 (106,1%)                                   |
|                          | 6 (89,4%)                                          | 11 (103,7%)<br>12 (109,5%)                                  |
|                          | 7 (98,5%)                                          | 14 (108,6%)<br>16 (124,8%)                                  |
|                          | 21 (78,1%)                                         | 24 (104,3%)<br>25 (83,5%)<br>26 (81,7%)                     |
|                          | 22 (74,9%)                                         | 27 (92,2%)<br>28 (86,5%)<br>29 (91,9%)                      |
| 14 DAA                   | 6 (66,9%)                                          | 11 (76,2%)                                                  |

|                                  |            |                                           |
|----------------------------------|------------|-------------------------------------------|
|                                  |            | 12 (72,5%)<br>13 (87,3%)                  |
|                                  | 21 (77,9%) | 24 (84,9%)<br>25 (89,4%)                  |
|                                  | 23 (87,9%) | 31 (97,3%)<br>32 (87,9%)                  |
| CONDUCTANCIA<br>ESTOMAL RELATIVA |            |                                           |
| 1 DAA                            | 23 (42,6%) | 30 (109,3%)<br>31 (86,9%)<br>32 (58,2%)   |
| 7 DAA                            | 7 (2,8%)   | 14 (31,3%)<br>15 (68,4%)<br>16 (38%)      |
| 14 DAA                           | 7 (102,3%) | 14 (104,5%)<br>15 (103,5%)<br>16 (103,2%) |

[00344] Esto indica que la combinación de piraclostrobina con un herbicida (o herbicidas) inhibidor de AHAS brinda un grado de beneficio sorprendente a las plantas de soja evento 127.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para el control de malezas en un área cultivada, caracterizado porque comprende:

la aplicación de una cantidad efectiva de un herbicida no selectivo al área cultivada que tiene una planta de soja que comprende una molécula de ácido nucleico de evento 127.

2. El método de la reivindicación 1, caracterizado porque la molécula de ácido nucleico de evento 127 comprende una molécula de ácido nucleico específica de un evento 127.

3. El método de la reivindicación 1, caracterizado porque la molécula de ácido nucleico de evento 127 comprende la secuencia de ácido nucleico de SEC ID NO: 1.

4. El método de la reivindicación 1, caracterizado porque el herbicida no selectivo comprende (A) un herbicida inhibidor de AHAS; (B) una combinación de herbicidas inhibidores de AHAS, o (C) una combinación de (A) o (B) con un herbicida seleccionado del grupo que consiste de herbicidas inhibidores de EPSPS, herbicidas inhibidores de GS, herbicidas inhibidores de PPO, herbicidas auxínicos, y combinaciones de los mismos.

5. El método de la reivindicación 4, caracterizado porque el herbicida inhibidor de AHAS es imazapir, imazapic, o cualquiera de las combinaciones de los mismos.

6. El método de la reivindicación 1, caracterizado porque las malezas son resistentes a glifosato.

7. Un método para el control de malezas tolerantes a glifosato en un campo de cultivo, caracterizado porque comprende:

la aplicación de una cantidad efectiva de un herbicida inhibidor de AHAS al campo de cultivo que tiene una planta de soja que comprende una molécula de ácido nucleico de evento 127.

~~8.~~ El método de la reivindicación 7, caracterizado porque la planta de soja comprende una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEC ID NO: 1. =3

~~9.~~ El método de la reivindicación 7, caracterizado porque la molécula de ácido nucleico de evento 127 comprende una molécula de ácido nucleico específica de un evento 127. =2

~~10.~~ El método de la reivindicación 7, caracterizado porque el herbicida inhibidor de AHAS es imazapir o imazapic.

11. Una molécula de ácido nucleico aislada caracterizado porque comprende la secuencia de ácido nucleico de las posiciones 1312 a 6069 de SEC ID NO: 1.

12. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 11, caracterizado porque la molécula de ácido nucleico es un constructo de ácido nucleico recombinante.

(13) Una planta de soja caracterizado porque comprende la molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 11.

(14) Una planta de soja transgénica caracterizado porque comprende una molécula de ácido nucleico heterólogo que comprende la secuencia de ácido nucleico de los nucleótidos 1302 a 6079 de SEC ID NO: 1.

(15) La planta de soja transgénica de la reivindicación 14, caracterizado porque la planta de soja es resistente a un herbicida inhibidor de AHAS.

~~16.~~ Un par aislado de cebadores de ácido nucleico caracterizado porque comprende:

una primera y una segunda molécula de ácido nucleico capaz de amplificar una molécula de ácido nucleico de evento 127.

17. El par aislado de cebadores de ácido nucleico de la reivindicación 16, caracterizado porque la primera molécula de ácido nucleico aislada es

seleccionada del grupo que consiste de SEC ID NOs: 37, 39, 41, 43 y 67.

18. El par aislado de cebadores de ácido nucleico de la reivindicación 16, caracterizado porque la segunda molécula de ácido nucleico aislada es seleccionada del grupo que consiste de SEC ID NOs: 38, 40, 42, 44 y 68.

19. El par aislado de cebadores de ácido nucleico de la reivindicación 16, caracterizado porque la primera molécula de ácido nucleico aislada comprende SEC ID NO: 41, y la segunda molécula de ácido nucleico aislada comprende SEC ID NO: 42.

20. El par aislado de cebadores de ácido nucleico de la reivindicación 19, caracterizado porque el par es capaz de amplificar una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de ácido nucleico de SEC ID NO: 1.

21. Un kit para la identificación de una molécula de ácido nucleico de evento 127 en una muestra biológica, caracterizado porque comprende: un primer y un segundo cebador de ácido nucleico, donde el primer y el segundo cebadores de ácido nucleico son capaces de amplificar una molécula de ácido nucleico de evento 127.

22. El kit de la reivindicación 21, caracterizado porque el primer y el segundo cebadores de ácido nucleico son capaces de amplificar una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEC ID NO: 1 o un fragmento de la misma.

23. Un método para la identificación de una planta de soja evento 127, caracterizado porque comprende:

(a) formar una mezcla que comprende una muestra biológica que contiene ADN de soja y un primer y un segundo ácido nucleico capaz de amplificar una molécula de ácido nucleico específica de un evento 127;

(b) hacer reaccionar la mezcla en condiciones que permiten que el primer y segundo cebadores de ácido nucleico amplifiquen una molécula de ácido nucleico específica de un evento 127, y

(c) detectar la presencia del fragmento amplificado de la molécula de ácido nucleico, donde la presencia de la molécula de ácido nucleico específica de soja

evento 127 indica que la planta de soja es una planta de soja evento 127.

24. Un método para la identificación de una planta de soja que tiene una molécula de ácido nucleico de evento 127, caracterizado porque comprende: = 23

(a) formar una mezcla que comprende una muestra biológica que contiene ADN de soja y una molécula de ácido nucleico sonda que es capaz de hibridizar con una molécula de ácido nucleico específica de un evento 127;

(b) hacer reaccionar la mezcla en condiciones que permiten que la molécula de ácido nucleico sonda hibridice con una molécula de ácido nucleico específica de un evento 127; y

(c) detectar la hibridización de la sonda con el ADN, donde la presencia de hibridización de la molécula de ácido nucleico sonda con el ADN de soja indica la presencia de una molécula de ácido nucleico de evento 127.

25. Un método para aumentar el rendimiento en una planta de soja = 2  
caracterizado porque comprende una molécula de ácido nucleico de evento 127; el método comprende:

aplicar una cantidad efectiva de un herbicida inhibidor de AHAS a una o más plantas de soja que comprenden una molécula de ácido nucleico evento 127 y al área circundante, donde el herbicida inhibidor de AHAS reduce el crecimiento de malezas en el área circundante; y

cosechar semillas de una o más plantas de soja.

26. Un método para cultivar una planta de soja resistente a un herbicida inhibidor de AHAS, caracterizado porque comprende:

(a) cruzar una planta de soja que comprende una molécula de ácido nucleico de evento 127 con una segunda planta de soja;

(b) obtener semillas de la cruce de la etapa (a);

(c) obtener una muestra de ADN de la semilla; y

(d) detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico de evento 127 en la muestra, donde la presencia de la molécula de ácido nucleico de evento 127 indica que la semilla es capaz de producir una planta de soja resistente a un herbicida inhibidor de AHAS.

(27) Una semilla de una planta de soja caracterizado porque comprende una molécula de ácido nucleico de evento 127.

(28.) La semilla de la reivindicación 27, caracterizado porque la molécula de ácido nucleico de evento 127 comprende la secuencia de ácido nucleico de SEC ID NO: 1.

(29.) La semilla de la reivindicación 28, caracterizado porque una muestra representativa de semilla que comprende una molécula de ácido nucleico de evento 127 fue depositada bajo el N° de Acceso de NCIMB 41603.

(30.) Una planta de soja, o parte de la misma, producido por crecimiento de la semilla de la reivindicación 27.

31. Un método para detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico de evento 127 en una muestra biológica, caracterizado porque comprende: = 23 = 24

(a) formar una mezcla que comprende una muestra biológica que contiene ADN y un primer y un segundo cebador de ácido nucleico capaz de amplificar una molécula de ácido nucleico específica de un evento 127;

(b) hacer reaccionar la mezcla en condiciones que permiten que el primer y el segundo cebadores de ácido nucleico amplifiquen la molécula de ácido nucleico que comprende una molécula de ácido nucleico específica de un evento 127; y

(c) detectar la presencia de la molécula de ácido nucleico amplificada, donde la presencia de la molécula de ácido nucleico específica de un evento 127 indica que la muestra contiene una molécula de ácido nucleico de evento 127.

32. El método de la reivindicación 31, caracterizado porque la muestra biológica se obtiene de una planta de soja.

33. Un método para la detección de una molécula de ácido nucleico de evento 127 en una muestra biológica caracterizado porque comprende: = 23 y 24

(a) formar una mezcla que comprende una muestra biológica que contiene ADN y una sonda de ácido nucleico capaz de hibridizar con una molécula de ácido nucleico específica de un evento 127;

(b) hacer reaccionar la mezcla en condiciones que permiten que la sonda hibridice con una molécula de ácido nucleico específica de un evento 127; y

(c) detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico hibridizada,

donde la presencia de una molécula de ácido nucleico específica de un evento 127 indica que la muestra contiene una molécula de ácido nucleico de evento 127.

34. El método de la reivindicación 33, caracterizado porque la muestra biológica se obtiene de una planta de soja.

(35) Un método para el cultivo de una planta de soja, caracterizado porque comprende:

(A) proporcionar una semilla de soja que comprende una molécula de ácido nucleico de evento 127;

(B) sembrar la semilla de soja en un medio de cultivo bajo condiciones que permiten que la semilla germine para producir una planta de soja en crecimiento que comprende una molécula de ácido nucleico de evento 127; y

(C) poner en contacto el medio de cultivo, semilla o planta con una composición herbicida que comprende al menos un componente seleccionado del grupo que consiste de herbicidas imidazolinona, herbicidas sulfonilureas, combinaciones de los mismos entre sí, y combinaciones de los mismos con al menos otro principio activo.

36. El método de la reivindicación 35, caracterizado porque la etapa (C) se realiza antes de la etapa (B) y comprende poner en contacto el medio de cultivo con la composición herbicida.

37. El método de la reivindicación 35, caracterizado porque la etapa (C) se realiza después de la etapa (B) y comprende poner en contacto la planta o el medio de cultivo después de que la planta ha emergido del medio de cultivo.

38. El método de la reivindicación 35, caracterizado porque la composición herbicida comprende una combinación de (1) al menos un herbicida imidazolinona, o al menos un herbicida sulfamida, o ambos, con (2) al menos otro principio activo que es seleccionado del grupo que consiste de fungicidas, bactericidas, herbicidas organofosforados, herbicidas sulfamida, herbicidas benztiazinona, y combinaciones de los mismos.

39. El método de la reivindicación 35, caracterizado porque la composición herbicida comprende imazapir, imazapic, o cualquiera de los siguientes:

- (A) combinaciones de imazapir e imazapic;
- (B) combinaciones de imazapir, imazapic y bentazón;
- (C) combinaciones de imazapir, imazapic y piraclostrobina;
- (D) combinaciones de imazapir, imazapic y saflufenacilo;
- (E) combinaciones de imazapir, imazapic, saflufenacilo y glifosato;
- (F) combinaciones de imazapir y bentazón;
- (G) combinaciones de imazapir y piraclostrobina;
- (H) combinaciones de imazapir y saflufenacilo;
- (I) combinaciones de imazapir, saflufenacilo y glifosato;
- (J) combinaciones de imazapir y glifosato;
- (K) combinaciones de imazapic y glifosato;
- (L) combinaciones de imazapic, saflufenacilo y glifosato, y
- (M) combinaciones de saflufenacilo y glifosato.

40. El método de la reivindicación 35, caracterizado porque la molécula de ácido nucleico de evento 127 tiene la secuencia de ácidos nucleicos de los nucleótidos 1302 a 6069 de SEC ID NO: 1.

41. Un método de detección de un polipéptido de evento 127 en una muestra, caracterizado porque comprende:

la obtención de una muestra biológica de una planta de soja, y

la realización de al menos un ensayo inmunológico en la muestra, donde el ensayo es capaz de detectar un polipéptido de evento 127.

42. El método de la reivindicación 41, caracterizado porque el ensayo inmunológico es seleccionado del grupo que consiste de ELISA (ensayos de inmunoabsorbente unido a enzimas), ensayos de inmunotinción, ensayos de inmuno-histoquímica, ensayos de chips de proteínas, ensayos de radioinmuno-precipitación, ensayos inmunocromatográficos rápidos con membrana, ensayos inmunocromatográficos rápidos con varilla, y combinaciones de los mismos.

43. Un dispositivo para usar en la detección de moléculas biológicas, caracterizado porque comprende:

un soporte sólido que tiene una superficie; y

al menos una molécula diagnóstica de evento 127 unida a la superficie del soporte sólido.

44. El dispositivo de la reivindicación 43, caracterizado porque el soporte sólido es (A) seleccionado del grupo que consiste de vidrios, geles, polímeros, plásticos, gomas, cerámicas, metales, y combinaciones de los mismos, o es (B) seleccionado del grupo que consiste de placas, chips, membranas, barras, varillas, cuentas, fibras, alfombrillas, entramados, telas, paredes de vasos, y combinaciones de los mismos, o es (C) seleccionado de (A) y (B).

45. El dispositivo de la reivindicación 43, caracterizado porque las moléculas diagnósticas de evento 127 se seleccionan del grupo que consiste de sondas de oligómeros de nucleobases, aptámeros, anticuerpos, y combinaciones de los mismos.

46. El dispositivo de la reivindicación 45, caracterizado porque las sondas de oligómeros de bases de nucleosos comprenden análogos de ácido nucleico.

47. El dispositivo de la reivindicación 45, caracterizado porque el anticuerpo es seleccionado del grupo que consiste de anticuerpos monoclonales, anticuerpos de una sola cadena, y fragmentos de anticuerpos inmunorreactivos que conservan especificidad de unión para un polipéptido de evento 127.

48. El dispositivo de la reivindicación 43, caracterizado porque las moléculas diagnósticas son inmovilizadas por un método seleccionado entre unión covalente, coordinada y no covalente a la superficie.

49. El dispositivo de la reivindicación 43, caracterizado porque el sustrato comprende una tira inmunocromatográfica.

50. El dispositivo de la reivindicación 43, caracterizado porque el dispositivo comprende un arreglo de una pluralidad de zonas definidas; cada zona comprende: (a) una porción de la superficie del soporte sólido y unida a la misma (b) al menos una molécula diagnóstica de evento 127.

51. El dispositivo de la reivindicación 43, caracterizado porque la molécula diagnóstica de evento 127 es seleccionada del grupo que consiste de moléculas de ácido nucleico de evento 127, polipéptidos de evento 127, anticuerpos

específicos para los mismos, formas marcadas detectables de los anteriores, derivados de cualquiera de estos, y combinaciones de los mismos.

52. El método de la reivindicación 1, caracterizado porque el método comprende además la aplicación de una estrobilurina al área cultivada.

53. El método de la reivindicación 52, caracterizado porque la estrobilurina comprende piraclostrobina.

54. El método de la reivindicación 7, caracterizado porque el método comprende además la aplicación de una estrobilurina al área cultivada.

