

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD FASE NACIONAL - PCT

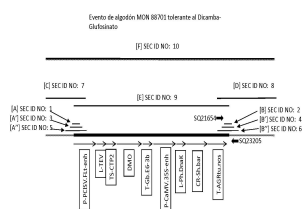


FIGURA 1

1	Título de la Invención (200 caracteres o espacios máximos)		
EVENTO DE ALGODÓN TRANSGÉNICO MON 88701 Y SUS MÉTODOS DE USO			
2	Datos del Solicitante / Titular		
Nombre:	MONSANTO TECHNOLOGY LLC	Dirección Electrónica:	sic@castellanosyco.co
Dirección:	800 NORTH LINDBERGH BOULEVARD, ST. LOUIS, MISSOURI, 63167, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	Domicilio/País de constitución:	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA - MISSOURI - ST. LOUIS
Identificación:			
☐ CEDULA DE CIUDADANIA ☒ EMPRESA EXTRANJERA ☐ NIT		☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ IDENTIFICACION INTERNACIONAL ☐ PASAPORTE	

Número:		2463470326-	
3	Solicitantes		
Apellidos - Nombres o Razón Social		Tipo	Identificación
1.	MONSANTO TECHNOLOGY LLC	EE	2463470326
4	Datos del Inventor		
Nombre:		RONALD BRINKER	Dirección Electrónica: sic@castellanosyco.co
Dirección:		800 NORTH LINDBERGH BLVD., ST. LOUIS, MISSOURI 63167, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	Domicilio/País de constitución: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA - MISSOURI - SAINT LOUIS
Identificación: ☐ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ NIT ☒ No Aplica ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ IDENTIFICACION INTERNACIONAL ☐ PASAPORTE Número: -			
5	Inventor(es)		
Apellidos - Nombres		Domicilio	
1.	BRINKER RONALD	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	
2.	BURNS WEN C.	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	
3.	FENG PAUL C.C.	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	
4.	LECLERE SHERRY	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	
5.	LUTKE JENNIFER LYNN	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	

6.	MALVEN MARIANNE	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA		
7.	KENDIG JOHN, A.	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA		
6	Datos Inventor(es)			
	País de Residencia	Departamento/Estado	Ciudad	Dirección
1.	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	MISSOURI	SAINT LOUIS	800 NORTH LINDBERGH BLVD., ST. LOUIS, MISSOURI 63167, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
2.	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	MISSOURI	SAINT LOUIS	800 NORTH LINDBERGH BLVD., ST LOUIS, MISSOURI 63167, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
3.	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	MISSOURI	SAINT LOUIS	800 NORTH LINDBERGH BLVD., ST LOUIS, MISSOURI 63167, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
4.	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	MISSOURI	SAINT LOUIS	800 NORTH LINDBERGH BLVD., ST. LOUIS, MISSOURI 63167, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
5.	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	MISSOURI	SAINT LOUIS	800 NORTH LINDBERGH BLVD., ST. LOUIS, MISSOURI 63167, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

6.	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	MISSOURI	SAINT LOUIS	800 NORTH LINDBERGH BLVD., ST. LOUIS, MISSOURI 63167, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
7.	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	MISSOURI	SAINT LOUIS	800 NORTH LINDBERGH Blvd., ST LOUIS, MISSOURI 63167, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
7	Datos del Representante Legal / Apoderado			
Nombre:		MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO	Dirección Electrónica:	sic@castellanosyco.co
Dirección:		CALLE 94A No. 7A-09	Domicilio/País de constitución:	COLOMBIA - BOGOTA D.C. - BOGOTA D.C.
Identificación: ☒ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ IDENTIFICACION INTERNACIONAL ☐ NIT ☐ PASAPORTE Número: 39779654-				
Presentación de Poder				
Año de Radicación				
Número de Radicación				
8	Datos Solicitud: PCT / WO			
Número Solicitud:		PCT/US2012/028949	Fecha Solicitud:	13/03/2012
Número Publicacion:		WO2012/134808	Fecha Publicacion:	04/10/2012
9	Declaraciones de prioridad		☒ SI ☐ NO	
1.	(33) País de origen ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	Codigo del país US	(31) No. Solicitud 61/469,118	(32) Fecha 30/03/2011
10	Reivindicaciones			

	Número reivindicaciones:	33	Pago Reivindicaciones:	Si
11	Reducción de tasas.			
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i> ☐ SI ☒ NO Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.				
☐ Micro, pequeñas y medianas empresas ☐ Universidades públicas o privadas ☐ Entidades sin ánimo de lucro Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos				
12	Documentos Anexos			
☒ Reivindicaciones ☒ Descripción ☒ Dibujos y/o Figuras ☒ Resumen ☒ Certificado Depósito Material Biológico ☐ Uso de Conocimiento tradicional ☒ Listado de secuencias ☒ Artes finales 12 x 12 cm ☒ Poderes, si fuere el caso ☐ Copia de la primera solicitud si se reivindica prioridad ☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad ☒ Otros Anexos				

Evento de algodón MON 88701 tolerante al Dicamba-
Glufosinato

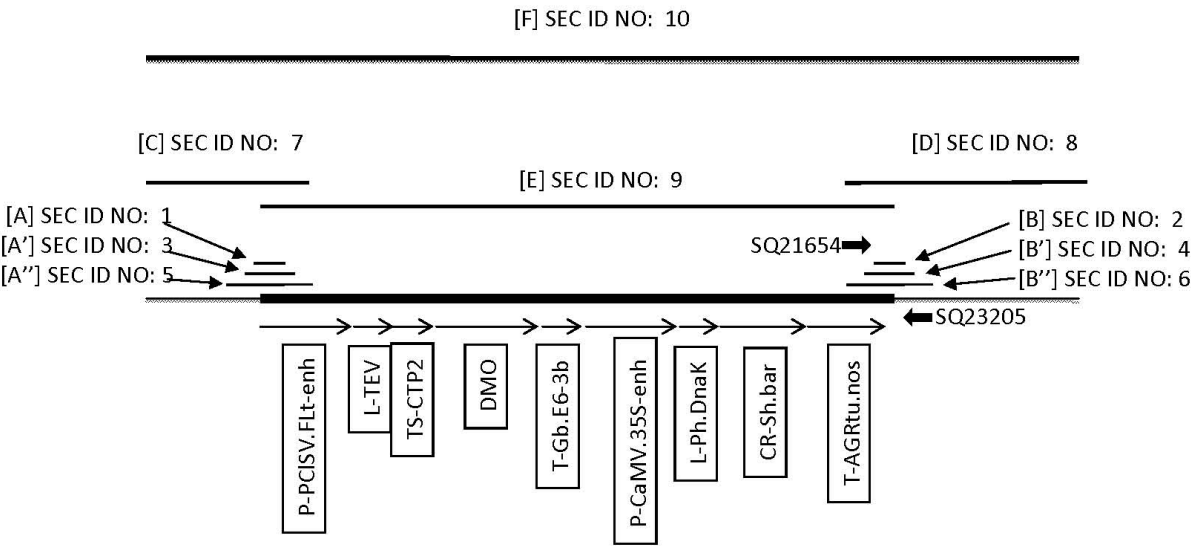


FIGURA 1

EVENTO DE ALGODÓN TRANSGÉNICO MON 88701 Y SUS MÉTODOS DE USO

REFERENCIA CRUZADA CON SOLICITUDES RELACIONADAS

- 5 Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud de Patente Provisoria de los Estados Unidos No. 61/469,118, presentada el 30 de marzo de 2011, incorporada a la presente como referencia en su totalidad.

INCORPORACIÓN DEL LISTADO DE SECUENCIAS

- 10 El listado de secuencias contenido en el archivo denominado "MONS302US.txt", de 21 kilobytes (medida de Microsoft Windows®) y fue creado el 9 de marzo de 2012, se adjunta a la presente en formato de copia electrónica y se incorpora a la presente a modo de referencia.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

- 15 La presente invención se refiere al evento transgénico *Gossypium hirsutum* MON 88701. El evento exhibe tolerancia a los herbicidas dicamba y glufosinato. La invención también se refiere a plantas, partes de planta, semillas de planta, células de planta, productos agrícolas, y métodos relacionados con el evento MON 88701 y proporciona moléculas de nucleótidos que son únicas al evento y que fueron creadas en conexión con la inserción de ADN transgénico en el genoma de la planta *Gossypium hirsutu*.
- 20

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

- 25 El algodón (*Gossypium hirsutum*) es un cultivo importante en diversas áreas del mundo, y se han aplicado a este cultivo los métodos de biotecnología a fin de producir algodón con características deseadas. Una característica deseada es la tolerancia a los herbicidas. La expresión de un transgén con tolerancia a los herbicidas en una planta puede otorgar la característica deseada de la tolerancia al herbicida a la planta pero la expresión del transgén puede estar influenciada por la localización cromosómica y el resultado genómico de la inserción del transgén. Por ejemplo, se ha observado que en las plantas existe por lo general una
- 30 variación en el nivel y patrón de expresión del transgén dentro de los eventos
- 227.283

individuales que difieren en el sitio de inserción cromosómico del transgén pero que de lo contrario son idénticos. También pueden existir diferencias agronómicas o fenotípicas no deseables y/o deseables entre eventos. Debido a esto, es por lo general necesario producir y analizar una gran cantidad de eventos de transformación de plantas individuales a fin de seleccionar un evento que tenga tanto las características deseadas como las características fenotípicas y agrícolas óptimas necesarias para que puedan comercializarse. Dicha selección requiere por lo general pruebas en campos e invernaderos con varios eventos durante múltiples años, en distintos lugares, y bajo una variedad de condiciones de modo que se pueda obtener una cantidad significativa de datos moleculares, fenotípicos y agrícolas. Las observaciones y los datos obtenidos, deben ser luego analizados por un grupo de científicos y agrónomos con el fin de seleccionar un evento que sea comercialmente adecuado. Dicho evento, una vez seleccionado, debe ser luego utilizado para introgresar las características deseadas en otros antecedentes genéticos utilizando métodos de fitomejoramiento de plantas y por lo tanto producir una cantidad de diferentes variedades de cultivo que contienen las características deseadas y que se adaptan en forma adecuada a condiciones de crecimiento locales específicas.

SÍNTESIS DE LA INVENCIÓN

La invención proporciona plantas de algodón transgénicas que comprenden el evento MON 88701, que exhiben una tolerancia comercialmente aceptable a las aplicaciones de herbicidas de dicamba y glufosinato, que tienen una muestra de semilla representativa presentada en la American Type Culture Collection (ATCC® por sus siglas en inglés, Colección Americana de Cultivos Tipo) bajo la Designación de Depósito de Patente PTA-11754. La invención también proporciona moléculas de ADN novedosas relacionadas con el evento de algodón MON 88701 y métodos para usar estas moléculas. La invención también proporciona semillas, progenie, partes de planta, células, productos de consumo, de las plantas de algodón que utilizan el evento MON 88701. La invención también proporciona métodos para el uso del evento de algodón MON 88701 y métodos para

producir algodón que sea tolerante tanto a los herbicidas de dicamba como a los de glufosinato.