## RESUMEN

Se proporcionan composiciones y métodos relacionados con plantas de soja transgénicas resistentes a herbicidas inhibidores de AHAS. Las plantas de soja evento 127 tienen una secuencia de codificación de AHAS mutada que confiere tolerancia a un herbicida inhibidor de AHAS. Las plantas de soja evento 127 que tienen la molécula de ácido nucleico de evento 127 en la ubicación cromosómica identificada pueden comprender uniones genómicas/del transgenes que tienen al menos la secuencia de ácido nucleico de SEC ID NOs: 5 y/o 6. La caracterización del sitio de inserción genómica del evento 127 proporciona una mayor eficiencia del cultivo y permite el uso de marcadores moleculares para seguir la inserción de transgenes en las poblaciones de cultivo y la progenie de las mismas. Se proporcionan diversos métodos y composiciones para la identificación, detección y utilización de plantas de soja evento 127.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> BASF AGROCHEMICAL PRODUCTS B.V.  
 EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA - EMBRAPA

<120> **SOJA EVENTO 127 Y MÉTODOS RELACIONADOS CON LA MISMA**

<130> 13783-58

<140>  
 <141>

<150> 61/143,049  
 <151> 2009-01-07

<160> 70

<170> Patente en versión 3.5

<210> 1  
 <211> 10656  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial:  
 Polinucleótido Sintético"

<400> 1

|             |            |            |            |            |
|-------------|------------|------------|------------|------------|
| gtgagactcc  | aacagcaaga | gtcactttgt | agcccactca | aataaatgtg |
| aacattaata  | 60         |            |            |            |
| ggtggatttg  | gacaatacag | gccccttggt | ttaacaaggt | cttgcagttt |
| cacttaaaaa  | 120        |            |            |            |
| ttcatagtag  | ttagaagaac | taatattatg | tgccaactga | caataaaaga |
| aaaaacaatc  | 180        |            |            |            |
| tttccaattt  | atattacaca | taagacacag | cctgaaaaaa | gaagagagca |
| tgtatctgta  | 240        |            |            |            |
| aacaagttag  | gcatgatgcc | aaaggagcag | cagcataaca | aaacaaacga |
| aaattacaag  | 300        |            |            |            |
| aaaatatggc  | ttaccagcat | ggttgctggg | aaggactgga | tcaagaagtg |
| agcggcaatc  | 360        |            |            |            |
| aacaagtgtt  | actacagcat | acttttctct | ttgataatca | ggaaggcatc |
| tagaggtcca  | 420        |            |            |            |
| tgcagcaatc  | attccagctg | cagcaagtgc | cccacaaagt | ttgatccctc |
| ttgatattgca | 480        |            |            |            |

|                           |                    |            |            |            |
|---------------------------|--------------------|------------|------------|------------|
| tccctacatg<br>gatcataagc  | atcttgcata<br>540  | attagcttaa | acccatcaag | ctagctacca |
| aaaaagtgag<br>cacattggat  | cagagtgcca<br>600  | tatcaattat | tcacagaaat | tagattataa |
| gcataagaat<br>atgtgacatt  | gaatttcaat<br>660  | tacaaatagc | cagagacaaa | aaagaagata |
| gaggctgctt<br>aattggctgc  | tgtaccagga<br>720  | aaaataatag | cagctgatat | tattagttat |
| aaattttctcc<br>gataaatcca | aaattgtaaa<br>780  | tatgaatttc | attaatcact | ttatttagct |
| attgatatta<br>acacaaactc  | taaagagttt<br>840  | ggatcaaacc | atagggctgt | gacctgtgaa |
| ctcattcgta<br>ttattgacta  | ttagaggctc<br>900  | taccctccta | atagctttgg | ctttactgtc |
| tctttgtaaa<br>taagtttatc  | tgtcttacia<br>960  | agactaatga | cttctccaca | atgtgccaat |
| ttttttgaaa<br>gtttaggctt  | aataaatggc<br>1020 | tggtatcttc | atcccttaag | aaaataggaa |
| gaaaatagag<br>aagttgcatc  | attgcaatag<br>1080 | gcaagattaa | tttagggcgt | gtttgggaaa |
| caacattctc<br>ggaaagcgca  | tttaattcag<br>1140 | tacaagagct | ccttcgccgt | ttagtgtata |
| aactgatgtt<br>ttaagctga   | tggaagcttg<br>1200 | aaacggcaat | aaaatatcaa | aatctttata |
| acaaaagggg<br>tctaataaag  | ccctccttat<br>1260 | ttatcccctt | agtttttatt | ttcatttctt |
| gggcaaacta<br>caaataaaac  | gtctcgtaat<br>1320 | atattagagg | ttaattaaat | ttatattcct |
| ccaattttca<br>attccgatct  | tccttaaacg<br>1380 | aacctgctga | aaccctaatt | tcgattacca |
| aaaaagaagt<br>ttcgctaaga  | catggaagcc<br>1440 | attgattccg | caatcgatcc | tctcagagat |
| gcagtgttcg<br>gccttttctc  | tctcgtccag<br>1500 | cgctgtcaca | aaccgatcg  | caagggtaac |
| aaaaaaatct<br>ttttgatatc  | catttccgat<br>1560 | ttttgatctg | tagattaggg | ttttctgaaa |

|                           |                    |             |             |            |
|---------------------------|--------------------|-------------|-------------|------------|
| atttgtaatt<br>gcgattggat  | gaattggtta<br>1620 | tcagaattca  | cgaaagtagc  | tgtgcgtacg |
| ttgtggtgat<br>atcaacaaca  | gggattcgtt<br>1680 | ggattccttcg | tgaagctcgt  | tttcatccca |
| tcatcgttgg<br>tcgcattata  | atcttcttag<br>1740 | tgtagtactt  | tctttacgag  | gtaattgatc |
| tatctacatt<br>tctgttaatt  | ttggttatgt<br>1800 | tacttgacat  | atagtcattg  | attcaatagt |
| cctttaaaga<br>atttgtaatc  | tcattttgac<br>1860 | tagaccacat  | tcttggttca  | ttcctcaata |
| atattgggtg<br>tttaggatga  | atatagaagt<br>1920 | agattggtta  | tagatcagat  | agtggaagac |
| atttcagcta<br>tgctgtctcc  | gttttttttt<br>1980 | ttggcttatt  | gtctcaaaag  | attagtgcct |
| attgcttctg<br>tattcgctccc | ctatcgacac<br>2040 | gcttctgtct  | ccttgatatct | ttattatatc |
| atgagttttg<br>ctctgttcca  | tttgttctgt<br>2100 | attcgttcgc  | tctgggtgtca | tggatggagt |
| tgtttctgta<br>acactcattt  | atgcatgttg<br>2160 | ggttgtttca  | tgcaagaaat  | gctgagataa |
| gtgaaagttt<br>aggaggagaa  | ctaaactctg<br>2220 | aatcgcgcta  | caggcaatgc  | tccgaggagt |
| gaacgaacca<br>tattgttttt  | aacgacatta<br>2280 | tcagcccttt  | gaggaagctc  | ttagttttgt |
| gtagccaaat<br>atagacctta  | tctccattct<br>2340 | tattccattt  | tcacttatct  | cttgttcctt |
| taagtttttt<br>taaaatctaa  | attcatgtat<br>2400 | acaaattata  | ttgtcatcaa  | gaagtatctt |
| atctcaaadc<br>cagcttgtat  | accaggacta<br>2460 | tgtttttgtc  | caattcgtgg  | aaccaacttg |
| ccattctctt<br>ctcagccaca  | aaccaataaa<br>2520 | aaaagaaaga  | aagatcaatt  | tgataaattt |
| aattctacat<br>agatagacta  | ttaggtttta<br>2580 | gcataatcgaa | ggctcaatca  | caaatacaat |
| gagattccag<br>aatcccgag   | cgtcacgtga<br>2640 | gttttatcta  | taaataaagg  | acaaaaaatc |

|                           |                    |             |            |            |
|---------------------------|--------------------|-------------|------------|------------|
| ggcatttttcg<br>aaacaaatca | taatccaaca<br>2700 | taaaaccctt  | aaacttcaag | tctcattttt |
| tgttcacaag<br>tctcctgaac  | tctcttcttc<br>2760 | ttctctgttt  | ctctatctct | tgctcatctt |
| catggcgggc<br>ccaccaaacc  | gcaacaacaa<br>2820 | caacaacaac  | atcttcttcg | atctccttct |
| atctccttcc<br>cattctccct  | tcctccaaat<br>2880 | caccattacc  | aatctccaga | ttctccctcc |
| aaacccaac<br>gctctccctc   | aatcatcct<br>2940  | cctcctcccg  | ccgccgcggt | atcaaatcca |
| ctccatctcc<br>ctccaaccaa  | gccgtgctca<br>3000 | acacaaccac  | caatgtcaca | accactccct |
| acctaccaaa<br>gcaaaggcgc  | cccgaaacat<br>3060 | tcctctcccg  | attcgctcca | gatcaacccc |
| tgatatcctc<br>cttaccctgg  | gtcgaagctt<br>3120 | tagaacgtca  | aggcgtagaa | accgtattcg |
| aggtgcatca<br>gtaacgtcct  | atggagattc<br>3180 | accaagcctt  | aaccgcgtct | tcctcaatcc |
| tcctcgtcac<br>cctcaggtaa  | gaacaaggag<br>3240 | gtgtattcgc  | agcagaagga | tacgctcgat |
| accaggtatc<br>gcggattagc  | tgtatagcca<br>3300 | cttcagggtcc | cggagctaca | aatctcgtta |
| cgatgcgttg<br>ctcgtcgtat  | ttagatagtg<br>3360 | ttcctcttgt  | agcaatcaca | ggacaagtcc |
| gattggtaca<br>cgattacgaa  | gatgcgtttc<br>3420 | aagagactcc  | gattggtgag | gtaacgcgtt |
| gcataactat<br>aagctttctt  | cttgtgatgg<br>3480 | atggtgaaga  | tatccctagg | attattgagg |
| tttagctact<br>atattcaaca  | tctggtagac<br>3540 | ctggacctgt  | tttggttgat | gttcctaaag |
| acagcttgcg<br>tgtctaggat  | attcctaatt<br>3600 | gggaacaggc  | tatgaaatta | cctggttata |
| gcctaaacct<br>ctgagtctaa  | ccggaagatt<br>3660 | ctcatttgga  | gcagattggt | aggttgattt |
| gaagcctgtg<br>tgggtaggtt  | ttgtatgttg<br>3720 | gtggtggttg  | tttgaattct | agcgatgaat |

|                          |                     |            |            |            |
|--------------------------|---------------------|------------|------------|------------|
| tgttgagctt<br>cttatccttg | acgggggatcc<br>3780 | ctgttgcgag | tacgttgatg | gggctgggat |
| tgatgatgag<br>caaattacgc | ttgtcgttac<br>3840  | atatgcttgg | aatgcatggg | actgtgtatg |
| tgtggagcat<br>gtgtcacggg | agtgatttgt<br>3900  | tgttggcggt | tggggtaagg | tttgatgatc |
| taagcttgag<br>actcggctga | gcttttgcta<br>3960  | gtagggctaa | gattgttcat | attgatattg |
| gattgggaag<br>tggctttgca | aataagactc<br>4020  | ctcatgtgtc | tgtgtgtggg | gatgttaagc |
| agggatgaat<br>ttggagtttg | aaggttcttg<br>4080  | agaaccgagc | ggaggagctt | aagcttgatt |
| gaggaatgag<br>cgtttgggga | ttgaacgtac<br>4140  | agaaacagaa | gtttccggtg | agctttaaga |
| agctattcct<br>gaaaagccat | ccacagtatg<br>4200  | cgattaaggt | ccttgatgag | ttgactgatg |
| aataagtact<br>attacaagaa | ggtgtcgggc<br>4260  | aacatcaa   | gtgggcggcg | cagttctaca |
| accaaggcag<br>ttcctgctgc | tggctatcat<br>4320  | caggaggcct | tggagctatg | ggatttggac |
| gattggagcg<br>gagatggaag | tctgttgcta<br>4380  | accctgatgc | gatagttgtg | gatattgacg |
| ctttataatg<br>cagtgaaggt | aatgtgcaag<br>4440  | agctagccac | tattcgtgta | gagaatcttc |
| acttttatta<br>ggttctacaa | aacaaccagc<br>4500  | atcttggcat | ggttatgcaa | tgggaagatc |
| agctaaccga<br>tattcccga  | gctcacacat<br>4560  | ttctcgggga | tccggctcag | gaggacgaga |
| catgttgctg<br>agaaagcaga | tttgcagcag<br>4620  | cttgcgggat | tccagcggcg | agggtgacaa |
| tctccgagaa<br>tggatgtgat | gctattcaga<br>4680  | caatgctgga | tacaccagga | ccttacctgt |
| ttgtccgcac<br>tcaacgatgt | caagaacatg<br>4740  | tgttgccgat | gatcccgaat | ggtggcactt |
| cataacggaa<br>ttatcagaac | ggagatggcc<br>4800  | ggattaaata | ctgagagatg | aaaccggtga |

|                           |                    |            |             |            |
|---------------------------|--------------------|------------|-------------|------------|
| cttttatggt<br>ctgtttgttt  | ctttgtatgc<br>4860 | atatggtaaa | aaaacttagt  | ttgcaatttc |
| tggttaatttg<br>gtcagactac | agtttctttt<br>4920 | agttgttgat | ctgcctgctt  | tttggtttac |
| tactgctgtt<br>ccggttcggt  | gttgtttggt<br>4980 | ttcctttctt | tcattttata  | aataaataat |
| ttactccttg<br>attgagtaat  | tgactggctc<br>5040 | agtttggtta | ttgcgaaatg  | caaatggtaa |
| tgaaattcgt<br>atctctcgaa  | tattagggtt<br>5100 | ctaacctggt | ttaacagtca  | ctgggttaat |
| tcttgcatgg<br>tatgggccgt  | aaaatgctct<br>5160 | taccattggg | ttttaattga  | aatgtgctca |
| ggtttccaaa<br>gtgtccacat  | ttaaataaaa<br>5220 | ctacgatgtc | atcgagaagt  | aaaatcaact |
| tatcagtttt<br>tatgcctttt  | gtgtatacga<br>5280 | tgaaataggg | taattcaaaa  | tctagcttga |
| ggttcatttt<br>tccccaaaa   | aaccttctgt<br>5340 | aaacattttt | tcagattttg  | aacaagtaaa |
| aaaaaaaaaa<br>gcttaaaaca  | atctcaactc<br>5400 | aacactaaat | tatttttaatg | tataaaagat |
| tttggtttaa<br>agtatgaaaa  | aagaaagaag<br>5460 | ctaaaaacat | agagaactct  | tgtaaattga |
| tatactgaat<br>tccccaaagg  | tgggtattat<br>5520 | atgaattttt | ctgatttagg  | attcacatga |
| aatccagaa<br>tttttttttt   | gcactaatca<br>5580 | gacattggaa | gtaggaatat  | ttcaaaaagt |
| taagtaagtg<br>gttgtaaatt  | acaaaagctt<br>5640 | ttaaaaaata | gaaaagaaac  | tagtattaaa |
| taataaacia<br>agggatctta  | aagaaatttt<br>5700 | ttatatTTTT | tcattttcttt | ttccagcatg |
| tccttgatgat<br>tgtatgcaaa | gatgagttgt<br>5760 | cgttacatat | gcttggaatg  | catgggactg |
| ttacgctgtg<br>atgatcgtgt  | gagcatagtg<br>5820 | atgtgttggt | ggcgtttgga  | gtaagggttg |
| cacgggtaag<br>atattgactc  | cttgaggctt<br>5880 | ttgctagtag | ggctaagatt  | gttcatattg |

|                          |                     |            |            |            |
|--------------------------|---------------------|------------|------------|------------|
| ggctgagatt<br>ttaagctggc | gggaagaata<br>5940  | agactcctca | tgtgtctgtg | tgtggtgatg |
| tttgcaaggg<br>ttgattttgg | atgaataagg<br>6000  | ttcttgagaa | ccgagcggag | gagcttaagc |
| agtttggagg<br>ttaagacgtt | aatgagttga<br>6060  | acgtacagaa | acagaagttt | ccgttgagct |
| tggggaagct<br>acgaatgggt | gtcccatgcc<br>6120  | catcaaagaa | gacagtacac | gatccgagct |
| aggcccaata<br>taacacaaaa | aggcgagaag<br>6180  | ggccacccag | tccaatgagg | gaagacaaac |
| tacccatcta<br>aaattcaaac | ataaggacct<br>6240  | ataagtttgt | atTTTTTaaa | tgtatttgaa |
| aatttttaat<br>tagaagcaaa | tgттаatttt<br>6300  | ttttcctaaa | attaaacaaa | catatttttg |
| gatatcataa<br>tccaaaataa | tgTTTTgatg<br>6360  | atgctaaaga | aacacgcttc | tcaagtttga |
| aactctaaga<br>aaagaagttt | aattcaagat<br>6420  | aaatgataaa | gttagtctat | agagtcttag |
| ctaaattgat<br>ttaaagaga  | gatgcataag<br>6480  | ttatgaccaa | aggTTTTttc | tcaaaagctt |
| tatttattct<br>gctttaaaat | ctgataatca<br>6540  | attactagtg | acaaaaatgt | ttactggaat |
| gtttttaata<br>attaccaaaa | ttttgaaagc<br>6600  | ttgtaatcga | ttacacaaga | cttgtaatcg |
| gttttgaaca<br>gtctgtaatc | ttttaagaca<br>6660  | acctttagaa | atttgaattt | aaatttcaaa |
| gattaccaga<br>cagaaaacaa | attaaaatta<br>6720  | aaattttaga | tgtgaagagt | caaaagtctt |
| ttgtgtaatc<br>tctaaaatat | gattacacca<br>6780  | ttttggtaat | cgattaccac | tgagaaattt |
| ctccgaacag<br>tatatataag | ttacatcttt<br>6840  | tcaaatgatt | ttgaatgacc | attaaaggct |
| tgacttggga<br>tcctctcaaa | catgaatttt<br>6900  | cagagagttt | ttctgaactg | aaatgtttta |
| aatgattcct<br>tcttcaattg | tggctctaaca<br>6960 | cttgcatatt | taataaagaa | tcttgattga |

|                          |                     |             |             |            |
|--------------------------|---------------------|-------------|-------------|------------|
| taatatcctt<br>aaattgttta | cttttaaaga<br>7020  | gagaaacttc  | ttctttcttct | tattcaaagg |
| agagaccgag<br>attatccttg | gatctcttaa<br>7080  | atggtaagga  | ttcctgaaca  | caatggaagg |
| tgtgattcag<br>caagtgggtt | actttgtaaa<br>7140  | aggggttttt  | acaaagagag  | tggaaaatct |
| gcttgagtga<br>attaagttta | ggacttgacg<br>7200  | taggcatgaa  | aaatggctga  | accagtataa |
| catttctctc<br>ttttaaaaaa | ttcccttaac<br>7260  | cttctttttat | ttattgttat  | ttatctttta |
| gtttattttg<br>attcaaaaaa | aattgtcttt<br>7320  | tgagtaattc  | atattaatgg  | tgcattgtta |
| agagtggaat<br>ttttcttaag | tttaattgag<br>7380  | aaatagtttt  | tgtatcttaa  | ttcaatcccc |
| ataactgaga<br>tttttttagt | tcacttgtct<br>7440  | aacaattttg  | tgtataatta  | cattcaataa |
| taatatctta<br>ataatttatt | aatatataaa<br>7500  | ttccaaactc  | ttgaaattaa  | aaaaatatgc |
| taataaattt<br>aaaaagttaa | aaatttttagg<br>7560 | aaaaaaagtt  | aaggggtcat  | taaatttgat |
| gaatattatt<br>aaaagttttt | gaattttata<br>7620  | attttttttta | tagaaaatag  | tgaaaacaat |
| ttctatttct<br>gacattttta | taacaaccct<br>7680  | ttcaataaaa  | aatgaaatg   | aaaataatat |
| taattaagag<br>tcataagcat | taatataaaa<br>7740  | ataaaaataaa | ataattttta  | accaaaggac |
| gttattgctc<br>ataaaatatt | taccactcat<br>7800  | aaaaattttt  | ctcctattat  | ctttttgatg |
| gtcatactag<br>tcttatttta | aaataaaata<br>7860  | tatttttttct | atatacctcta | tatgagtcaa |
| agtacaatgt<br>tcccaaacia | tactgaaagt<br>7920  | cattttgcaa  | taaaaatctt  | ccaagatttt |
| ttgttgtaat<br>tatggtataa | tttagttctt<br>7980  | taaaatatac  | atataaaaaat | gcattatttg |
| tataaataat<br>aaagtaaatt | agaaacaata<br>8040  | tcaacatttc  | tcattgagta  | ttgagaagct |