La invención proporciona moléculas de ADN recombinantes relacionadas con el evento de algodón MON 88701. Estas moléculas de ADN recombinantes pueden comprender moléculas nucleotídicas que poseen una
5 secuencia nucleotídica que representa una región del ADN genómico que flanquea la inserción transgénica, y/o una región de la inserción transgénica, y/o una secuencia contigua de cualquiera de estas regiones tal como una región de la unión entre la inserción transgénica y el ADN genómico
10 flanqueante del evento de algodón MON 88701. La invención también proporciona moléculas de ADN útiles como cebadores y sondas diagnósticas para el evento de algodón MON 88701 y amplicones diagnósticos para la presencia del evento de algodón MON 88701. También se divulgan plantas de algodón, células de plantas, partes de plantas,
15 productos de consumo, progenie, y semillas que comprenden estas moléculas.

La invención proporciona métodos, composiciones, y kits, útiles para detectar la presencia y/o ausencia de ADN derivado del evento de algodón MON 88701 y por lo tanto la presencia y/o ausencia del evento. La invención
20 proporciona un método para la detección de MON 88701 contactando una muestra que comprende ADN con un juego de cebadores que al utilizarse en una reacción de amplificación de ácido nucleico con ADN genómico de una planta de algodón o semilla que comprende el evento MON 88701, produce un diagnóstico de ADN amplificado para el evento de algodón MON 88701
25 provocando una reacción de amplificación de ácido nucleico, de ese modo produciendo un ADN amplificado, y detecta la presencia y/o ausencia del ADN amplificado. La invención también proporciona un método para la detección de MON 88701 contactando una muestra que comprende ADN con una sonda que al utilizarse en una reacción de hibridación con ADN del
30 evento de algodón MON 88701 se hibrida a una molécula de ADN específica para el evento de algodón MON 88701, provocando una reacción de hibridación, y detectando la hibridación de la sonda de la molécula de ADN.

También se proporcionan kits que comprenden los métodos y composiciones de la invención útiles para detectar la presencia de ADN derivada del evento de algodón MON 88701.

La invención proporciona una planta de algodón, semilla, célula de
5 planta, planta descendiente, parte de planta, o producto de consumo
derivado de una planta, célula de planta, o semilla que comprende el evento
de algodón MON 88701. La invención también proporciona una planta de
algodón, semilla, célula de planta, planta descendiente, parte de planta, o
producto de consumo que comprende una molécula de ADN recombinante
10 que comprende una secuencia nucleótida seleccionada del grupo que
consiste en SEQ ID NO: 1-10, y complementos y fragmentos de los mismos.
La invención también proporciona una planta de algodón, semilla, célula de
planta, planta descendiente, parte de planta, o producto de consumo
derivados de la planta o semilla que comprende el evento de algodón MON
15 88701 y que comprende una molécula de ADN recombinante que produce
una molécula de ADN amplificada que comprende una secuencia
seleccionada de SEQ ID NO: 1-10 en un método de amplificación de ADN.

La invención proporciona un método para controlar malezas en un
campo sembrando plantas de algodón que comprenden el evento MON
20 88701 y luego aplicar una dosis efectiva de dicamba, glufosinato, o
herbicidas de dicamba y glufosinato capaces de controlar las malezas sin
dañar el evento de algodón MON 88701 que contiene las plantas. La
invención también proporciona un método para controlar malezas en un
campo aplicando una dosis efectiva de al menos dicamba, glufosinato, o
25 herbicidas de dicamba y glufosinato para controlar malezas en un campo y
luego sembrar plantas de algodón que comprenden el evento MON 88701 en
el campo. La invención también proporciona un método para producir
semillas de algodón o pelusa de algodón esencialmente libres de semillas de
malezas sembrando semillas de una planta de algodón tolerante al dicamba
30 y al glufosinato que comprenden MON 88701 en un campo, aplicando al
campo una dosis efectiva post emergencia de al menos dicamba, glufosinato,

o herbicidas dicamba y glufosinato suficientes para eliminar la especies de malezas, y cosechar la semilla o pelusa de algodón del campo.

La invención proporciona métodos para producir una planta de algodón y/o semilla que tolere la aplicación de herbicidas de dicamba y glufosinato cruzando sexualmente un evento de algodón MON 88701 que
5 contiene una planta que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-10 con una segunda planta de algodón, produciendo por lo tanto semilla, haciendo crecer la semilla para producir plantas descendientes, tratando las plantas descendientes con dicamba y/o glufosinato y
10 seleccionando una planta descendiente que sea tolerante tanto al dicamba como al glufosinato. Los métodos también pueden incluir la autofecundación de la planta descendiente seleccionada para producir una pluralidad de plantas descendientes de segunda generación y seleccionar de estas una planta tolerante al dicamba y al glufosinato. Los métodos también pueden
15 incluir cruzar sexualmente la planta descendiente seleccionada con otra planta de algodón para producir la semilla, haciendo crecer la semilla para producir una segunda generación de plantas descendientes, tratando la segunda generación de plantas descendientes con dicamba y/o glufosinato, y seleccionando una planta descendiente de segunda generación que sea
20 tolerante al dicamba y al glufosinato. La invención proporciona métodos para producir una planta de algodón y/o semilla que tolere la aplicación de herbicidas de dicamba y glufosinato autofecundando una planta de algodón tolerante al dicamba y glufosinato que comprende el evento MON 88701 que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-10, produciendo
25 por lo tanto semilla, haciendo crecer la semilla para producir plantas descendientes, tratando las plantas descendientes con dicamba y/o glufosinato; y seleccionando una planta descendiente que sea tolerante al dicamba y/o glufosinato. La invención proporciona métodos para determinar la cigocidad de un evento de algodón MON 88701 que contiene una planta o
30 semilla que comprende contactar una muestra de ADN de algodón con un juego de cebadores que comprenden SEQ ID NO: 11, 12, y 14 y un juego de sonda que comprende SEQ ID NO: 13 y 15; luego llevar a cabo una reacción

de amplificación del ácido nucleico con la muestra, juego de cebadores y juego de sondas; luego detectar en la reacción de amplificación del ácido nucleico una primera señal fluorescente que es diagnóstica para el evento MON 88701 y una segunda señal fluorescente diferente de la primera señal fluorescente y que es diagnóstica para el ADN genómico del algodón nativo que corresponde al sitio de inserción del transgén del evento MON 88701; y analizar la presencia y/o ausencia de la primera señal fluorescente y de la segunda señal fluorescente en la reacción de amplificación de ácido nucleico en donde la presencia de ambas señales fluorescentes indican que la muestra es heterocigótica para el evento MON 88701 y la presencia de solamente la primera señal fluorescente indica que la muestra es homocigota para el evento MON 88701. La invención también proporciona una planta de algodón, semilla, célula de planta o parte de planta que comprende genes de tolerancia al dicamba y glufosinato mapeados en el cromosoma A08 en la posición del mapa de 19.3cM y limitado por NG0207927 en la posición del mapa de 18,6cM a la izquierda y por NG0207529 en la posición del mapa de 20,0 cM a la derecha, y métodos para usar el mismo. Lo que precede y otros aspectos de la invención serán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada.

20

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 representa la organización del inserto transgénico en el genoma de una planta de algodón que comprende el evento MO 88701. [A] corresponde a la posición relativa de SEQ ID NO: 1; [A'] corresponde a la posición relativa de SEQ ID NO: 3; [A''] corresponde a la posición relativa de SEQ ID NO: 5; [B] corresponde a la posición relativa de SEQ ID NO: 2; [B'] corresponde a la posición relativa de SEQ ID NO: 4; [B''] corresponde a la posición relativa de SEQ ID NO: 6; [C] corresponde a la posición relativa de SEQ ID NO: 7; [D] corresponde a la posición relativa de SEQ ID NO: 8; [E] corresponde a la posición relativa de SEQ ID NO: 9; [F] corresponde a la posición relativa de SEQ ID NO: 10; SQ21654 y SQ23205 corresponden a la posición relativa de cebadores utilizados para identificar el evento de algodón MON 88701.

30

La Figura 2 muestra dos años de datos de la prueba de campo de rendimiento agronómico expresados como libras de semilla de algodón por acre.

La Figura 3 muestra primer año de datos de la prueba de rendimiento de campo expresados como libras de semilla de algodón por acre.

La Figura 4 muestra segundo año de datos de la prueba de rendimiento de campo expresados como libras de semilla de algodón por acre con cantidades mayores ya sea de herbicida de dicamba (4.A.) o glufosinato (4.B.).

La Figura 5 muestra el porcentaje de manchas necróticas que ocurren con mayores cantidades ya sea de dicamba (5.A) o glufosinato (5.B.)

La Figura 6 muestra datos de prueba de rendimiento del campo como libras de semillas de algodón por acre del régimen de rociado para el evento MON 88701.

La Figura 7 muestra plantas que comprenden el evento MON 88701 versus plantas no transgénicas Coker 130 rociadas con dicamba y glufosinato en el campo. Las aplicaciones de herbicida fueron 1 lb de dicamba (2X) en pre; 1 lb de glufosinato (2X) en 2-hoja; 1 lb de dicamba en 5-hoja; y 1 lb de glufosinato en 8 hoja.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1 es una secuencia de veinte nucleótidos que representa la región 5' de unión del ADN genómico del algodón y el casete de expresión transgénico integrado. SEQ ID NO: 1 está posicionado en SEQ ID NO: 10 en la posición nucleótida 1117-1136.

SEQ ID NO: 2 es una secuencia de veinte nucleótidos que representa la región 3' de unión del ADN genómico del algodón y el casete de expresión transgénico integrado. SEQ ID NO: 2 está posicionado en SEQ ID NO: 10 en la posición nucleótida 5222-5241.

SEQ ID NO: 3 es una secuencia de sesenta nucleótidos que representa la región 5' de unión del ADN genómico del algodón y el casete de expresión transgénico integrado.

SEQ ID NO: 4 es una secuencia de sesenta nucleótidos que representa la región 3' de unión del ADN genómico del algodón y el casete de expresión transgénico integrado.

SEQ ID NO: 5 es una secuencia de cien nucleótidos que representa la
5 región 5' de unión del ADN genómico del algodón y el casete de expresión transgénico integrado.

SEQ ID NO: 6 es una secuencia de cien nucleótidos que representa la región 3' de unión del ADN genómico del algodón y el casete de expresión transgénico integrado.

10 **SEQ ID NO: 7** es la secuencia 5' que flanquea el ADN insertado de MON 88701 hasta e incluyendo una porción del casete de expresión transgénico integrado.

SEQ ID NO: 8 es la secuencia 3' que flanquea el ADN insertado de MON 88701 hasta e incluyendo una porción del casete de expresión
15 transgénico integrado.