|                            |                     |            |             |             |
|----------------------------|---------------------|------------|-------------|-------------|
| acttgactac<br>acttaagtag   | attgccgtag<br>8100  | tgcgacgaat | tagattgtaa  | tatctaaaat  |
| tgtagataag<br>ttaattctac   | tctatgaatg<br>8160  | tttttcagat | taattgcacg  | ataatttttt  |
| tataattcca<br>ttattacatt   | tattttatttg<br>8220 | aaaaacttca | tgataacatg  | catcctttat  |
| aacctttctta<br>taatcttttaa | aatatattcaa<br>8280 | atatcacggt | tcactgcaag  | aaaagtttta  |
| taagcttcat<br>ccaatgtcct   | acatgctcgt<br>8340  | accttcccac | aataagccaa  | tttgggtctg  |
| cactcttgaa<br>aaaaatttaa   | aaaggaaaat<br>8400  | ataaacctca | aagtgatcat  | gtgatatgat  |
| aaatatataa<br>agtgaaatgt   | attcatagag<br>8460  | aaaaaaagga | atgaaaatga  | attgtaagaa  |
| atgaaaatct<br>aaaacgagca   | gaactcattc<br>8520  | aaaatcatat | aagaaaataa  | accgtggaag  |
| tcacattcac<br>agatatagca   | ataacatggt<br>8580  | ctgctccaac | actaattatt  | ctgctaccgc  |
| accagagtgg<br>actccatcta   | ccatttttatt<br>8640 | acatttgtat | cgatccatgc  | atttacgtac  |
| gctaaacatc<br>gaatgtcagc   | atatcactac<br>8700  | taacatgaca | caaaataagg  | aaaaaactca  |
| ttgaagttta<br>tttataataa   | atagatttcc<br>8760  | tcctttaata | acattttaaat | atgattttatt |
| aaatatcttt<br>ggaattgata   | aaaaatatatt<br>8820 | atttagtagt | tatttttagc  | ataaatatta  |
| cttttcttat<br>gaaaatccaa   | ttatgacttg<br>8880  | cagatataaa | aatgaagaat  | taaaagtaaa  |
| aaaatatcaa<br>tcattccaac   | aatataaat<br>8940   | aaggaagatt | ttttggcgtc  | agaccaagt   |
| agctgtaatt<br>gtaagaaagg   | ttttcagatt<br>9000  | aaaaaggatg | aatgatgaat  | gaaattaaaa  |
| aataaagaca<br>agaactctcc   | caccgagtct<br>9060  | cggagcaatc | taatacacac  | ctaaagcctg  |
| cttaggaaat<br>ctcttctctt   | tccttcttct<br>9120  | ctttcatcat | tcctttatttc | ctttttccat  |

|                          |                     |            |             |             |
|--------------------------|---------------------|------------|-------------|-------------|
| ccatcagttc<br>gaggctaaac | gtatatccct<br>9180  | ttgctagtgt | aaaaccctt   | atggttatga  |
| ccttagttag<br>ttcatattta | ggtttgacag<br>9240  | gcttaaaaag | tcaaaagatg  | tattatacac  |
| tcaatgcaaa<br>tcatgcatca | cagatgtttt<br>9300  | ctttcctatt | atccttttctt | atttctaatt  |
| ttcatccttg<br>caaagaaggt | cattatcttt<br>9360  | gggggttagg | tgctcgacaa  | aggataatcc  |
| tttgcattga<br>aataaaacta | tctatttcag<br>9420  | gaattagtcg | ctcgacagag  | agtaatttct  |
| aaaagaagaa<br>ttatgcccac | atatcttaac<br>9480  | aaaatcattg | ttagacataa  | aatgattgta  |
| gcatcaaagc<br>ctctttgcaa | aaacatatag<br>9540  | aattataact | tcatgtattt  | tatctattgg  |
| aaacattttg<br>atagatgtga | aagatagata<br>9600  | ggtaaaatag | gtgagacatc  | aggtatttta  |
| gtaagataaa<br>aaataagaca | ttcacctgat<br>9660  | agagaaaatc | ataaataata  | tatcttagac  |
| tgctaggtcc<br>ttatttagta | taacattttc<br>9720  | atcccattga | attcactatt  | ttttcttttg  |
| ataattatta<br>cttatatttt | ttttatactc<br>9780  | tgttctttta | aaattatctt  | ttataacctat |
| tctcttataa<br>tcgacactca | attaaaaatt<br>9840  | atccaacaca | aatacaaaac  | aaagttaaaa  |
| agacttccga<br>ctgctccatt | gtttttgatc<br>9900  | aaaaagcctt | tctatctttc  | ctcttgcggt  |
| ttagaagaaa<br>aaaaatttac | aggaaccaat<br>9960  | taataaaatg | gacagcgcaa  | tcaaataagt  |
| ttaatataat<br>atcaataacg | gatgcatgat<br>10020 | agctagaagg | gtaccaataa  | tttaaccctg  |
| tcaatagaga<br>gaaaaccccg | ctctcccaa<br>10080  | accccaaatt | agggtatcgc  | tgatccttat  |
| aaataaataa<br>gtggaagcgc | attgaaagga<br>10140 | accctaaacg | cgaaacccta  | tatttgcac   |
| agaaaacttc<br>gatcatccat | actgagataa<br>10200 | atgaagtcgg | atagaacata  | gattctcgta  |

|                          |                     |             |            |             |
|--------------------------|---------------------|-------------|------------|-------------|
| cacaaaccct<br>gagtggtaga | aaaagaagta<br>10260 | ttagatttttc | gcgttcggag | aaacaaacct  |
| aacgaagctt<br>aaataaggct | gatttggttg<br>10320 | aacgattggt  | gagagaaaga | acagagagca  |
| tctattttct<br>ttatttataa | taatcaaacg<br>10380 | ttggtgtttg  | ttgccaatgt | tgtgtttaggc |
| tttctctggt<br>ttttttttat | agcttgtaaa<br>10440 | gcacgcaaca  | ataagatgag | atataggatt  |
| tttaaaaaaa<br>aaaagatagt | aagacatttg<br>10500 | ccgtcatata  | aggataaatt | aaggcttaaa  |
| tattttcttt<br>gtttgaattt | aaaaaaataa<br>10560 | ttattttctga | aatttaatat | tttgaagata  |
| acttatgaaa<br>gtgggaagtt | atatttgttt<br>10620 | tgagtttcaa  | tttataaaat | catttctagt  |
| acatttcggt<br>10656      | tggattagaa          | attttaaaat  | tctaga     |             |

<210> 2  
 <211> 1311  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial:  
 polinucleótido Sintético"

|                          |                   |            |            |            |
|--------------------------|-------------------|------------|------------|------------|
| gtgagactcc<br>aacattaata | aacagcaaga<br>60  | gtcactttgt | agcccactca | aataaatgtg |
| ggtggatttg<br>cacttaaaaa | gacaatacag<br>120 | gccccttggt | ttaacaaggt | cttgcagttt |
| ttcatagtag<br>aaaaacaatc | ttagaagaac<br>180 | taatattatg | tgccaactga | caataaaaga |
| tttccaattt<br>tgtatctgta | atattacaca<br>240 | taagacacag | cctgaaaaaa | gaagagagca |
| aacaagttag<br>aaattacaag | gcatgatgcc<br>300 | aaaggagcag | cagcataaca | aaacaaacga |
| aaaatatggc<br>agcggcaatc | ttaccagcat<br>360 | ggttgctggg | aaggactgga | tcaagaagtg |

|                           |                    |             |            |              |
|---------------------------|--------------------|-------------|------------|--------------|
| aacaagtgtt<br>tagaggtcca  | actacagcat<br>420  | actttttctct | ttgataatca | ggaaggcatc   |
| tgcagcaatc<br>ttgatttgca  | attccagctg<br>480  | cagcaagtgc  | cccacaaagt | ttgatccctc   |
| tccctacatg<br>gatcataagc  | atcttgcata<br>540  | attagcttaa  | acccatcaag | ctagctacca   |
| aaaaagtgag<br>cacattggat  | cagagtgcc          | tatcaattat  | tcacagaaat | tagattataa   |
| gcataagaat<br>atgtgacatt  | gaatttcaat<br>660  | tacaaatacg  | cagagacaaa | aaagaagata   |
| gaggctgctt<br>aattggctgc  | tgtaccagga<br>720  | aaaataatag  | cagctgatat | tattagttat   |
| aaatttctcc<br>gataaatcca  | aaattgtaaa<br>780  | tatgaatttc  | attaatcact | ttatttagct   |
| attgatatta<br>acacaaactc  | taaagagttt<br>840  | ggatcaaacc  | atagggctgt | gacctgtgaa   |
| ctcattcgta<br>ttattgacta  | ttagaggctc<br>900  | taccctccta  | atagctttgg | ctttactgtc   |
| tctttgtaaa<br>taagtttatc  | tgtcttacia<br>960  | agactaatga  | cttctccaca | atgtgccaat   |
| ttttttgaaa<br>gttttaggctt | aataaatggc<br>1020 | tggtatcttc  | atcccttaag | aaaataggaa   |
| gaaaatagag<br>aagttgcatc  | attgcaatag<br>1080 | gcaagattaa  | tttagggcgt | gtttgggaaa   |
| caacattctc<br>ggaaagcgca  | tttaattcag<br>1140 | tacaagagct  | ccttcgccgt | ttagtgtata   |
| aactgatgtt<br>ttaagctga   | tggaagcttg<br>1200 | aaacggcaat  | aaaatatcaa | aatctttata   |
| acaaaagggg<br>tctaataaag  | ccctccttat<br>1260 | ttatccccctt | agtttttatt | ttcatttctt   |
| gggcaaacta<br>1311        | gtctcgtaat         | atattagagg  | ttaattaaat | ttatattcct c |

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 4587

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Secuencia Artificial

&lt;220&gt;

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial:  
polinucleótido Sintético"

<400> 3

|                           |                    |             |            |             |
|---------------------------|--------------------|-------------|------------|-------------|
| tgtcccatgc<br>taggcccaat  | ccatcaaaga<br>60   | agacagtaca  | cgatccgagc | tacgaatggg  |
| aaggcgagaa<br>atacccatct  | gggccaccca<br>120  | gtccaatgag  | ggaagacaaa | ctaacacaaa  |
| aataaggacc<br>caatttttaa  | tataagtttg<br>180  | tatttttttaa | atgtatttga | aaaattcaaa  |
| ttgttaattt<br>agatatcata  | tttttcctaa<br>240  | aattaaacaa  | acatatTTTT | gtagaagcaa  |
| atgttttgat<br>aaactctaag  | gatgctaaag<br>300  | aaacacgctt  | ctcaagtttg | atccaaaata  |
| aaattcaaga<br>tctaaattga  | taaatgataa<br>360  | agttagtcta  | tagagtctta | gaaagaagtt  |
| tgatgcataa<br>atattttattc | gttatgacca<br>420  | aagggtttttt | ctcaaaagct | tttaaaagag  |
| tctgataatc<br>tgtttttaaat | aattactagt<br>480  | gacaaaaaatg | tttactggaa | tgcttttaaaa |
| attttgaaag<br>agttttgaac  | cttgtaatcg<br>540  | attacacaag  | acttgtaatc | gattaccaaa  |
| attttaagac<br>cgattaccag  | aaccttttaga<br>600 | aatttgaatt  | taaatttcaa | agtctgtaat  |
| aattaaatt<br>attgtgtaat   | aaaatttttag<br>660 | atgtgaagag  | tcaaaagtct | tcagaaaaca  |
| cgattacacc<br>tctccgaaca  | attttggttaa<br>720 | tcgattacca  | ctgagaaatt | ttctaaaata  |
| gttacatctt<br>gtgacttggg  | ttcaaatgat<br>780  | tttgaatgac  | cattaaaggc | ttatatataa  |
| acatgaattt<br>aaatgattcc  | tcagagagtt<br>840  | tttctgaact  | gaaatgtttt | atcctctcaa  |
| ttggtctaac<br>gtaatatcct  | acttgcatat<br>900  | ttaataaaga  | atcttgattg | atcttcaatt  |
| tctttttaaag<br>aagagaccga | agagaaactt<br>960  | cttcttcttc  | ttattcaaag | gaaattgttt  |
| ggatctctta<br>gtgtgattca  | aatggtaagg<br>1020 | attcctgaac  | acaatggaag | gattatcctt  |

|                           |                     |             |            |             |
|---------------------------|---------------------|-------------|------------|-------------|
| gactttgtaa<br>tgcttgagtg  | aagggggtttt<br>1080 | tacaaagaga  | gtggaaaatc | tcaagtgggt  |
| aggacttgac<br>acatttctct  | gtaggcata<br>1140   | aaaatggctg  | aaccagtata | aattaagttt  |
| cttcccttaa<br>agtttatttt  | ccttctttta<br>1200  | tttattgtta  | tttatctttt | attttaaaaa  |
| gaattgtctt<br>aagagtggaa  | ttgagtaatt<br>1260  | catattaatg  | gtgcattggt | aattcaaaaa  |
| ttttaattga<br>gataactgag  | gaaatagttt<br>1320  | ttgtatctta  | attcaatccc | cttttcttaa  |
| atcacttgct<br>ttaatatctt  | taacaatttt<br>1380  | gtgtataatt  | acattcaata | attttttttag |
| aaatatataa<br>ttaataaatt  | attccaaact<br>1440  | cttgaaatta  | aaaaaatatg | cataatttat  |
| taaatttttag<br>agaatattat | gaaaaaaagt<br>1500  | taaggggtca  | ttaaatttga | taaaaagtta  |
| tgaattttat<br>tttctatttc  | aatttttttt<br>1560  | atagaaaata  | gtgaaaacaa | taaaagtttt  |
| ttaacaaccc<br>ataattaaga  | tttcaataaa<br>1620  | aaaatgaaat  | gaaaataata | tgacattttt  |
| gtaatataaa<br>tgttattgct  | aataaaaata<br>1680  | aataatttta  | aaccaaagga | ctcataagca  |
| ctaccactca<br>tgtcatacta  | taaaaatttt<br>1740  | tctcctatta  | tctttttgat | gataaaatat  |
| gaaataaaat<br>aagtacaatg  | atattttttc<br>1800  | tatatcctct  | atatgagtca | atcttatttt  |
| ttactgaaag<br>attggtgtaa  | tcattttgca<br>1860  | ataaaaatct  | tccaagattt | ttcccaaaca  |
| ttttagttct<br>atataaataa  | ttaaaatata<br>1920  | catataaaaa  | tgcatatttt | gtatggtata  |
| tagaaacaat<br>tacttgacta  | atcaacattt<br>1980  | ctcattgagt  | attgagaagc | taaagtaa    |
| cattgccgta<br>gtgtagataa  | gtgcgacgaa<br>2040  | ttagattgta  | atatctaaaa | tacttaagta  |
| gtctatgaat<br>ctataattcc  | gtttttcaga<br>2100  | tttaattgcac | gataattttt | tttaattcta  |

|                          |                    |            |            |            |
|--------------------------|--------------------|------------|------------|------------|
| atattttat<br>taaccttctt  | gaaaaacttc<br>2160 | atgataacat | gcatccttta | tttattacat |
| aaatatttca<br>ataagcttca | aatatcacgt<br>2220 | ttcactgcaa | gaaaagtttt | ataatcctta |
| tacatgctcg<br>tcactcttga | tacctttcca<br>2280 | caataagcca | atttgggtct | gccaatgtcc |
| aaaaggaaaa<br>aaaatatata | tataaacctc<br>2340 | aaagtgatca | tgtgatatga | taaaaattta |
| aattcataga<br>tatgaaaatc | gaaaaaaagg<br>2400 | aatgaaaatg | aattgtaaga | aagtgaaatg |
| tgaactcatt<br>atcacattca | caaaatcata<br>2460 | taagaaaata | aaccgtggaa | gaaaacgagc |
| cataacatgt<br>aaccagagt  | tctgctccaa<br>2520 | cactaattat | tctgctaccg | cagatatagc |
| gccattttat<br>agctaaacat | tacatttgta<br>2580 | tcgatccatg | catttacgta | cactccatct |
| catatcacta<br>cttgaagt   | ctaacatgac<br>2640 | acaaaataag | gaaaaaactc | agaatgtcag |
| aatagatttc<br>aaaatatcct | ctcctttaat<br>2700 | aacattttaa | tatgatttat | ttttataata |
| taaaaatatt<br>acttttctta | tatttagtag<br>2760 | ttatttttag | cataaatatt | aggaattgat |
| tttatgactt<br>aaaaatatca | gcagatataa<br>2820 | aaatgaagaa | ttaaaagtaa | agaaaatcca |
| aaaatataaa<br>cagctgtaat | taaggaagat<br>2880 | tttttggcgt | cagacccaag | ttcattccaa |
| tttttcagat<br>gaataaagac | taaaaaggat<br>2940 | gaatgatgaa | tgaaattaaa | agtaagaaag |
| acaccgagtc<br>ccttaggaaa | tcggagcaat<br>3000 | ctaatacaca | cctaaagcct | gagaactctc |
| ttccttcttc<br>tccatcagtt | tctttcatca<br>3060 | ttctttat   | cctttttcca | tctcttctct |
| cgtatatccc<br>cccttagtta | tttgctagt<br>3120  | taaaaccct  | tatggttatg | agaggctaaa |
| gggtttgaca<br>atcaatgcaa | ggcttaaaaa<br>3180 | gtcaaaagat | gtattataca | cttcatattt |