SEQ ID NO: 9 es la secuencia del casete de expresión transgénico integrado.

SEQ ID NO: 10 es la secuencia nucleótida contigua de la secuencia 5' que flanquea el ADN insertado (SEQ ID NO: 7), el casete de expresión
20 transgénico integrado (SEQ ID NO: 9), y la secuencia 3' que flanquea el ADN insertado (SEQ ID NO: 8). SEQ ID NO: 10 incluye SEQ ID NO: 1-9.

SEQ ID NO: 11 es la secuencia de un cebador denominado Cebador SQ21654 y utilizado para identificar el evento de algodón MON 88701. Es complementario al casete de expresión insertado en la región cercana al
25 borde 3' de la inserción del transgén. Un amplicón PCR producido por un ensayo de TAQMAN® (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) utilizando la combinación de cebadores SQ21654 y SQ23205 (SEQ ID NO: 12) es un resultado positivo para la presencia del evento MON 88701. Este juego de cebadores también puede ser utilizado para identificar un evento
30 MON 88701 en un ensayo de cigocidad.

SEQ ID NO: 12 es la secuencia de un cebador denominado Cebador SQ23205 y utilizado para identificar el evento de algodón MON 88701. Es

complementario a la región 3' que flanquea el casete de expresión insertado y cercano al borde de inserción del transgén de ADN. Un amplicón PCR producido por un ensayo de TAQMAN® (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) utilizando la combinación de cebadores SQ21654 (SEQ ID NO: 11) y SQ23205 es un resultado positivo para la presencia del evento MON 88701. Esto también es el cebador utilizado para identificar el evento MON 88701 y tipo salvaje con un ensayo de cigocidad.

SEQ ID NO: 13 es la secuencia de una sonda denominada Sonda PB10280 y utilizada para identificar el evento de algodón MON 88701. Es complementario a la región del casete de expresión insertado y adyacente a la unión 3' del ADN genómico. Esta sonda es un oligonucleótido sintético rotulado 6-FAM™. La liberación de una señal fluorescente en una reacción de amplificación utilizando cebadores SQ21654 y SQ23205 (SEQ ID NO: 11-12) en combinación con la sonda rotulada 6-FAM™ PB10280 es diagnóstica del evento MON 88701 en un ensayo TAQMAN®. PB10280 también es la sonda utilizada para identificar el evento MON 88701 en un ensayo de cigocidad.

SEQ ID NO: 14 es la secuencia de un cebador denominado Cebador SQ23901 y utilizado para identificar un alelo de algodón de tipo salvaje en un ensayo de cigocidad MON 88701.

SEQ ID NO: 15 es la secuencia de una sonda rotulada VIC™ denominada Sonda PB10631 y utilizada para identificar un alelo de algodón de tipo salvaje.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Se proporcionan las siguientes definiciones y métodos para definir mejor la invención y guiar aquellos expertos en la técnica en la práctica de la invención. A menos que se observe lo contrario, los términos deben entenderse de acuerdo con el uso convencional por aquellos expertos en la técnica relevante.

La invención proporciona un evento de algodón transgénico MON 88701 que exhibe una tolerancia comercialmente aceptable a las aplicaciones de herbicidas de dicamba y glufosinato. El evento comprende

una única inserción del ADN transgénico en el cromosoma/genoma del germoplasma del algodón. Un “evento” se produce por: (i) la transformación de una célula de la planta con un constructo de ácido nucleico que incluye un transgén de interés, (ii) regeneración de una población de plantas que
5 resulta de la inserción del transgén en el genoma de la planta, y (iii) selección de una planta particular que se caracteriza por la inserción del transgén en un lugar particular en el genoma de la planta.

El término “evento” se refiere a una molécula de ADN que comprende el ADN insertado y el ADN genómico flanqueante del algodón
10 inmediatamente adyacente a cualquiera de los dos lados del ADN insertado. Esta molécula de ADN es creada insertando el ADN transgénico en el genoma de la planta de algodón, es decir mediante el acto de transformación. Esta molécula de ADN comprende por lo tanto una secuencia nucleótida que es específica al evento y que es única para el
15 genoma de la planta de algodón en la cual el ADN transgénico ha sido insertado, en que esta secuencia nucleótida contiene tanto la secuencia de una región particular del ADN genómico del algodón como del inserto de ADN transgénico. La disposición del ADN insertado en el evento de algodón MON 88701 con relación al ADN genómico circundante de la planta de
20 algodón es por lo tanto específica y única para el evento de algodón MON 88701. Esta molécula de ADN es también una parte integral del cromosoma de algodón del evento MON 88701 que contiene plantas y como tal, es estática en la planta y puede traspasarse a la progenie de la planta.

La presente invención también proporciona el transformante original
25 que incluye el transgén insertado en el sitio particular en el genoma de la planta y progenie del transformante que incluye el transgén insertado en el sitio particular en el genoma de la planta. Tal progenie se puede llevar a cabo a través del cruzamiento sexual entre el transformante, o su progenie, y otra planta. Esta otra planta puede ser una planta transgénica que
30 comprende la misma o diferente planta transgénica y/o no transgénica, tal como una de diferente variedad. Aun después de un retrocruzamiento repetido a un progenitor recurrente, el ADN insertado y el ADN flanqueante

del progenitor transformado está presente en la progenie del cruce en el mismo sitio genómico.