|                          |                     |             |             |             |
|--------------------------|---------------------|-------------|-------------|-------------|
| acagatgttt<br>attcatcctt | tctttcctat<br>3240  | tatcctttct  | tatttctaata | ttcatgcatc  |
| gcattatctt<br>ttttgcatgt | tggggggttag<br>3300 | gtgctcgaca  | aaggataatc  | ccaaagaagg  |
| atctatttca<br>aaaaagaaga | ggaattagtc<br>3360  | gctcgacaga  | gagtaatttc  | taataaaaact |
| aatatcttaa<br>tgcatacaag | taaaatcatt<br>3420  | gttagacata  | aaatgattgt  | attatgcccc  |
| caaacatata<br>aaaacatttg | gaattataac<br>3480  | ttcatgtatt  | ttatctattg  | gctctttgca  |
| gaagatagat<br>agtaagataa | aggtaaaaata<br>3540 | ggtgagacat  | caggatatttt | aatagatgtg  |
| attcacctga<br>atgctaggtc | tagagaaaat<br>3600  | cataaataat  | atatcttaga  | caaataagac  |
| ctaacatttt<br>aataattatt | catcccattg<br>3660  | aattcactat  | tttttctttt  | gttatttagt  |
| attttatact<br>ttctcttata | ctgttctttt<br>3720  | aaaattatct  | tttataccta  | tcttatattt  |
| aattaaaaat<br>aagacttccg | tatccaacac<br>3780  | aaatacaaaa  | caaagttaaa  | atcgacactc  |
| agtttttgat<br>tttagaagaa | caaaaagcct<br>3840  | ttctatcttt  | cctcttgcg   | tctgctccat  |
| aaggaaccaa<br>cttaatataa | ttaataaaat<br>3900  | ggacagcgca  | atcaaataag  | taaaaattta  |
| tgatgcatga<br>gtcaatagag | tagctagaag<br>3960  | ggtaccaata  | atttaaccct  | gatcaataac  |
| actctcccca<br>gaaataaata | aaccccaaata<br>4020 | taggggtatcg | ctgataccta  | tgaaaacccc  |
| aattgaaagg<br>cagaaaactt | aaccctaaac<br>4080  | gcgaaaccct  | atatttgcat  | cgtggaagcg  |
| cactgagata<br>tcacaaaccc | aatgaagtcg<br>4140  | gatagaacat  | agattctcgt  | agatcatcca  |
| taaaagaagt<br>aaacgaagct | attagatttt<br>4200  | cgcgttcgga  | gaaacaaacc  | tgagtggtag  |
| tgatttggtg<br>ttctattttc | gaacgattgt<br>4260  | tgagagaaaag | aacagagagc  | aaaataaggc  |

|                           |                     |             |             |             |
|---------------------------|---------------------|-------------|-------------|-------------|
| ttaatcaaac<br>atttctctgt  | gttggtgttt<br>4320  | gttgccaatg  | ttgtgttagg  | cttattttata |
| tagcttgtaa<br>ttttaaaaaa  | agcacgcaac<br>4380  | aataagatga  | gatataggat  | tttttttttta |
| aaagacattt<br>ttatttttctt | gccgtcatat<br>4440  | aaggataaat  | taaggcttaa  | aaaaagatag  |
| taaaaaaata<br>tacttatgaa  | attattttctg<br>4500 | aaattttaata | ttttgaagat  | agtttgaatt  |
| aatatttggt<br>tacatttcgt  | ttgagtttca<br>4560  | atttataaaa  | tcattttctag | tgtgggaagt  |
| ttggattaga<br>4587        |                     | aatttttaaaa |             | ttctaga     |

<210> 4

<211> 6156

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial:  
polinucleótido Sintético"

<400> 4

|                           |                    |            |            |            |
|---------------------------|--------------------|------------|------------|------------|
| ctggcacgac<br>ttaatgtgag  | aggtttcccg<br>60   | actggaaagc | gggcagtgag | cgcaacgcaa |
| ttagctcact<br>gtatgttggtg | cattaggcac<br>120  | cccaggcttt | acactttatg | cttccggctc |
| tggaattgtg<br>attacgcaa   | agcggataac<br>180  | aatttcacac | aggaaacagc | tatgaccatg |
| gctcgaaatt<br>gtggcggccg  | aaccctcact<br>240  | aaagggaaca | aaagctggag | ctccaccgcg |
| ctctagatta<br>tgaaaaatcg  | tgtattttcca<br>300 | actttcatta | acaatataat | cgcatataaa |
| tttccaggat<br>ttgatgttga  | aatattttga<br>360  | tgaaatctca | tattattggt | cgtactcgga |
| aggcttgaag<br>gtttactcca  | cgcttcaa<br>420    | tatagaccag | attatttaag | tttttctttt |
| tatcaatttg<br>tatttattgt  | atccattata<br>480  | ctacctaaga | aaatttaggt | aacatagaat |

|                            |                    |             |             |            |
|----------------------------|--------------------|-------------|-------------|------------|
| tatagtaaaa<br>ctatitttcat  | aaaaggaaaa<br>540  | ccacaaaaaat | aatctacttt  | tacgtatata |
| gacataagta<br>aattttatcat  | attaagttgt<br>600  | acaacttttt  | tttaatgaaa  | agagagagta |
| gttcatgtgt<br>catgaattgt   | agttacctcg<br>660  | tgaataaccg  | acggttatat  | agacgcctaa |
| tcagttgaag<br>aaaaaaagtg   | acagttcaaa<br>720  | acatgtgttt  | cactctaaaa  | tcctcaacaa |
| ttaaaatttg<br>ccaagattct   | taaacctctt<br>780  | tcaagcaaaa  | aaagaaaaag  | tgtagaatc  |
| ttcataatcc<br>aacaaggagt   | ggaatcttgg<br>840  | ctgaaaacgt  | ataaaagaga  | ttgacgtagt |
| cttggtatgc<br>tggttaccat   | ttccatgctt<br>900  | tttatccttt  | tttgtcatgg  | aaccatgatt |
| ttattatgta<br>gcaaaaaaaaa  | accgaaattt<br>960  | tcattgtaat  | aatgaatatt  | taaattttta |
| acaaaaaaaaa<br>gcactttttca | acaaggagtc<br>1020 | ttgtcttcgt  | tctcaaattt  | cagagctctt |
| agagtttttac<br>taaacttaaa  | tttgatgagt<br>1080 | gagacatttg  | tcttttttagt | gtttattttc |
| atagtagcat<br>atattttata   | caacatcact<br>1140 | caattataat  | tcttaagatg  | ttgtagaaaa |
| gatggaaagt<br>tgttcagacc   | aatcgatatt<br>1200 | aagacaaata  | agaaaccaa   | cggacttttg |
| gaatcaaatc<br>ctaaagtata   | tgaattggag<br>1260 | aaattatgg   | ggaggcgaaa  | gtcaacggaa |
| aaaccaaagt<br>tgaaacccta   | tcaaaaataa<br>1320 | aaccaattt   | tcacacctta  | acgaacctgc |
| atttcgatta<br>ccgcaatcga   | ccaattccga<br>1380 | tctaaaaaga  | agtcattggaa | gccattgatt |
| tcctctcaga<br>acaaaccgga   | gatttcgcta<br>1440 | agagcagtgt  | tcgtctcgtc  | cagcgctgtc |
| tcgcaaggg<br>ctgtagatta    | aacgcctttt<br>1500 | ctcaaaaaaa  | tctcatttcc  | gatttttgat |
| gggttttctg<br>tcacgaaagt   | aaattttgat<br>1560 | atcatttgta  | attgaattgg  | ttatcagaat |

|                           |                     |            |            |            |
|---------------------------|---------------------|------------|------------|------------|
| agctgtgcgt<br>tcgtgaagct  | acggcgattg<br>1620  | gatttgtggt | gatgggattc | gttggattct |
| cgttttcatc<br>ctttctttac  | ccaatcaaca<br>1680  | acatcatcgt | tggatcttct | tagtgtagta |
| gaggtaattg<br>catatagtca  | atctcgcatt<br>1740  | atatatctac | attttggtta | tgttacttga |
| ttgattcaat<br>cattcttggg  | agttctgtta<br>1800  | attcctttaa | agatcatttt | gactagacca |
| tcattcctca<br>ttatagatca  | ataatttgta<br>1860  | atcatattgg | tggatataga | agtagattgg |
| gatagtggaa<br>attgtctcaa  | gacttttagga<br>1920 | tgaatttcag | ctagtttttt | tttttggcct |
| aagattagtg<br>tctccttgta  | ctttgctgtc<br>1980  | tccattgctt | ctgctatcga | cacgcttctg |
| tctttattat<br>cgctctgggtg | atctattcgt<br>2040  | cccatgagtt | ttgtttgttc | tgtattcggt |
| tcatggatgg<br>tcatgcaaga  | agtctctggt<br>2100  | ccatgtttct | gtaatgcatg | ttgggttggt |
| aatgctgaga<br>ctacaggcaa  | taaacactca<br>2160  | tttgtgaaag | tttctaaact | ctgaatcgcg |
| tgctccgagg<br>tttgagggaag | agtaggagga<br>2220  | gaagaacgaa | ccaaacgaca | ttatcagccc |
| ctcttagttt<br>ttttcactta  | tgttattggt<br>2280  | tttgtagcca | aattctccat | tcttattcca |
| tctcttgttc<br>atattgtcat  | cttatagacc<br>2340  | ttataagttt | tttattcatg | tatacaaatt |
| caagaagtat<br>gtccaattcg  | ctttaaaatc<br>2400  | taaatctcaa | atcaccagga | ctatgttttt |
| tggaaccaac<br>agaaagatca  | ttgcagcttg<br>2460  | tatccattct | cttaaccaat | aaaaaaagaa |
| atltgataaa<br>gaaggctcaa  | tttctcagcc<br>2520  | acaaattcta | catttagggt | ttagcatatc |
| tcacaaatac<br>ctataaataa  | aatagataga<br>2580  | ctagagattc | cagcgtcacg | tgagttttat |
| aggaccaaaa<br>cttaaacttc  | atcaaattccc<br>2640 | gagggcattt | tcgtaatcca | acataaaacc |

|                          |                    |             |            |            |
|--------------------------|--------------------|-------------|------------|------------|
| aagtctcatt<br>tttctctatc | tttaaaca<br>2700   | tcatgttcac  | aagtctcttc | ttcttctctg |
| tcttgctcat<br>aacatcttct | ctttctcctg<br>2760 | aaccatggcg  | gcggcaacaa | caacaacaac |
| tcgatctcct<br>accaatctcc | tctccaccaa<br>2820 | accatctcct  | tcctcctcca | aatcaccatt |
| agattctccc<br>ccgccgcgc  | tcccattctc<br>2880 | cctaaacccc  | aacaaatcat | cctcctcctc |
| ggtatcaaat<br>caccaatgtc | ccagctctcc<br>2940 | ctcctccatc  | tccgccgtgc | tcaacacaac |
| acaaccactc<br>ccgattcgct | cctctccaac<br>3000 | caaacctacc  | aaacccgaaa | cattcatctc |
| ccagatcaac<br>tcaaggcgta | cccgcaaagg<br>3060 | cgctgatatc  | ctcgtcgaag | ctttagaacg |
| gaaaccgtat<br>cttaaccgcg | tcgcttacct<br>3120 | tggaggtgca  | tcaatggaga | ttcaccaagc |
| tcttcctcaa<br>cgcagcagaa | tccgtaacgt<br>3180 | ccttcctcgt  | cacgaacaag | gaggtgtatt |
| ggatacgctc<br>tcccggagct | gatcctcagg<br>3240 | taaaccaggt  | atctgtatag | ccacttcagg |
| acaaatctcg<br>tgtagcaatc | ttagcggatt<br>3300 | agccgatgcg  | ttgttagata | gtgttcctct |
| acaggacaag<br>tccgattgtt | tccctcgtcg<br>3360 | tatgattggc  | acagatgcgt | ttcaagagac |
| gaggtaacgc<br>agatatccct | gttcgattac<br>3420 | gaagcataac  | tatcttgtga | tggatgttga |
| aggattattg<br>tgttttgggt | aggaagcttt<br>3480 | cttttttagct | acttctggta | gacctggacc |
| gatgttccta<br>ggctatgaga | aagatattca<br>3540 | acaacagctt  | gcgattccta | attgggaaca |
| ttacctgggt<br>ggagcagatt | atatgtctag<br>3600 | gatgcctaaa  | cctccggaag | attctcattt |
| gttaggttga<br>ttgtttgaat | tttctgagtc<br>3660 | taagaagcct  | gtgttgtatg | ttggtgggtg |
| tctagcgatg<br>gagtacgttg | aattgggtag<br>3720 | gtttgttgag  | cttacgggga | tccctgttgc |

|                           |                     |            |             |            |
|---------------------------|---------------------|------------|-------------|------------|
| atggggctgg<br>tggaatgcat  | gatcttatcc<br>3780  | ttgtgatgat | gagttgtcgt  | tacatatgct |
| gggactgtgt<br>gtttggggta  | atgcaaatta<br>3840  | cgctgtggag | catagtgatt  | tgttgttggc |
| aggtttgatg<br>taagattgtt  | atcgtgtcac<br>3900  | gggtaagctt | gaggcttttg  | ctagtagggc |
| catattgata<br>gtctgtgtgt  | ttgactcggc<br>3960  | tgagattggg | aagaataaga  | ctcctcatgt |
| ggtgatgtta<br>agcggaggag  | agctggcttt<br>4020  | gcaagggatg | aataaggttc  | ttgagaaccg |
| cttaagcttg<br>gaagtttccg  | atthttggagt<br>4080 | ttggaggaat | gagttgaacg  | tacagaaaca |
| ttgagcttta<br>ggtccttgat  | agacgttttg<br>4140  | ggaagctatt | cctccacagt  | atgcgattaa |
| gagttgactg<br>aatgtgggcg  | atggaaaagc<br>4200  | cataataagt | actgggtgtcg | ggcaacatca |
| gcgcagttct<br>ccttgaggct  | acaattacaa<br>4260  | gaaaccaagg | cagtggctat  | catcaggagg |
| atgggatttg<br>tgcgatagtt  | gacttcctgc<br>4320  | tgcgattgga | gcgtctgttg  | ctaaccctga |
| gtggatattg<br>cactattcgt  | acggagatgg<br>4380  | aagctttata | atgaatgtgc  | aagagctagc |
| gtagagaatc<br>catggttatg  | ttccagtga<br>4440   | ggtactttta | ttaaacaacc  | agcatcttgg |
| caatgggaag<br>ggatccggct  | atcggttcta<br>4500  | caaagctaac | cgagctcaca  | catttctcgg |
| caggaggacg<br>gattccagcg  | agatattccc<br>4560  | gaacatggtg | ctgtttgcag  | cagcttgccg |
| gcgaggggtga<br>ggatacacca | caaagaaagc<br>4620  | agatctccga | gaagctattc  | agacaatgct |
| ggaccttacc<br>gatgatcccc  | tgttggatgt<br>4680  | gatttgtccg | caccaagaac  | atgtgttgcc |
| aatggtggca<br>atactgagag  | ctttcaacga<br>4740  | tgtcataacg | gaaggagatg  | gccggattaa |
| atgaaaccgg<br>aaaaaaactt  | tgattatcag<br>4800  | aaccttttat | ggtctttgta  | tgcatatggt |

|                           |                    |            |             |            |
|---------------------------|--------------------|------------|-------------|------------|
| agtttgcaat<br>gatctgcctg  | ttcctgtttg<br>4860 | ttttggtaat | ttgagtttct  | tttagttggt |
| ctttttgggt<br>ctttcatttt  | tacgtcagac<br>4920 | tactactgct | gttggttggtt | ggtttccttt |
| ataaataaat<br>ttattgcgaa  | aatccggttc<br>4980 | ggtttactcc | ttgtgactgg  | ctcagtttgg |
| atgcgaatgg<br>gttttaacag  | taaattgagt<br>5040 | aattgaaatt | cgttattagg  | gttctaagct |
| tcaactgggt<br>ggtttttaat  | aatatctctc<br>5100 | gaatcttgca | tggaaaatgc  | tcttaccatt |
| tgaaatgtgc<br>gtcatcgaga  | tcatatgggc<br>5160 | cgtggtttcc | aaattaaata  | aaactacgat |
| agtaaaatca<br>gggtaattca  | actgtgtcca<br>5220 | cattatcagt | tttgtgtata  | cgatgaaata |
| aaatctagct<br>ttttcagatt  | tgatatgcct<br>5280 | tttggttcat | tttaaccttc  | tgtaaacatt |
| ttgaacaagt<br>aattatttta  | aatccaaaa<br>5340  | aaaaaaaaaa | aaaatctcaa  | ctcaacacta |
| atgtataaaa<br>catagagAAC  | gatgcttaaa<br>5400 | acatttggtc | taaaagaaag  | aagctaaaaa |
| tcttgtaaatt<br>tttctgattt | tgaagtatga<br>5460 | aaatatactg | aattgggtat  | tatatgaatt |
| aggattcaca<br>gaagtaggaa  | tgatccaaaa<br>5520 | aggaaatcca | gaagcactaa  | tcagacattg |
| tatttcaaaa<br>atagaaaaga  | agtttttttt<br>5580 | ttttaagtaa | gtgacaaaag  | cttttaaaaa |
| aactagtatt<br>ttttcatttc  | aaagttgtaa<br>5640 | atttaataaa | caaaagaaat  | tttttatatt |
| tttttccagc<br>ttttgatagc  | atgaggttat<br>5700 | gatggcagga | tgtggatttc  | atttttttcc |
| cttttaattg<br>tatatttttag | atctattata<br>5760 | attgacgaaa | aatatttagt  | taattataga |
| gtagtattag<br>atgcgttgat  | caatttacac<br>5820 | ttccaaaaga | ctatgtaagt  | tgtaaatatg |
| ctcttcatca<br>ctaaagtagt  | ttcaatggtt<br>5880 | agtcaaaaaa | ataaaagctt  | aactagtaaa |

|                          |                     |             |            |            |
|--------------------------|---------------------|-------------|------------|------------|
| caaaaattgt<br>tttatgtgaa | acttttagttt<br>5940 | aaaatattac  | atgaataatc | caaaacgaca |
| acaaaaacaa<br>tatcaagctt | tatctagaac<br>6000  | tagtggatcc  | cccgggctgc | aggaattcga |
| atcgataccg<br>gtgagtcgta | tcgacctcga<br>6060  | ggggggggccc | ggtacccaat | tcgccctata |
| ttacaattca<br>gcgttaccca | ctggccgtcg<br>6120  | ttttacaacg  | tcgtgactgg | gaaaaccctg |
| acttaatcgc<br>6156       | cttgcagcac          | atcccccttt  | cgccag     |            |

<210> 5  
<211> 2  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial:  
oligonucleotido Sintético"

<400> 5  
ca  
2

<210> 6  
<211> 2  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial:  
Oligonucleotido Sintético"

<400> 6  
ct  
2

<210> 7  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer  
Sintético"

<400> 7  
tgcgttatcc  
20

cctgattctg

<210> 8  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 8  
tggtgggggtt  
17

tagggag

<210> 9  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 9  
cgaaggctca  
21

atcacaaata

c

<210> 10  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 10  
agcaggcaga  
18

tcaacaac

<210> 11  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 11  
gaacatgtgt  
20  
tgccgatgat

<210> 12  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 12  
cgcaactggt  
18  
gggaagg

<210> 13  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 13  
gttttacaac  
20  
gtcgtgactg

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

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 14  
cggtagctc  
18  
cttcggtc

<210> 15  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 15  
cactgcggcc  
18  
aacttact

<210> 16  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 16  
cttggcgtaa  
18  
tcatggtc

<210> 17  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 17  
gcagcttgta  
25  
tccattctct  
taacc

<210> 18  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 18  
ttgttgattg                      ggatgaaaac                      ga  
22

<210> 19  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 19  
acgaagaatc                      caacgaatcc                      c  
21

<210> 20  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 20  
aaggaaatcc                      agaagcacta                      atca  
24

<210> 21  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 21  
taatgcgaga                      tcaattacct                      c  
21

<210> 22  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 22  
caattacctc gtaaagaaag tacta  
25

<210> 23  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 23  
gcttgatatg ccttttggtt c  
21

<210> 24  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 24  
ttgtcttccc tcattggac  
19

<210> 25  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 25  
gacgagatat tcccgaaac  
18

<210> 26  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 26  
gtctgattag  
19  
tgcttctgg

<210> 27  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 27  
ccctggtgcg  
20  
agtacggtga

<210> 28  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 28  
cttccggttat  
20  
gacatcggtg

<210> 29  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 29  
aaccactccc  
18  
tctccaac

<210> 30  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 30  
ctgatgatag  
18  
ccactgcc

<210> 31  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 31  
ttcgttcgct  
18  
ctggtgctc

<210> 32  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 32  
acggtttcta  
17  
cgccttg

<210> 33  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 33  
 gaaaatagga agtttaggct tg  
 22

<210> 34  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 34  
 gggctgataa tgtcgtttg  
 19

<210> 35  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 35  
 gccctcctta tttatccct ta  
 22

<210> 36  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 36  
 acaaacctac ccaattcatc gc  
 22

<210> 37  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 37  
gaaaatagga agtttaggct tg  
22

<210> 38  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 38  
cactgctctt agcgaaatct c  
21

<210> 39  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 39  
gccctcctta tttatcccct ta  
22

<210> 40  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 40  
gccgtacgca cagctacttt c  
21

<210> 41  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 41  
ataggaaagc gcaaactg  
18

<210> 42  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 42  
cgaacactgc tcttagcgaa at  
22

<210> 43  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 43  
gccctcctta tttatcccct ta  
22

<210> 44  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 44  
 aggatcgatt gcggaatca  
 19

<210> 45  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 45  
 aacagaagtt tccgttgagc ttttaagac  
 28

<210> 46  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: sonda Sintética"

<400> 46  
 tttggggaag ctgtcccatg ccc  
 23

<210> 47  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 47  
 cattcgtagc tcggatcgtg tac  
 23

<210> 48  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 48  
ccagcttcgc cgcttccttc  
20

<210> 49  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: sonda Sintética"

<400> 49  
cttcaccttc tatgccctg acac  
24

<210> 50  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 50  
gaaggcaagc ccatctgcaa gcc  
23

<210> 51  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 51  
acgaacctgc tgaaacccta at  
22

<210> 52  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 52  
taagaatgga gaatttggt aca  
23

<210> 53  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 53  
tgaagcagca gctgagtttc gc  
22

<210> 54  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 54  
ggcagtcctga accgtctcct c  
21

<210> 55  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 55  
 gcttgggaga cagagaaaga ga  
 22

<210> 56  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 56  
 ccttttgctt gacaacctga at  
 22

<210> 57  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 57  
 ttggaatgca tgggactgt  
 19

<210> 58  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 58  
 tgtcttcct cattggactg  
 20

<210> 59  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 59  
ccacaatgtg ccaattaagt  
20

<210> 60  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 60  
gcgtgtttct ttagcatca  
19

<210> 61  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 61  
ctccttcgcc gtttagtgta  
20

<210> 62  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 62  
gtttcgcggtt  
19

tagggttcc

<210> 63  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 63  
ataagccaat  
21

ttgggtctgc

c

<210> 64  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 64  
gtttcgcggtt  
19

tagggttcc

<210> 65  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 65  
tggtcgcgcc  
18

ctctactc

<210> 66  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"  
  
<400> 66  
ggcgaagctg gcaacg  
16

<210> 67  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 67  
gggcaaacta gtctcgtaat atat  
24

<210> 68  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 68  
cggaattggt aatcgaaatt  
20

<210> 69  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer Sintético"

<400> 69  
gctccttcgc cgtttagtgt atag  
24

<210> 70  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: primer  
Sintético"

<400> 70  
cgaaatctct                      gagaggatcg                      attg  
24