Tal como se utiliza en la presente, el término “algodón” significa *Gossypium hirsutum* e incluye todas las variedades de plantas que se pueden fitomejorar con algodón, incluyendo especies de algodón salvaje así como también aquellas plantas que pertenecen a *Gossypium* que permiten el fitomejoramiento entre especies

El evento MON 88701 comprende un casete de expresión transgénico integrado que brinda tolerancia a las aplicaciones de herbicidas de dicamba y glufosinato a la planta de algodón. “Dicamba” se refiere a ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico. El dicamba es un herbicida auxínico sintético útil para controlar las malezas de hojas anchas. Las plantas de algodón fueron transformadas con un gen (*dmo*) de *Stenotrophomonas maltophilia* que codifica el dicamba mono oxigenasa (DMO, por sus siglas en inglés). El DMO es una enzima que cataliza la desactivación del dicamba a través de una reacción de O-demetilación al compuesto no herbicida ácido 3,5-diclorosalisílico. “Glufosinato” se refiere a ácido de 2-amino-4-(hidroximetilfosfonil)butanoico. El glufosinato es un herbicida organofosforado útil para controlar un amplio espectro de gramíneas estacionales y perennes y malezas de hoja ancha. Las plantas de algodón se transformaron con un gen de Resistencia a Bialafos (bar) de *Streptomyces hygroscopicus* que codifica fosfinotricin acetil transferasa (PAT, por sus sigas en inglés). PAT es una enzima que cataliza la acetización y por ende la inactivación de glufosinato.

Tal como se utiliza en la presente, el término “recombinante” se refiere a una forma de ADN y/o proteína y/o un organismo que no se encuentra normalmente en la naturaleza y que por lo tanto fue creado mediante la intervención humana. Dicha intervención humana, puede producir una molécula de ADN recombinante y/o una planta recombinante. Tal como se utiliza en la presente, una “molécula de ADN recombinante” es una molécula de ADN que comprende una combinación de moléculas de ADN que no se llevaría a cabo en la naturaleza y que es el resultado de la intervención

humana, por ejemplo, una molécula de ADN que está comprendida por una combinación de al menos dos moléculas de ADN heterólogas entre sí, y/o una molécula de ADN que es artificialmente sintetizada y comprende una secuencia de polinucleótidos que se desvía de la secuencia de polinucleótidos que existirían normalmente en la naturaleza, y/o una molécula de ADN que comprende un transgén artificialmente incorporado en el ADN genómico de la célula huésped y el ADN flanqueado asociado del genoma de la célula huésped. Un ejemplo de una molécula de ADN recombinante es una molécula de ADN que se describe en la presente que surge de la inserción del transgén en el ADN genómico del algodón, que puede resultar en la expresión de un ARN recombinante y/o molécula de proteína en ese organismo. Tal como se utiliza en la presente, una “planta recombinante” es una planta que no existiría normalmente en la naturaleza, que es el resultado de la intervención humana, y que contiene un transgén y/o una molécula de ADN heteróloga incorporada en su genoma. Como resultado de tal alteración genómica, la planta recombinante es marcadamente diferente de la planta de tipo salvaje relacionada. Un ejemplo de una planta de algodón recombinante es una planta de algodón que se describe en la presente invención que comprende el evento MON 88701.

Como se utiliza en la presente, el término “transgén” se refiere a una molécula de nucleótidos artificialmente incorporada en el genoma de la célula huésped. Dicho transgén puede ser heterólogo a la célula huésped. El término “planta transgénica” se refiere a una planta que comprende dicho transgén.

Como se utiliza en la presente, el término “heterólogo” se refiere a una primera molécula que no se encuentra normalmente en combinación con una segunda molécula en la naturaleza. Por ejemplo, una molécula puede ser derivada de una primera especie e insertada en el genoma de una segunda especie. La molécula sería por lo tanto heteróloga al huésped y artificialmente incorporada a un genoma de una célula huésped.

Como se utiliza en la presente, el término “quimérico” se refiere a una única molécula de ADN producida al fusionar una primera molécula de ADN

con una segunda molécula de ADN, en donde ni la primera ni la segunda molécula de ADN se encontrarían normalmente en esa configuración, es decir, fusionada con la otra. La molécula de ADN quimérica es por lo tanto una nueva molécula de ADN que no se encontraría de otro modo normalmente en la naturaleza.

La invención proporciona moléculas de ADN y sus correspondientes secuencias de nucleótidos. Como se utiliza en la presente, el término "ADN" "molécula de ADN", "molécula de nucleótidos" se refiere a una molécula de ADN de origen genómico o sintético, es decir, un polímero de bases deoxiribonucleótidas o una molécula polinucleótida, que se lee desde el extremo 5' (corriente arriba) hasta el extremo 3' (corriente abajo). Como se utiliza en la presente, el término "secuencia de ADN", "secuencia nucleótida" o "secuencia de polinucleótidos" se refiere a la secuencia nucleótida de una molécula de ADN. La nomenclatura utilizada en la presente es la que es requerida según el Título 37 del Código de Normas Federales de los Estados Unidos § 1.822 y establecida en las tablas WIPO Standard ST.25 (1998), Apéndice 2, Tablas 1 y 3. Convencionalmente, las secuencias de nucleótidos de la invención proporcionados como SEQ ID NOs: 1-10 y sus fragmentos se divulgan con referencia solamente a una cepa de dos cepas de secuencias de nucleótidos suplementarios. Por implicación, las secuencias complementarias (es decir, las secuencias de la cepa complementaria), también denominadas en la técnica como las secuencias complementarias reversas, están dentro del alcance de la invención e intentan expresamente estar dentro del alcance del tema reivindicado.