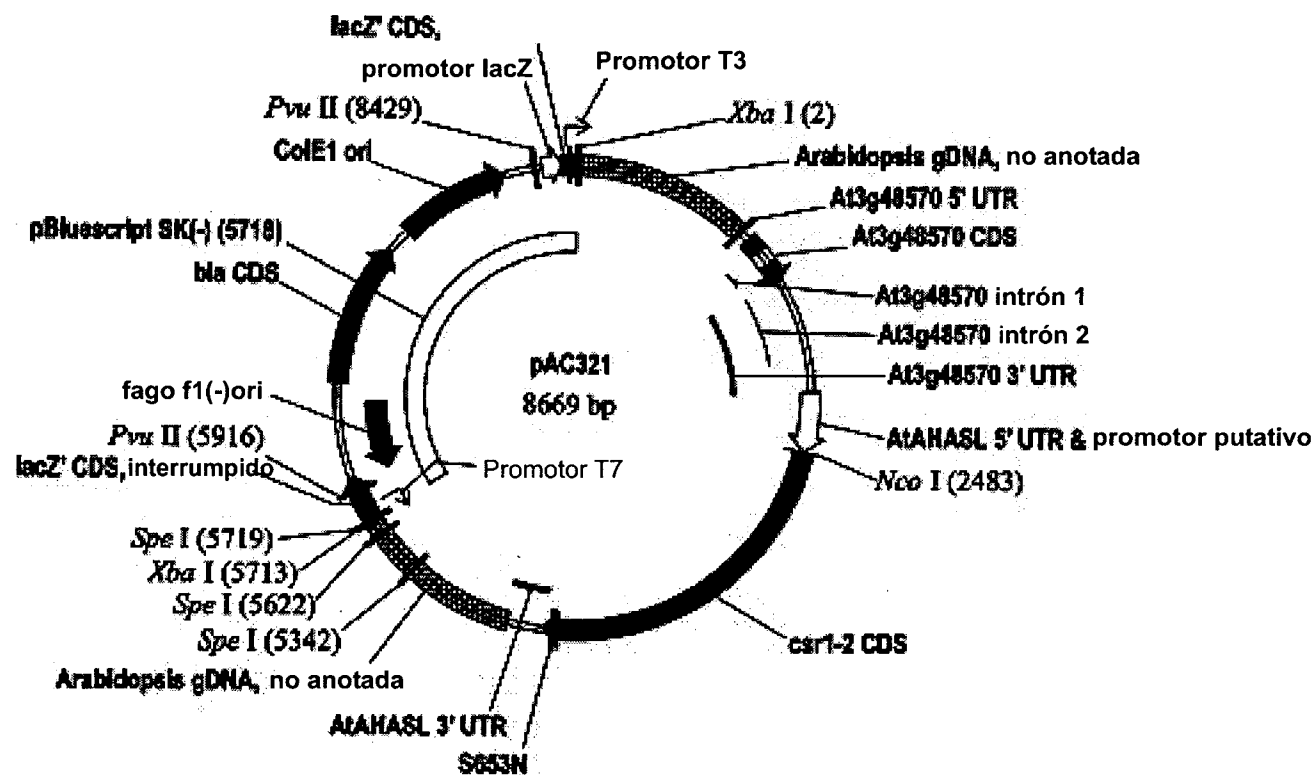


FIGURA 1A

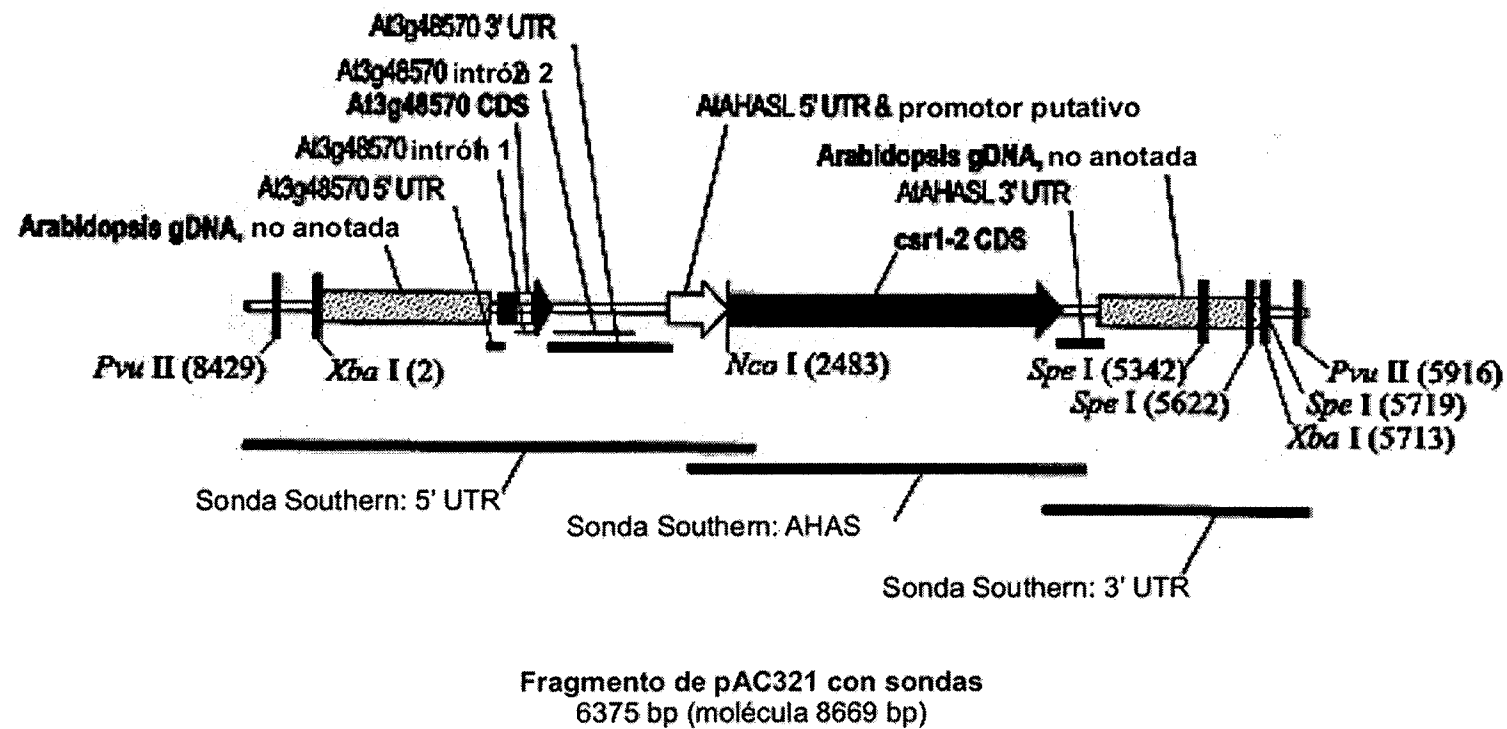


FIGURA 1B

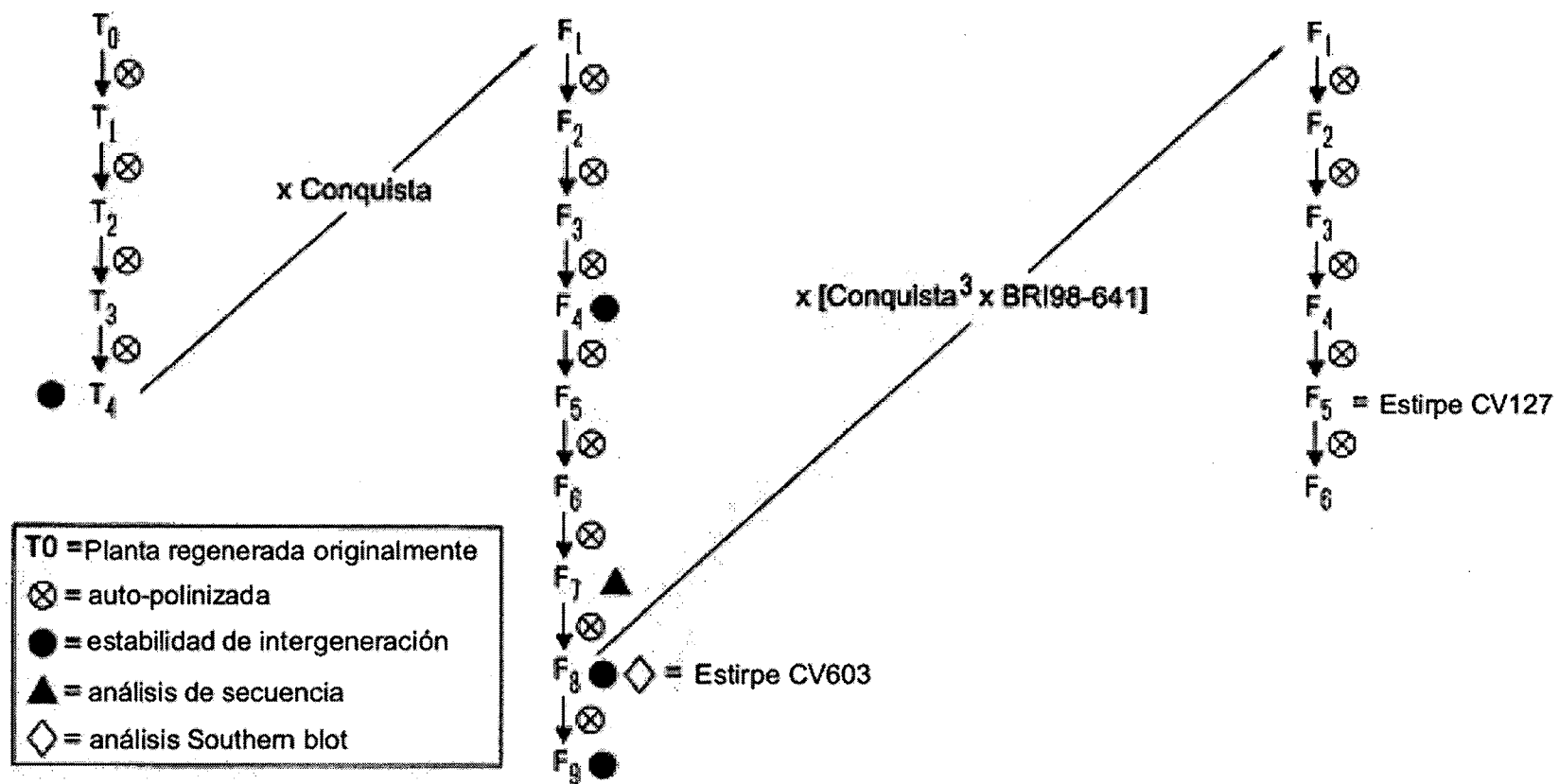


FIGURA 2

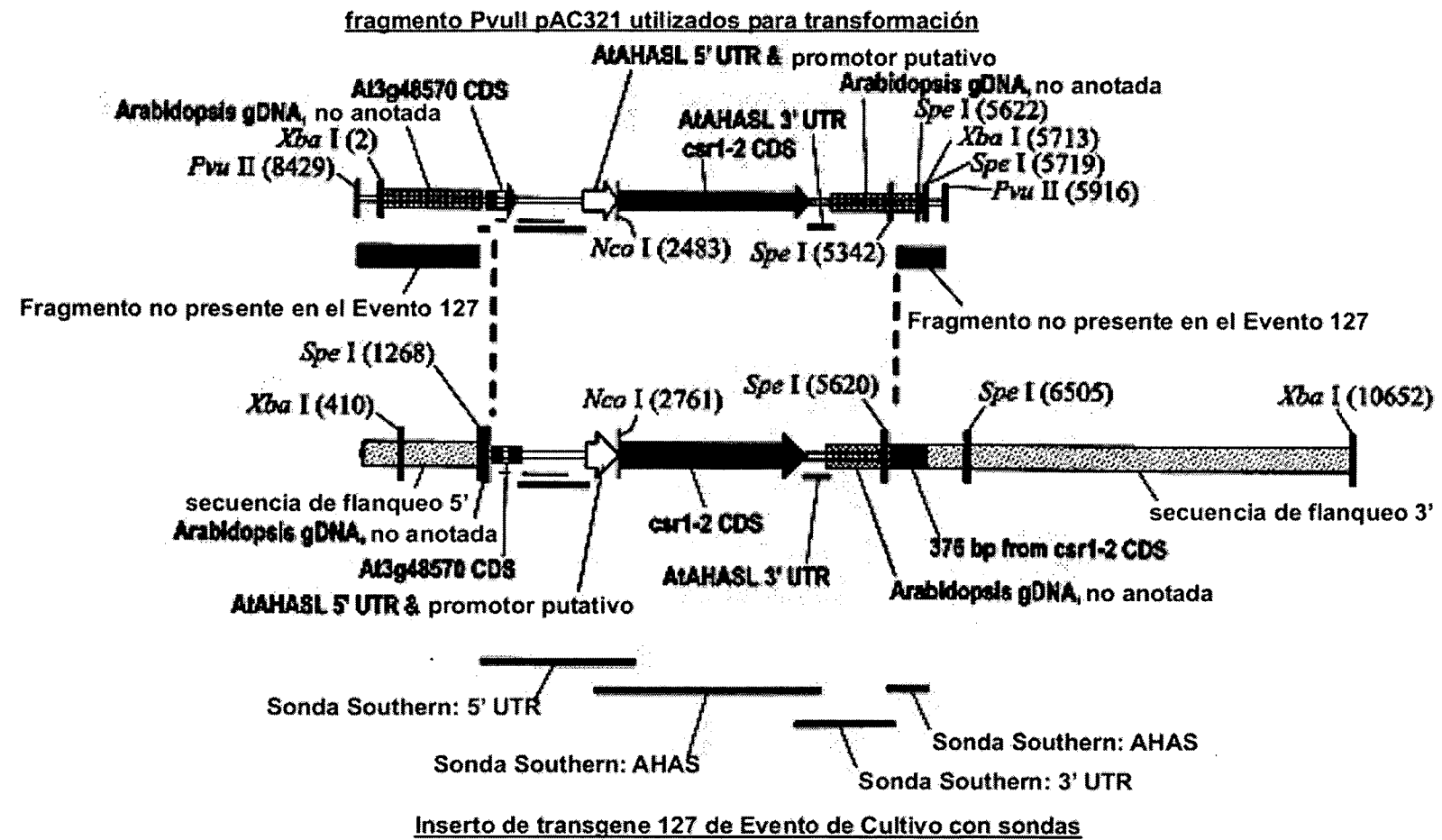


FIGURA 3

5/19

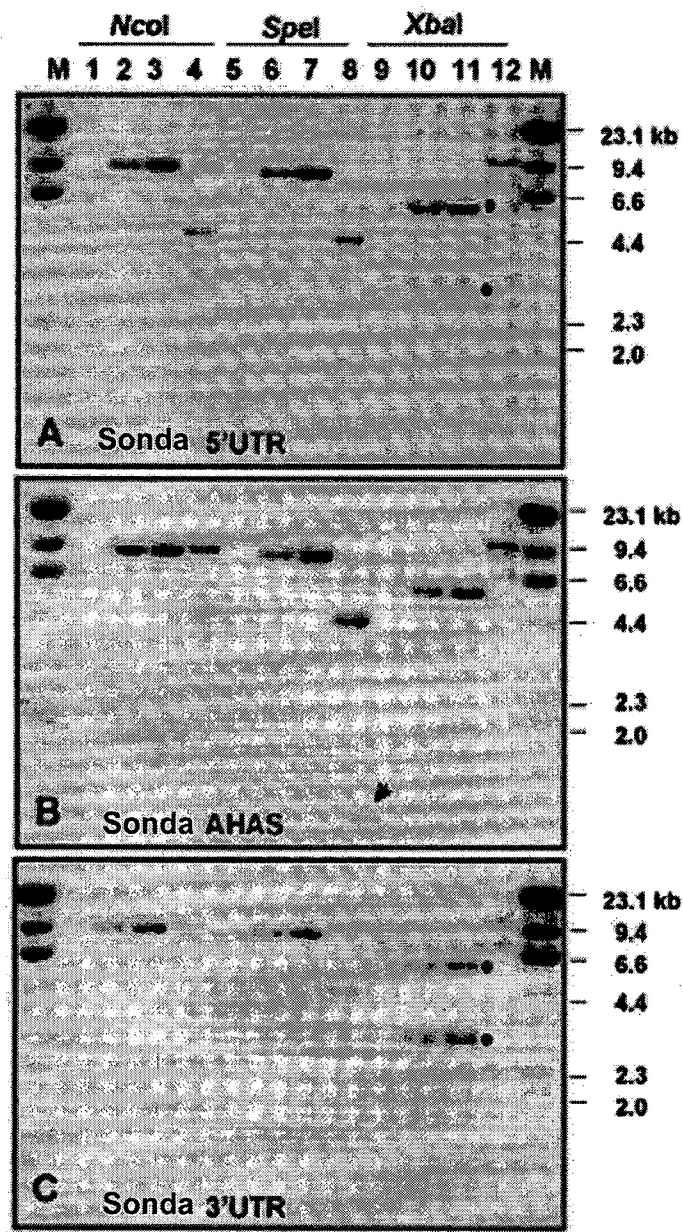


FIGURA 4A-C

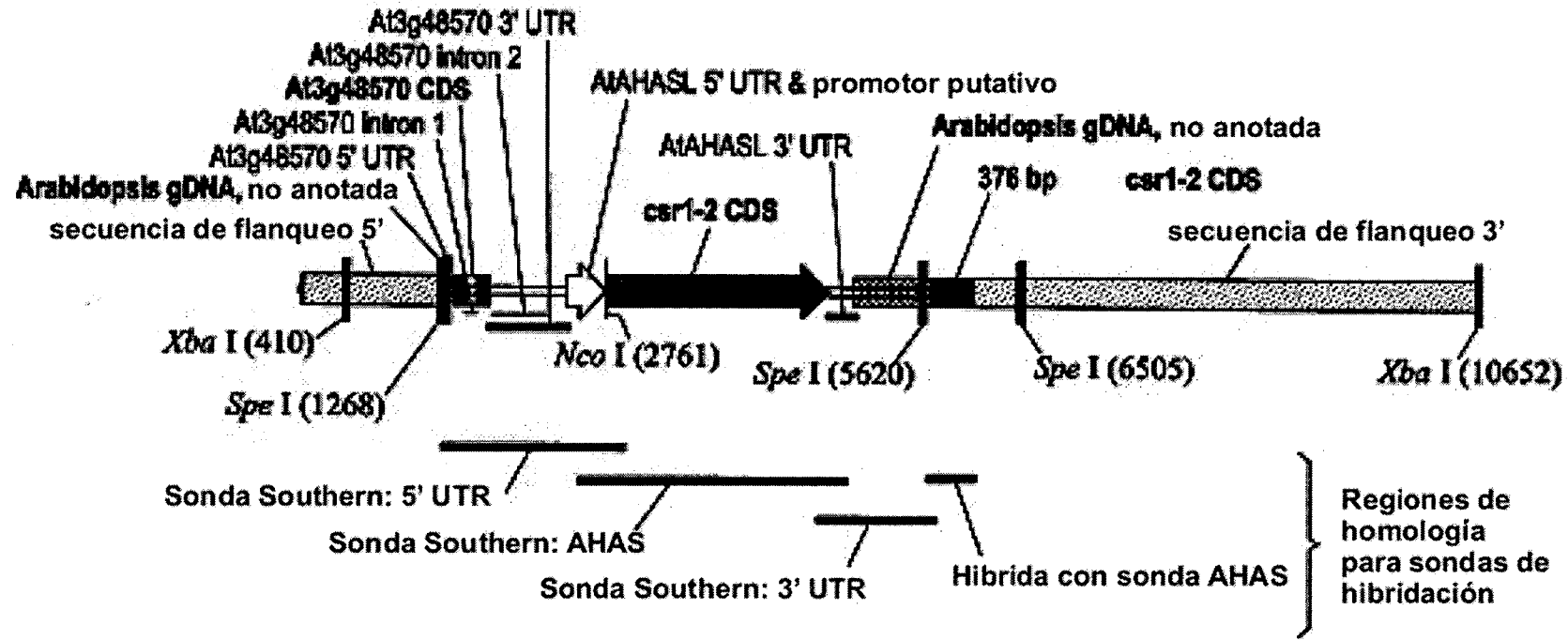


FIGURA 4D

FIGURA 5A

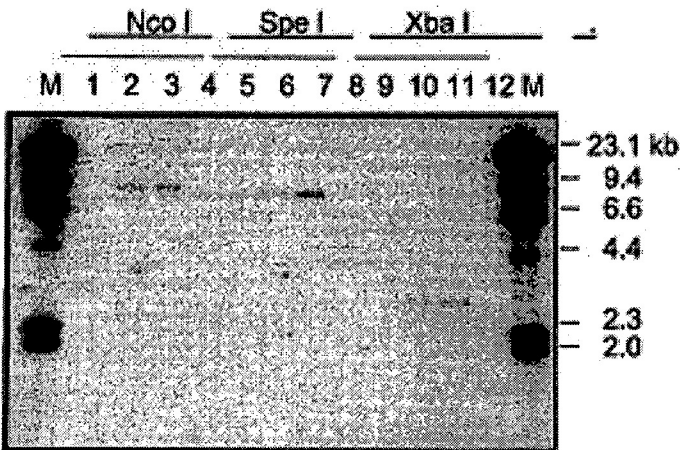
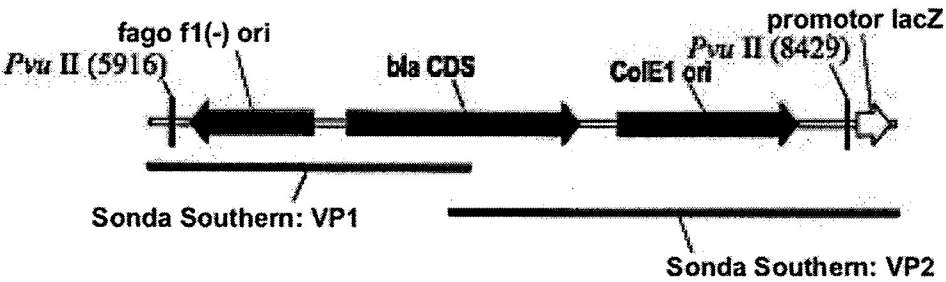
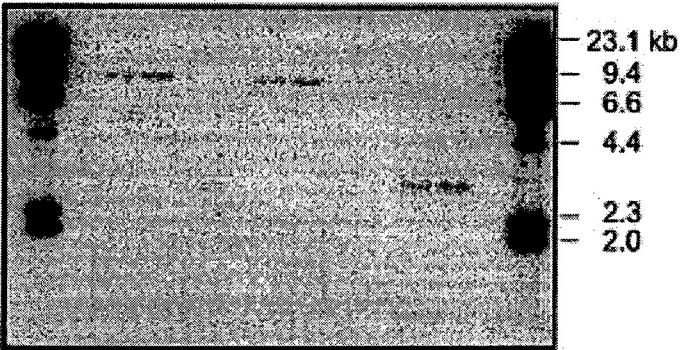


FIGURA 5B



Fragmento de pAC321 con sondas

FIGURA 5C

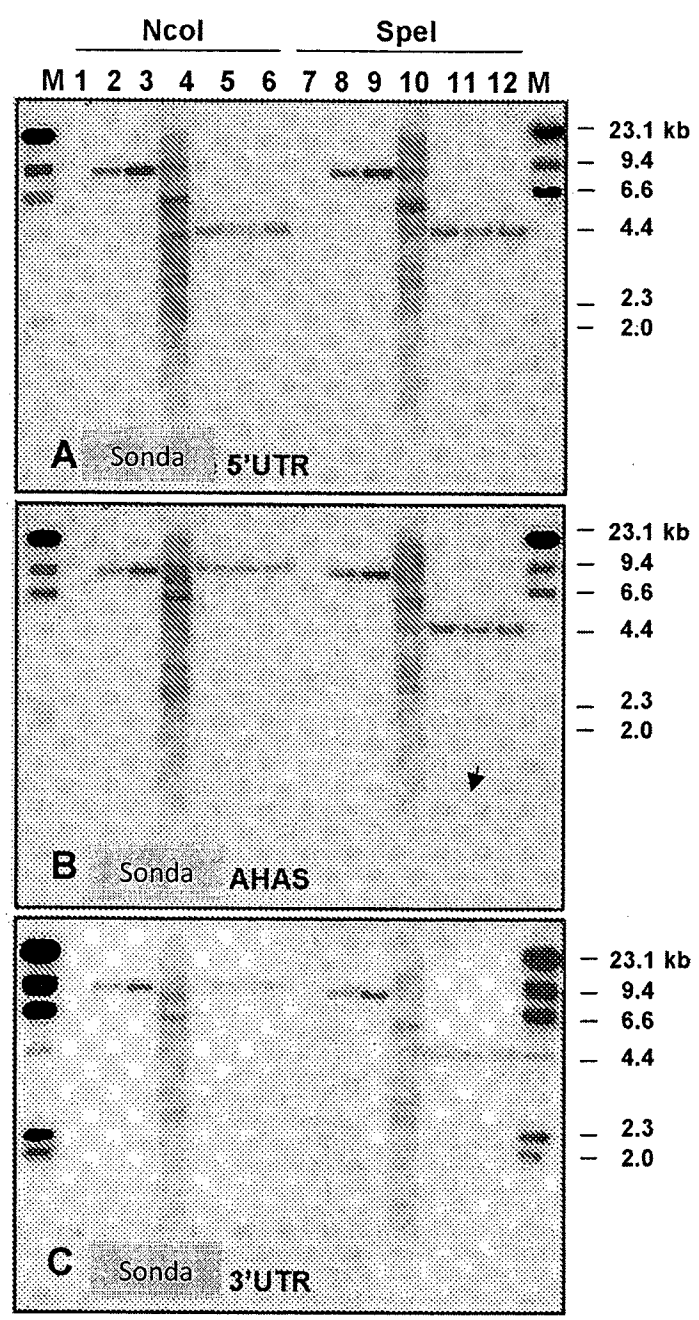


FIGURA 6A-C

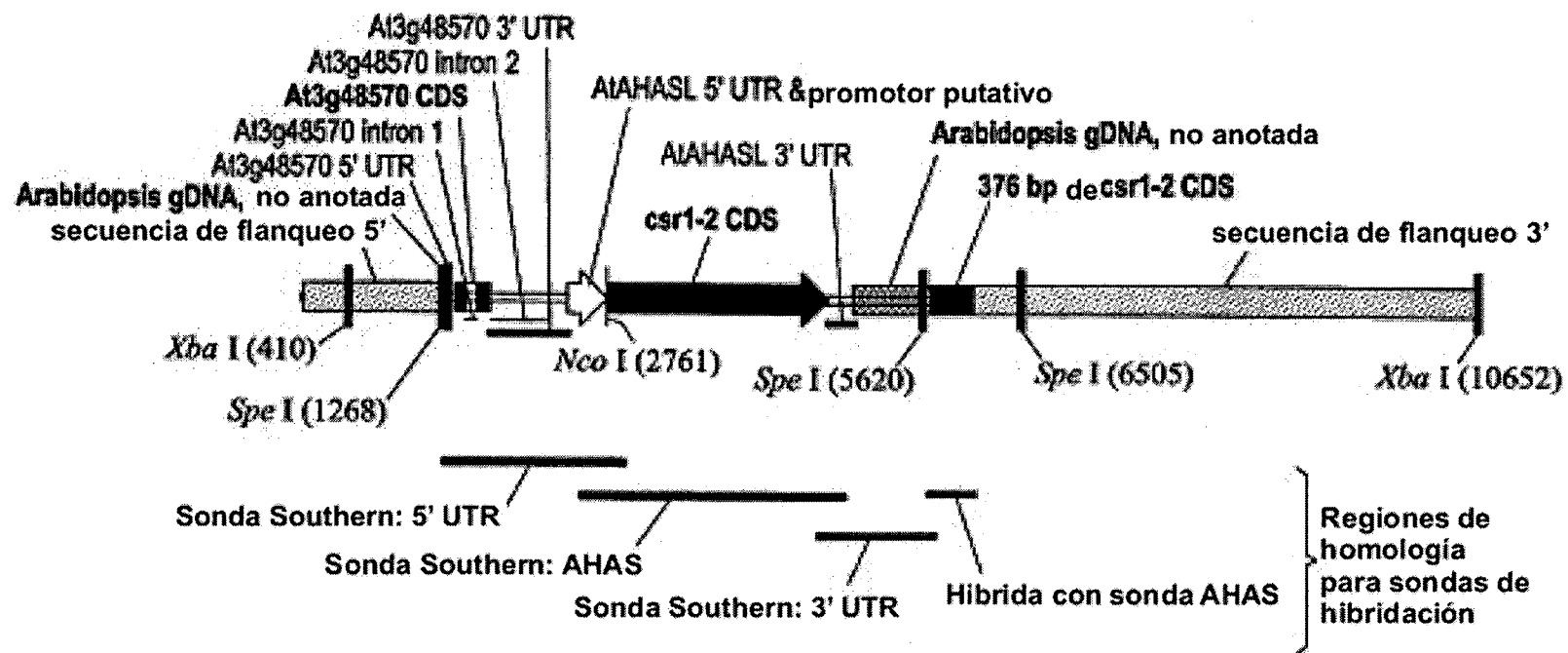


FIGURA 6D

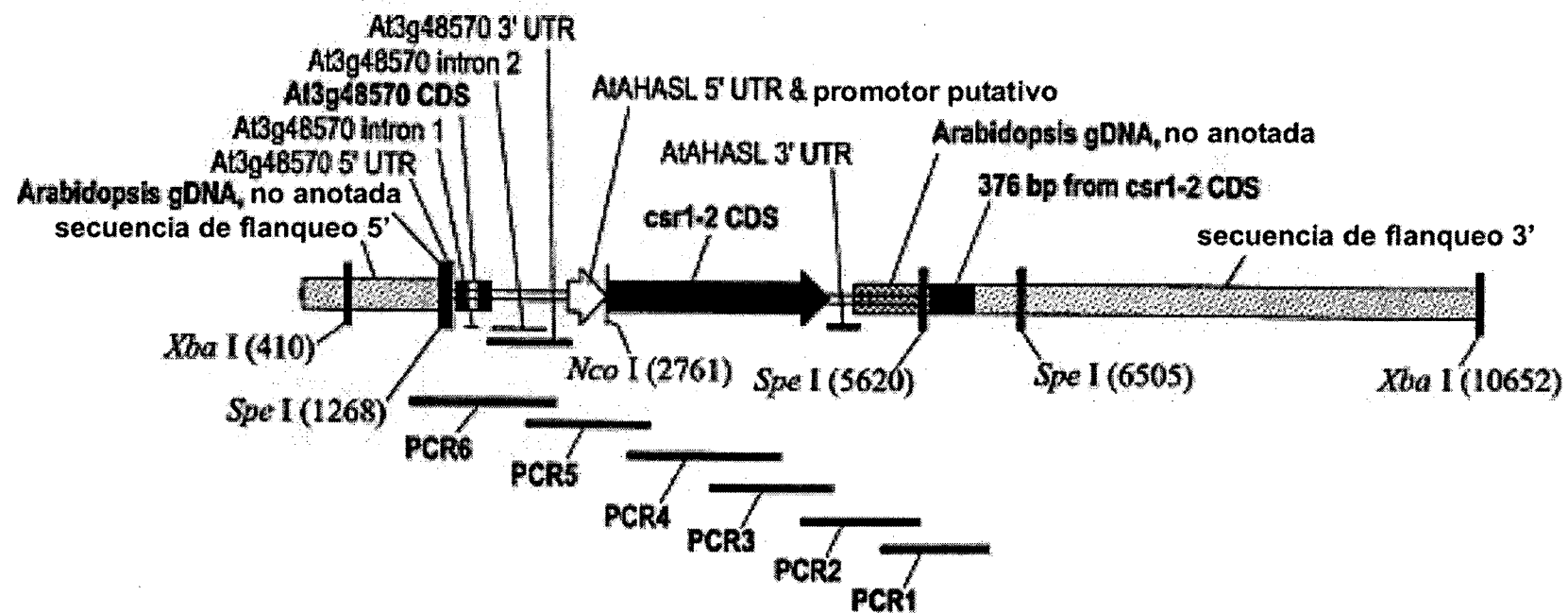


FIGURA 7

## FIGURA 8

```

1  gtgagactcc aacagcaaga gtcactttgt agcccactca aataaatgtg
51 aacattaata ggtggatttg gacaatacag gccccttggt ttaacaaggt
101 cttgcagttt cacttaaaaa ttcatagtag ttagaagaac taatattatg
151 tgccaactga caataaaaga aaaaacaatc tttccaattt atattacaca
201 taagacacag cctgaaaaaa gaagagagca tgtatctgta aacaagttag
251 gcatgatgcc aaaggagcag cagcataaca aaacaaacga aaattacaag
301 aaaatatggc ttaccagcat ggttgctggg aaggactgga tcaagaagtg
351 agcggcaatc aacaagtgtt actacagcat acttttctct ttgataatca
401 ggaaggcatc tagaggtcca tgcagcaatc attccagctg cagcaagtgc
451 cccacaaagt ttgatccctc ttgatttgca tccctacatg atcttgcata
501 attagcttaa acccatcaag ctagctacca gatcataagc aaaaagtggg
551 cagagtgccca tatcaattat tcacagaaat tagattataa cacattggat
601 gcataagaat gaatttcaat tacaaatacg cagagacaaa aaagaagata
651 atgtgacatt gaggtgctt tgtaccagga aaaataatag cagctgatat
701 tattagttat aattggctgc aaatttctcc aaattgtaaa tatgaatttc
751 attaactact ttatttagct gataaatcca attgatatta taaagagttt
801 ggatcaaacc atagggctgt gacctgtgaa acacaaactc ctcattcgta
851 ttagaggctc taccctccta atagctttgg ctttactgtc ttattgacta
901 tctttgtaaa tgtcttacia agactaatga cttctccaca atgtgccaat
951 taagtttatc ttttttgaaa aataaatggc tggatatctc atcccttaag
1001 aaaataggaa gtttaggctt gaaaatagag attgcaatag gcaagattaa
1051 tttagggcgt gtttgggaaa agtttgcac caacattctc ttttaattcag
1101 tacaagagct ccttcgccgt ttagtgtata ggaaagcgca aactgatgtt
1151 tggaagcttg aaacggcaat aaaatatcaa aatctttata ttaaagctga
1201 acaaaagggg cctccttat ttatcccctt agtttttatt ttcatttctt
1251 tctaataaag gggcaaacta gtctcgtaat atattagagg ttaattaaat
1301 ttatatctct caaataaaaac ccaattttca tccttaaacg aacctgctga
1351 aaccctaatt tcgattacca attccgatct aaaaagaagt catggaagcc
1401 attgattccg caatcgatcc tctcagagat ttcgctaaga gcagtgttcg
1451 tctcgtccag cgctgtcaca aaccgatcg caagggtaac gccttttctc
1501 aaaaaaatct catttccgat ttttgatctg tagattaggg ttttctgaaa
1551 ttttgatata atttgtaatt gaattgggta tcagaattca cgaaagtagc
1601 tgtgcgtacg gcgattggat ttgtggtgat gggattcggt ggattcttcg
1651 tgaagctcgt tttcatccca atcaacaaca tcatcgttgg atcttcttag
1701 tgtagtactt tctttacgag gtaattgatc tcgcattata tatctacatt
1751 ttgggttatgt tacttgacat atagtcattg attcaatagt tctgttaatt
1801 cctttaaaga tcattttgac tagaccacat tcttggttca ttcctcaata
1851 atttgtaatc atattgggtg atatagaagt agattgggta tagatcagat
1901 agtgggaagac tttaggatga atttcagcta gttttttttt ttggcttatt
1951 gtctcaaaag attagtgtt tgctgtctcc attgcttctg ctatcgacac
2001 gcttctgtct ccttgatatc ttattatatc tattcgtccc atgagttttg
2051 tttgttctgt attcgttcgc tctggtgtca tggatggagt ctctgttcca
2101 tgtttctgta atgcatgttg ggttgtttca tgcaagaaat gctgagataa
2151 aactcattt gtgaaagttt ctaaactctg aatcgcgcta caggcaatgc
2201 tccgaggagt aggaggagaa gaacgaacca aacgacatta tcagcccttt
2251 gaggaagctc ttagttttgt tattgttttt gtagccaaat tctccattct
2301 tattccattt tcaattatct cttgttcctt atagacctta taagtttttt
2351 attcatgtat acaaattata ttgtcatcaa gaagtatctt taaaatctaa
2401 atctcaaate accaggacta tgtttttgct caattcgtgg aaccaacttg
2451 cagcttgtat ccattctctt aaccaataaa aaaagaaaga aagatcaatt
2501 tgataaattt ctcagccaca aattctacat ttaggtttta gcataatcgaa
2551 ggctcaatca caaatacaat agatagacta gagattccag cgtcacgtga

```

2601 gttttatcta taaataaagg accaaaaatc aaatcccagag ggcatttttcg  
 2651 taatccaaca taaaaccctt aaacttcaag tctcattttt aaacaaatca  
 2701 tgttcacaag tctcttcttc ttctctgttt ctctatctct tgctcatctt  
 2751 tctcctgaac catggcggcg gcaacaacaa caacaacaac atcttcttcg  
 2801 atctccttct ccaccaaac atctccttcc tcctccaaat caccattacc  
 2851 aatctccaga ttctccctcc cattctccct aaaccccaac aaatcatcct  
 2901 cctcctcccg ccgcccgggt atcaaatcca gctctccctc ctccatctcc  
 2951 gccgtgctca acacaaccac caatgtcaca accactccct ctccaaccaa  
 3001 acctacaaaa cccgaaacat tcatctcccg attcgtcca gatcaacccc  
 3051 gcaaaggcgc tgatatcctc gtcgaagctt tagaacgtca aggcgtagaa  
 3101 accgtattcg cttaccctgg aggtgcatca atggagattc accaagcctt  
 3151 aaccgctct tctcaatcc gtaacgtcct tcctcgtcac gaacaaggag  
 3201 gtgtattcgc agcagaagga tacgctcgat cctcaggtaa accaggtatc  
 3251 tgatatagcca cttcaggtcc cggagctaca aatctcgta gcggattagc  
 3301 cgatgcgttg ttagatagtg ttctcttgt agcaatcaca ggacaagtcc  
 3351 ctgctcgat gattggtaca gatgcgtttc aagagactcc gattgttgag  
 3401 gtaacgcgtt cgattacgaa gcataactat cttgtgatgg atgttgaaga  
 3451 tatccctagg attattgagg aagctttctt tttagctact tctggtagac  
 3501 ctggacctgt tttggttgat gttcctaaag atattcaaca acagcttgcg  
 3551 attcctaatt gggaacaggc tatgaaatta cctggttata tgtctaggat  
 3601 gcctaaacct ccggaagatt ctcat ttgga gcagattggt aggttgattt  
 3651 ctgagtctaa gaagcctgtg ttgtatgttg gtggtggttg tttgaattct  
 3701 agcgatgaat tgggtaggtt tgttgagctt acggggatcc ctggtgcgag  
 3751 tacgttgatg gggctgggat cttatccttg tgatgatgag ttgtcggtac  
 3801 atatgcttg aatgcatggg actgtgtatg caaattacgc tgtggagcat  
 3851 agtgatttgt tgttggcgtt tggggtaagg tttgatgatc gtgtcacggg  
 3901 taagcttgag gcttttgcta gtagggctaa gattgttcat attgatattg  
 3951 actcggtga gattgggaag aataagactc ctcatgtgtc tgtgtgtggt  
 4001 gatgttaagc tggccttgca agggatgaat aaggttcttg agaaccgagc  
 4051 ggaggagctt aagcttgatt ttggagtttg gaggaatgag ttgaacgtac  
 4101 agaaacagaa gtttccgttg agctttaaga cgtttgggga agctattcct  
 4151 ccacagtatg cgattaaggt ccttgatgag ttgactgatg gaaaagccat  
 4201 aataagtact ggtgtcgggc aacatcaaat gtgggcggcg cagttctaca  
 4251 attacaagaa accaaggcag tggctatcat caggaggcct tggagctatg  
 4301 ggatttggaac ttctgctgc gattggagcg tctgttgcta accctgatgc  
 4351 gatagttgtg gatattgacg gagatggaag ctttataatg aatgtgcaag  
 4401 agctagccac tattcgtgta gagaatcttc cagtgaaggt acttttatta  
 4451 aacaaccagc atcttggcat ggttatgcaa tgggaagatc ggttctacaa  
 4501 agctaaccga gctcacacat ttctcgggga tccggctcag gaggacgaga  
 4551 tattcccga catgttgctg tttgcagcag cttgcgggat tccagcggcg  
 4601 agggtgacaa agaaagcaga tctccgagaa gctattcaga caatgctgga  
 4651 tacaccagga ccttacctgt tggatgtgat ttgtccgcac caagaacatg  
 4701 tgttgccgat gatcccgaaat ggtggcactt tcaacgatgt cataacggaa  
 4751 ggagatggcc ggattaaata ctgagagatg aaaccggtga ttatcagaac  
 4801 cttttatggt ctttgtatgc atatggtaaa aaaacttagt ttgcaatttc  
 4851 ctgtttggtt tggtaatttg agtttctttt agttgttgat ctgcctgctt  
 4901 tttggtttac gtcagactac tactgctgtt gttgtttggt ttctttctt  
 4951 tcattttata aataaataat ccggttcggt ttactccttg tgactggctc  
 5001 agtttggtta ttgcgaaatg caaatggtaa attgagtaat tgaaattcgt  
 5051 tattagggtt ctaacctgtt ttaacagtca ctgggttaat atctctcgaa  
 5101 tcttgcatgg aaaatgctct taccattggt ttttaattga aatgtgctca  
 5151 tatgggccgt ggtttccaaa ttaataaaaa ctacgatgtc atcgagaagt  
 5201 aaaatcaact gtgtccacat tatcagtttt gtgtatacga tgaaataggg  
 5251 taattcaaaa tctagcttga tatgcctttt ggttcatttt aaccttctgt  
 5301 aaacattttt tcagattttg aacaagtaaa tccaaaaaaa aaaaaaaaaa

5351 atctcaactc aacactaaat tattttaatg tataaaagat gcttaaaaca  
 5401 tttggcttaa aagaaagaag ctaaaaacat agagaactct tgtaaattga  
 5451 agtatgaaaa tatactgaat tgggtattat atgaattttt ctgatttagg  
 5501 attcacatga tccaaaaagg aaatccagaa gcactaatca gacattggaa  
 5551 gtaggaatat ttcaaaaagt tttttttttt taagtaagtg acaaaagctt  
 5601 ttaaaaaata gaaaagaaac tagtattaaa gttgtaaatt taataaacia  
 5651 aagaaatttt ttatatTTTT tcatttcttt ttccagcatg agggatctta  
 5701 tccttgtgat gatgagttgt cgttacatat gcttggaatg catgggactg  
 5751 tgtatgcaaa ttacgctgtg gagcatagtg atttggtgtt ggcgtttgga  
 5801 gtaaggtttg atgacgtgtg cacgggtaag cttgaggctt ttgctagtag  
 5851 ggctaagatt gttcatattg atattgactc ggctgagatt gggaagaata  
 5901 agactcctca tgtgtctgtg tgtggtgatg ttaagctggc tttgcaaggg  
 5951 atgaataagg ttcttgagaa ccgagcggag gagcttaagc ttgatttttg  
 6001 agtttgaggg aatgagttga acgtacagaa acagaagttt ccgttgagct  
 6051 ttaagacgtt tggggaagct gtcccatgcc catcaaagaa gacagtacac  
 6101 gatccgagct acgaatgggt aggcccaata aggcgagaag ggccaccag  
 6151 tccaatgagg gaagacaaac taacacaaaa taccatcta ataaggacct  
 6201 ataagtttgt attttttaaa tgtatttgaa aaattcaaac aatttttaat  
 6251 tgtaattttt ttttcctaaa attaaacaaa catatttttg tagaagcaaa  
 6301 gatatcataa tgttttgatg atgctaaaga aacacgcttc tcaagtttga  
 6351 tccaaaataa aactctaaga aattcaagat aaatgataaa gttagtctat  
 6401 agagtcttag aaagaagttt ctaaattgat gatgcataag ttatgaccaa  
 6451 aggttttttc tcaaaagctt ttaaaagaga tattttattct ctgataatca  
 6501 attactagtg acaaaaatgt ttactggaat gctttaaaat gtttttaata  
 6551 ttttgaaagc ttgtaatcga ttacacaaga cttgtaatcg attacaaaaa  
 6601 gttttgaaca ttttaagaca acctttagaa atttgaattt aaatttcaaa  
 6651 gtctgtaatc gattaccaga attaaaatta aaattttaga tgtgaagagt  
 6701 caaaagtctt cagaaaacaa ttgtgtaatc gattacacca ttttggtaat  
 6751 cgattaccac tgagaaattt tctaaaatat ctccgaacag ttacatcttt  
 6801 tcaaatgatt ttgaatgacc attaaaggct tatatataag tgacttgggg  
 6851 catgaatttt cagagagttt ttctgaactg aaatgtttta tcctctcaaa  
 6901 aatgattcct tggcttaaca cttgcatatt taataaagaa tcttgattga  
 6951 tcttcaattg taatatcctt cttttaaaga gagaaacttc ttcttcttct  
 7001 tattcaaagg aaattgttta agagaccgag gatctcttaa atggtaagga  
 7051 ttctgaaca caatggaagg attatccttg tgtgattcag actttgtaaa  
 7101 aggggttttt acaaagagag tggaaaatct caagtgggtt gcttgagtga  
 7151 ggacttgacg taggcatgaa aaatggctga accagtataa attaagttta  
 7201 catttctctc ttcccttaac cttcttttat ttattgttat ttatctttta  
 7251 ttttaaaaaa gtttattttg aattgtcttt tgagtaattc atattaatgg  
 7301 tgcattgtta attcaaaaaa agagtggaaat tttaattgag aaatagtttt  
 7351 tgtatcttaa ttcaatcccc ttttcttaag ataactgaga tcacttgtct  
 7401 aacaattttg tgtataatta cattcaataa tttttttagt taatatctta  
 7451 aatatataaa ttccaaactc ttgaaattaa aaaaatatgc ataatttatt  
 7501 taataaattt aaatttttagg aaaaaaagtt aaggggtcat taaatttgat  
 7551 aaaaagttaa gaatattatt gaattttata atttttttta tagaaaatag  
 7601 tgaaaacaat aaaagttttt ttctatttct taacaaccct ttcaataaaa  
 7651 aaatgaaatg aaaataatat gacattttta taattaagag taatataaaa  
 7701 ataaaaataa ataattttta accaaaggac tcataagcat gttattgctc  
 7751 taccactcat aaaaattttt ctctatttat ctttttgatg ataaaatatt  
 7801 gtcatactag aaataaaata tattttttct atatcctcta tatgagtcaa  
 7851 tcttattttta agtacaatgt tactgaaagt cattttgcaa taaaaatctt  
 7901 ccaagatttt tcccaaacia ttgttgtaat tttagttctt taaaatatac  
 7951 atataaaaaat gcattatttg tatggtataa tataaataat agaaacaata  
 8001 tcaacatttc tcattgagta ttgagaagct aaagtaaatt acttgactac  
 8051 attgccgtag tgcgacgaat tagattgtaa tatctaaaat acttaagtag

```

8101 tgtagataag tctatgaatg tttttcagat taattgcacg ataatttttt
8151 ttaattctac tataattcca tattttatttg aaaaacttca tgataacatg
8201 catcctttat ttattacatt aaccttctta aatatttcaa atatcacggt
8251 tcaactgcaag aaaagtttta taatctttta taagcttcat acatgctcgt
8301 accttcccac aataagccaa tttgggtctg ccaatgtcct cactcttgaa
8351 aaaggaaaat ataaacctca aagtgatcat gtgatatgat aaaaatttaa
8401 aaatatataa attcatagag aaaaaaagga atgaaaatga attgtaagaa
8451 agtgaaatgt atgaaaatct gaactcattc aaaatcatat aagaaaataa
8501 accgtggaag aaaacgagca tcacattcac ataacatgtt ctgctccaac
8551 actaattatt ctgctaccgc agatatagca accagagtgg ccattttatt
8601 acatttgtag cgatccatgc atttacgtac actccatcta gctaaacatc
8651 atatcactac taacatgaca caaataaagg aaaaaactca gaatgtcagc
8701 ttgaagttta atagatttcc tcttttaata acatttaa atgattttatt
8751 tttataataa aaatatcttt aaaaatattt atttagtagt tatttttagc
8801 ataaatatta ggaattgata cttttcttat ttatgacttg cagatataaa
8851 aatgaagaat taaaagtaaa gaaaatccaa aaaatatcaa aaatataaat
8901 aaggaagatt ttttggcgtc agaccaagt tcattccaac agctgtaatt
8951 ttttcagatt aaaaaggatg aatgatgaat gaaattaaaa gtaagaaagg
9001 aataaagaca caccgagtct cggagcaatc taatacacac cttaaagcctg
9051 agaactctcc cttaggaaat tcttcttct ctttcatcat tctttatttc
9101 ctttttccat ctcttctctt ccatcagttc gtatatccct ttgctagtgt
9151 aaaaccctt atggttatga gaggctaaac cttagtttag ggttgacag
9201 gcttaaaaag tcaaaagatg tattatacac ttcataattt tcaatgcaaa
9251 cagatgtttt ctttcctatt atccttctt atttctaatt tcatgcatca
9301 ttcaccttg cattatcttt gggggttagg tgctcgacaa aggataatcc
9351 caaagaaggt tttgcatgta tctatttcag gaattagtcg ctcgacagag
9401 agtaatttct aataaaaacta aaaagaagaa atatcttaat aaaatcattg
9451 ttagacataa aatgattgta ttatgccat gcacaaagc aaacatatag
9501 aattataact tcatgtattt tatctattgg ctctttgcaa aaacatttgg
9551 aagatagata ggtaaaatag gtgagacatc aggtatttta atagatgtga
9601 gtaagataaa ttcacctgat agagaaaatc ataaataata tatcttagac
9651 aaataagaca tgctaggtcc taacattttc atcccattga attcactatt
9701 ttttcttttg ttatttagta ataattatta ttttatactc tgttctttta
9751 aaattatctt ttatacctat cttatatatt tctcttataa attaaaaatt
9801 atccaacaca aatacaaaac aaagttaaaa tcgacactca agacttccga
9851 gtttttgatc aaaaagcctt tctatctttc ctcttgcggt ctgctccatt
9901 ttagaagaaa aggaaccaat taataaaatg gacagcgcaa tcaaataagt
9951 aaaaatttac ttaatataat gatgcatgat agctagaagg gtaccaataa
10001 tttaaccctg atcaataacg tcaatagaga ctctcccaa accccaaatt
10051 agggatatcg tgatccttat gaaaaccccg aaataaataa attgaaagga
10101 accctaaacg cgaaacccta tatttgcatc gtggaagcgc agaaaacttc
10151 actgagataa atgaagtcgg atagaacata gattctcgta gatcatccat
10201 cacaaccctt aaaagaagta ttagattttc gcgttcggag aaacaaacct
10251 gagtggtaga aacgaagctt gatttgttgg aacgattgtt gagagaaaga
10301 acagagagca aaataaggct tctattttct taatcaaacg ttggtgtttg
10351 ttgccaatgt tgtgttaggc ttatttataa tttctctggt agcttgtaaa
10401 gcacgcaaca ataagatgag atataggatt ttttttttat tttaaaaaaa
10451 aagacatttg ccgtcatata aggataaatt aaggcttaaa aaaagatagt
10501 tattttcttt aaaaaaataa ttatttctga aatttaatat tttgaagata
10551 gtttgaattt acttatgaaa atatttggtt tgagtttcaa tttataaaat
10601 catttctagt gtgggaagtt acatttcggt tggattagaa attttaaaat
10651 tctaga