La secuencia nucleótida correspondiente a la secuencia nucleótida completa del ADN transgénico insertado y segmentos sustanciales del ADN genómico del algodón que flanquea cualquier extremo del ADN transgénico insertado está proporcionado en la presente como SEQ ID NO: 10. Una subsección de esto es el ADN transgénico insertado proporcionado como SEQ ID NO: 9. La secuencia nucleótida del ADN genómico del algodón físicamente unido por el enlace fosfodiéster del bono y flanqueando por lo tanto el extremo 5' del ADN transgénico insertado se establece tal como se

ilustra en la Figura 1 y se proporciona como SEQ ID NO: 1, 3, 5, y 7. La secuencia de nucleótidos del ADN genómico del algodón físicamente unido por el enlace fosfodiéster del bono y flanqueando por lo tanto el extremo 3' del ADN transgénico insertado se establece tal como se ilustra en la Figura 1 y se proporciona como SEQ ID NO: 2, 4, 6, y 8.

El evento de algodón MON 88701 comprende además dos regiones, una que abarca la ubicación 5' y una que abarca la ubicación 3' en donde el ADN transgénico está insertado en el ADN genómico, denominado en la presente unión 5' y 3', respectivamente. Una "secuencia de unión" o "región de unión" se refiere a la secuencia de ADN y/o molécula de ADN correspondiente que abarca el ADN transgénico insertado y el ADN genómico adyacente flanqueante. Las secuencias de unión pueden estar arbitrariamente representadas por las secuencias de nucleótidos proporcionadas como SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, cada una representando 10 nucleótidos del ADN genómico flanqueante adyacente a y contiguo a 10 nucleótidos del Inserto de ADN. De manera alternativa, las secuencias de unión pueden representarse arbitrariamente por las dos secuencias de nucleótidos 60 provistas como SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4, cada una representando 30 nucleótidos del ADN genómico flanqueante adyacente a y contiguo a 30 nucleótidos del inserto de ADN. De manera alternativa, las secuencias de unión pueden representarse arbitrariamente por las dos secuencias de nucleótidos 100 provistas como SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, cada una representando 50 nucleótidos del ADN genómico flanqueante adyacente a y contiguo a 50 nucleótidos del inserto de ADN. Estos nucleótidos están conectados por una unión de fosfodiéster y en el evento de algodón MON 88701 están presente como parte del genoma. La identificación de una o más de SEQ ID NO: 1-10 en una muestra derivada de una planta de algodón, semilla, o parte de planta determina que se obtuvo el ADN de un evento de algodón MON 88701 y que es diagnóstica para la presencia en una muestra de ADN del evento de algodón MON 88701. La invención por lo tanto proporciona una molécula de ADN que contiene al menos una de las secuencias de nucleótidos proporcionada como SEQ ID

NO: 1-10. Cualquier segmento de ADN derivado del evento transgénico de algodón MON 88701 que es suficiente para incluir al menos una de las secuencias proporcionadas como SEQ ID NO: 1-10 está dentro del alcance de la invención. Además, cualquier polinucleótido que comprende una
5 secuencia complementaria a cualquiera de las secuencias descritas dentro de éste párrafo, está dentro del alcance de la invención. La Figura 1 ilustra el ordenamiento de SEQ ID NO: 1-9 relativo a SEQ ID NO: 10 ordenados de 5' a 3'.

La invención proporciona moléculas de ADN ejemplares que pueden
10 ser utilizadas tanto como cebadores o como sondas para diagnosticar la presencia de ADN derivado de una planta de algodón que comprende el evento MON 88701 en una muestra. Dichos cebadores o sondas son específicos para una secuencia de ácido nucleico diana y como tales son útiles para la identificación de la secuencia de ácido nucleico del evento de
15 algodón MON 88701 por los métodos de la invención descrita en la presente.

Un “cebador” es típicamente un polinucleótido aislado, altamente purificado que se utiliza en métodos específicos de alineamiento o de hibridación que conllevan amplificación termal. Un par de cebadores puede ser utilizado con un ADN templado, en una amplificación térmica, tal como
20 una reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en Inglés) para producir un amplicón, en donde el amplicón producido a partir de dicha reacción tendría una secuencia de ADN correspondiente a la secuencia del ADN templado ubicado entre los dos sitios en donde los cebadores se hibridan al templado. Tal como se utiliza en la presente, un “amplicón” es una
25 pieza o fragmento de ADN que ha sido sintetizado utilizando técnicas de amplificación. Un amplicón de la invención comprende al menos una de las secuencias proporcionadas como SEQ ID NO: 1-10. Un cebador está típicamente diseñado para hibridarse a una cepa de ADN diana complementaria para formar un híbrido entre el cebador y la cepa de ADN
30 diana, y la presencia del cebador es un punto de reconocimiento por una polimerasa para comenzar la extensión del cebador (es decir polimerización de nucleótidos adicionales en una molécula de nucleótidos prolongada)

utilizando como templado las cepas de ADN diana. Los pares de cebadores, tal como se utilizan en la invención, pretenden referirse al uso de dos cebadores que unen cepas opuestas de un segmento de nucleótidos de dos cepas a fin de amplificar linealmente el segmento de polinucleótidos entre las

5 posiciones dirigidas para la unión por los miembros individuales del par de cebadores, principalmente en una reacción de amplificación termal u otros métodos de amplificación del ácido nucleico convencionales. Las moléculas ejemplares de ADN útiles como cebadores están provistas como SEQ ID NO: 11-12. El par de cebadores provisto como SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12

10 son útiles como una primera molécula de ADN y una segunda molécula de ADN que es diferente de la primera molécula de ADN, y ambas son de suficiente longitud cada una de nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 10 como para funcionar como cebadores de ADN, cuando se los utiliza en conjunto en una reacción de amplificación termal con un ADN templado

15 derivado del evento de algodón MON 88701 para producir un amplicón diagnóstico para el ADN del evento de algodón MON 88701 en una muestra.