```

FIGURA 8

15/19

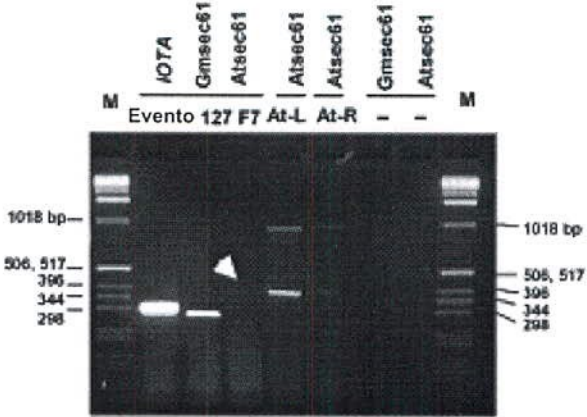


FIGURA 9

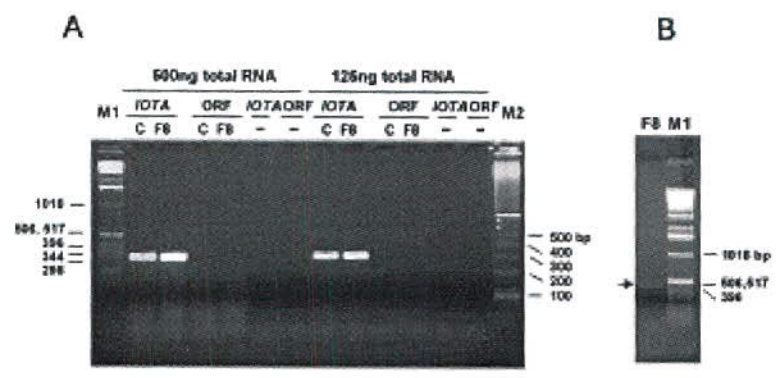


FIGURA 10

17/19

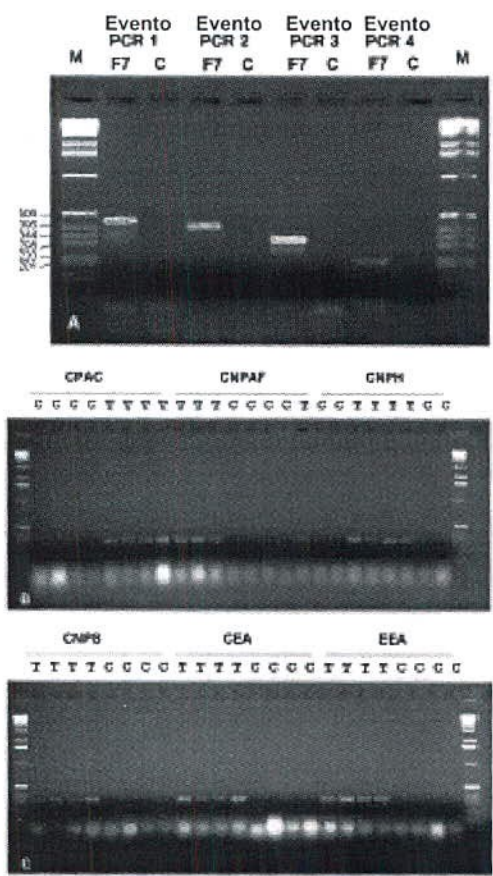


FIGURA 11

FIGURA 12 - fragmento PvuII pAS321 6156 bp

ctggcagcacagggttcccgactggaaagcgggcagtgagcgcaacgcaattaatgtgagttagctcactcattaggcacc  
 ccaggctttacactttatgcttccggctcgatgttgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagctatga  
 ccatgattacgccaagctcgaaattaaccctcactaaagggaacaaaagctggagctccaccgcggtggcggcgctcta  
 gattatgtattccaactttcattaacaatataatcgcatataaatgaaaaatcgttccaggataatattttagtgaatctcatatt  
 attgttcgtactcggattgatgttgaaggcttgaagcgttcaaattatagaccagattatttaagttttctttgttactccatatac  
 aatttgatccattatactacctaagaaaatttaggtaacatagaattatttattgttatagtaaaaaaaggaaaaccacaaaaat  
 aatctacttttacgtatatactattttcatgacataagtaattaagttgtacaacttttttaaatgaaaagagagagtaaatatcat  
 gttcatgtgtagttacctcgtgaataaccgacgggtatataagcgcctaacaatgaattgttcagttgaagacagttcaaaacatg  
 tgttcactctaaaatcctcaacaaaaaaaagtgtaaaattgtaaacctcttcaagcaaaaaaagaaaagtgtagaatc  
 ccaagattcttcatatccggaatcttggctgaaaacgtataaaagagattgacgtagtaacaaggagcttgggtatgcttcc  
 atgctttttatcctttttgtcatggaacatgattgggtaccatttattatgaaccgaaatttcttgaataatgaatatttaattt  
 ttagcaaaaaaaaacaaaaaaaacaaggagcttctgtctcgttctcaaatttcagagctctgcacttttcaagagttttacttt  
 gatgagtgagacatttgtcttttttagtgttttttctaaacttaaaatagtagcatcaacatcactcaattataattcttaagatgttg  
 tagaaaaatattttatagatggaaagtaatcgatattaagacaaataagaaaccaaaccggacttgtgttcagaccgaatcaa  
 atctgaattggagaaattatgggtggaggcgaaagtcaacggaactaaagtataaaaccaaagtcaaaaaataaaacccaatt  
 ttcactccttaaacgaacctgctgaacacctaatctgattaccaattccgatctaaaaagaagtcaggaagccattgattccgc  
 aatcgatcctctcagagatttcgctaagagcagtggtcgtcgtccagcgtgtcacaacccgatcgcaagggtaacgcc  
 ttttctcaaaaaaatctatttccgattttgtatctgtagattagggtttctgaaatttgatatcatttgaattgaattgggtatcag  
 aattcacgaaagtagctgtgcgtacggcgattggatttgggtgatgggattcgttggattcttctgaagctcgtttcatccc  
 aatcaacaacatcatcgttggatcttcttagttagtactttcttacagggttaattgatctcgattatatactacatttgggtatg  
 ttacttgacatatagtcattgattcaatagttctgttaattcctttaagatcattttgactagaccacattcttgggtcattcctcaat  
 aatttgaatcatattgggtgatatagaagtagattgggtatagatcagatagtggaagactttaggatgaatttcagctagttttt  
 ttttggcttattgtctcaaaagattagtgcttctgtctccattgcttctgctatcgacacgcttctgtccttctgtatctttattat  
 ctatctgctccatgagtttgttctgtatctgctcgtcgtggtgtcatggatggagctctgttccatgttctgtaatgcatgtt  
 ggggtgttcatgcaagaaatgctgagataaacactcatttgaaggttctaaactctgaatcgcgctacaggcaatgctcc  
 gaggagtaggaggagaagaacgaaccaaacgacattatcagccctttgaggaagctcttagtttgtattgtttttagcca  
 aattctcattcttattcattttcattatcttctgttcttatagacctataagtttttattcatgtatacaaatatattgtcatcaag  
 aagtatctttaaatactaaatctcaaatcaccaggactatgttttgcgaattcgtggaaccaacttcgagcttgtatccattctc  
 taaccaataaaaaaagaaagaaagatcaattgataaattctcagccacaaattctacatttaggttttagcatatcgaaggct  
 caatcacaataacaatagatagactagagattccagcgtcacgtgagttttatctataataaaggaccaaaaaatcaaatccc  
 gagggcattttcgtaatccaacataaaacccctaaactcaagtcatttttaacaaatcatgttcacaagtccttcttctc  
 tgtttctctatcttctgctcatcttctcctgaacctggcggcggaacaacaacaacaacatcttctcgatctcctctcc  
 accaaacctctccttctcctccaaatcaccattaccaatctccagattctcctccattctcctaaacccaacaaatcat  
 cctcctcctcccgccgcccgggtatcaaatccagctctcctcctccatctccgcccgtgctcaacacaaccaccaatgtcac  
 aaccactcctctccaacaaacctaccaaacccgaaacattcatctccgattcgtccagatcaaccccgaagggcgc  
 tgatctcctcgtcgaagctttagaacgtcaaggcgtagaacccgtattcgttaccctggagggtgcatcaatggagattcacc  
 aagccttaacccgctcttctcaatccgtaacgtccttctcgtcacgaacaaggaggtgattcgcagcagaaggatacgc  
 tcgatcctcaggtaaaccaggtatctgtatagccactcaggtcccggagctacaaatctcgttagcggattagccgatgct  
 tgttagatagtggtcctctgttagcaatcacaggacaagtcctcgtcgtatgattggtacagatgcgtttcaagagactccgat  
 tgttgaggtaacgcgttcgattacgaagcataactatctgtgatggatgttgaagatccctaggattattgaggaagcttct  
 ttttagctacttctggtagacctggacctgttttgggtgatgttctaaagatattcaacaacagcttgcgattcctaattgggaac  
 aggctatgagattacctgggtatattgtctaggatgcctaaacctccggaagattctcatttgagcagattgttaggttgatttct  
 gactctaagaagcctgtgtgtatgttgggtggtgttgaattctagcgatgaattgggtagggttgttgagcttacggggat  
 ccctgttgcgagtacgttgatggggctgggacttatcctgtgatgatgagttgtcgttacatatgcttgggaatgcatgggact  
 gtgtatgcaaattacgctgtggagcatagtgatttgttggcggttgggtaagggttgatgatcgtgtcacgggtaagcttg  
 aggttttctagtagggcctaagattgtcatattgatattgactcggctgagattgggaagaataagactcctcatgtctgt  
 gtgtggtgatgttaagctggcttgaagggtgaataaggttcttgagaaccgagcggaggagcttaagcttgatttggag  
 tttggagggaatgagttgaacgtacagaaacagaagttccgttgagctttaaagcgttggggaagctattcctccacagtatg

cgattaaggtccttgatgagttgactgatggaaaagccataataagtactgggtgcgggcaacatcaaatgtggcgggcgc  
 agttctacaattacaagaaaccaaggcagtggtatcatcaggaggccttggagctatgggatttgacttctgctgcgatt  
 ggagcgtctgttgtaaccctgatgcatagttgtggatattgacggagatggaagcttataatgaatgtgcaagagctagc  
 cactattcgtgtagagaatctccagtgaaaggtactttattaaacaaccagcatctggcatggttatgcaatgggaagatcg  
 gttctacaaagctaaccgagctcacacatttctcggggatccggctcaggaggacgagatattccgaacatgttgctgtttg  
 cagcagcttgcgggattccagcggcgagggtgacaaagaaagcagatctccgagaagctattcagacaatgctggatc  
 accaggaccttacctgttgatgtgattgtccgcaccaagaacatgtgtgccgatgatcccgaatggtggcactttcaacg  
 atgtcataacggaaggagatggccggattaaatactgagagatgaaaccggtgattatcagaacctttatggtctttgtatgc  
 atatggtaaaaaacttagtttgaatttctgtttgtttggttaattgagtttcttttagttgtgatctgcctgcttttggttacgt  
 cagactactactgctgttgtttgtttgtttctttctttcattttataataaataatccgggtcgggttactccttgtgactggctcag  
 tttggtattgcgaaatgcgaatggtaattgagtaattgaaattcgttattagggttctaagctgttttaacagtcactgggtta  
 atctctcgaatcttgcatggaaaatgctcttaccattggttttaattgaaatgtgctcatatgggccgtggtttccaaattaata  
 aaactacgatgtcatcgagaagtaaaatcaactgtgtccacattatcagtttgtgtatacgatgaaatagggttaattcaaaatc  
 tagcttgatatgccttttggttcattttaaccttctgtaaacatttttcagatttgaacaagtaaatccaaaaaaaaaaaaaaaa  
 atctcaactcaacactaaattattttaatgtataaaagatgcttaaaacatttggctaaaagaaagaagctaaaaacatagaga  
 actcttgtaattgaagtatgaaaataactgaattgggtattatgaattttctgatttaggattcacatgatccaaaaggaa  
 atccagaagcactaatcagacattggaagtaggaatatttcaaaaagttttttttaagtaagtacaaaagcttttaaaaaat  
 agaaaagaaactagtattaaagttgtaatttaataacaaaagaaatttttatatttttcatttctttccagcatgagggtatga  
 tggcaggatgtggatttcatttttcttttgatagccitttaattgatctattataattgacgaaaaatattagtttaattatagatat  
 atttaggtagtattagcaatttacacttcaaaaagactatgtaagttgtaaatatgatgcgttgatctctcatcattcaatgggtta  
 gtcaaaaaataaaaagcttaactagtaactaaagtagtcaaaaattgtacttttagtttaaaatattacatgaataatccaaaac  
 gacatttatgtgaaacaaaaacaatatctagaactagtggatccccgggctgcaggaattcgatatcaagcttatcgatacc  
 gtcgacctcgagggggggcccggtacccaattcgccctatagtgagtcgtattacaattcactggccgtcgtttacaacgtc  
 gtgactgggaaaaccctggcgttacccaacttaatcgccctgcagcacatcccccttccgag



No. 11-095145- -00000-0000

Fecha: 2011-07-28 17:41:29 Dep. 2020 DIR NUEVASCR  
Tra 11 PATENTEIYII Lve. 378 FASENACIONALI  
Act 411 PRESENTACION Folios: 198

199

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO D

|                                   |                                                                                     |
|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/>          | Indicación que se solicita una patente.                                             |
| <input type="checkbox"/>          | Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud   |
| <input type="checkbox"/>          | Descripción de la invención                                                         |
| <input type="checkbox"/>          | Dibujos de ser estos pertinentes                                                    |
| <input type="checkbox"/>          | Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento) |
| Completa <input type="checkbox"/> | Incompleta <input type="checkbox"/>                                                 |

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

|                                              |                                                                                                                         |
|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/>          | Indicación que se solicita una PCT                                                                                      |
| <input checked="" type="checkbox"/>          | Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen) |
| <input checked="" type="checkbox"/>          | Dibujos de ser estos pertinentes                                                                                        |
| <input checked="" type="checkbox"/>          | Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)                                     |
| Completa <input checked="" type="checkbox"/> | Incompleta <input type="checkbox"/>                                                                                     |

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

|                                   |                                                                                                           |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/>          | Indicación que se solicita Diseño industrial                                                              |
| <input type="checkbox"/>          | Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud                         |
| <input type="checkbox"/>          | Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño |
| <input type="checkbox"/>          | Comprobante de pago de las tasas establecidas                                                             |
| Completa <input type="checkbox"/> | Incompleta <input type="checkbox"/>                                                                       |

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

|                                   |                                                                                   |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/>          | Indicación que se solicita un esquema de trazado                                  |
| <input type="checkbox"/>          | Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud |
| <input type="checkbox"/>          | Representación gráfica de un esquema de trazado                                   |
| <input type="checkbox"/>          | Comprobante de pago de las tasas establecidas                                     |
| Completa <input type="checkbox"/> | Incompleta <input type="checkbox"/>                                               |