Una "sonda" es un ácido nucléico aislado que es complementario a cepa de ácido nucleico diana. Las sondas de acuerdo con la invención no solamente incluyen ácidos deoxiribonucleicos o ribonucleicos pero también

20 poliamidas y otros materiales de sonda que se unen específicamente a una secuencia de ADN diana y la detección de tal unión puede ser útil para diagnosticar, discriminar, determinar, o confirmar la presencia de aquella secuencia de ADN diana en una muestra particular. Una sonda puede estar unida a una etiqueta detectable convencional o molécula reportera, por

25 ejemplo un isótopo radioactivo, ligando, agente quimioluminiscente, o enzima. Una molécula de ADN ejemplar útil como sonda se provee como SEQ ID NO: 13.

Las sondas y los cebadores de acuerdo con la invención pueden tener identidad de secuencia completa con la secuencia diana, aunque los

30 cebadores y las sondas difieren de la secuencia diana que retiene la habilidad de hibridar preferencialmente las secuencias diana pueden ser diseñadas por métodos convencionales. Para que una molécula de ácido

nucleico pueda servir como cebador o sonda solo necesita ser suficientemente complementaria en secuencia para poder formar una estructura de dos cepas bajo el solvente particular y las concentraciones de sal empleadas. Cualquier hibridación de ácido nucleico convencional o método de amplificación pueden ser utilizados para identificar la presencia de ADN transgénico del evento de algodón MON 88701 en una muestra. Las sondas y los cebadores tienen por lo general al menos 11 nucleótidos, al menos aproximadamente 18 nucleótidos, al menos aproximadamente 24 nucleótidos, o al menos aproximadamente 30 nucleótidos o más de longitud.

Tales sondas y cebadores hibridan específicamente una secuencia de ADN diana bajo condiciones de hibridación rigurosas. Las condiciones rigurosas convencionales se describen en Sambrook *et al.*, 1989, y por Haymes *et al.*, In: *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, DC (1985). Como se utiliza en la presente, dos moléculas de ácido nucleico son capaces de hibridarse específicamente si las dos moléculas son capaces de formar una estructura de ácido nucleico antiparalela, de dos cepas. Una molécula de ácido nucleico es el “complemento” de otra molécula de ácido nucleico si exhiben una complementariedad completa. Como se utiliza en la presente, dos moléculas exhiben “complementariedad completa” si cuando están alineadas cada nucleótido de la primera molécula es complementario a cada nucleótido de la segunda molécula. Dos moléculas son “mínimamente complementarias” si se pueden hibridar entre sí con una estabilidad suficiente como para permitir que permanezcan alineadas entre sí bajo al menos condiciones de “bajo rigor”. De modo similar, las moléculas son “complementarias” si pueden hibridarse entre sí con una estabilidad suficiente para permitir que permanezcan alineadas entre sí bajo condiciones de “alto rigor”. Por lo tanto se permiten desviaciones de complementariedad completa, siempre y cuando estas desviaciones no impidan por completo que las moléculas formen una estructura de dos cepas.

Tal como se utiliza en la presente, el término “aislada” se refiere al menos parcialmente a separar una molécula de otras moléculas

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

Cualquier método bien conocido por aquellos expertos en el arte puede ser utilizado para aislar y manipular una molécula de ADN, o fragmento del mismo, divulgados en la invención. Por ejemplo, la tecnología PCR (reacción en cadena de la polimerasa) se puede utilizar para ampliar una molécula de ADN iniciadora y/o producir variantes de la molécula original. Las moléculas de ADN, o sus fragmentos, también se pueden obtener por medio de otras técnicas tales como sintetizar directamente el fragmento a través de medios químicos, como se hace generalmente utilizando un sintetizador de oligonucleótidos automatizado.

Las moléculas de ADN y sus correspondientes secuencias de nucleótidos proporcionados en la presente invención son por lo tanto útiles, entre otras cosas, para identificar el evento de algodón MON 88701, seleccionar variedades de plantas o híbridos que comprenden el evento de algodón MON 88701, detectar la presencia de ADN derivado del evento de algodón transgénico MON 88701 en una muestra, y monitorear las muestras para la presencia y/o ausencia del evento de algodón MON 88701 o partes de plantas derivadas de plantas de algodón que comprenden el evento MON 88701.

La invención proporciona plantas de algodón, progenie, semillas, células de planta, partes de planta (tales como polen, ovulo, vaina, tejido de flores, tejido de raíz, tejido de tallo, y tejido de hoja), y productos de consumo. Estas plantas, progenie, semillas, células de plantas, partes de

plantas, y productos de consumo contienen una cantidad detectable de un polinucleótido de la invención, es decir, tal como un polinucleótido que tiene al menos una de las secuencias provistas como SEQ ID NO: 1-10. Plantas, progenie, semillas, células de plantas y partes de plantas de la invención
5 también pueden contener uno o más transgenes adicionales. Dicho transgén puede ser cualquier secuencia nucleótida que codifica una proteína o molécula de ARN que proporciona un rasgo deseado incluyendo, pero sin limitarse a, resistencia a los insectos mejorada, incremento en la eficiencia del uso del agua, rendimiento mejorado, resistencia a la sequía mejorada, calidad de la semilla mejorada, calidad de nutrición mejorada, y/o tolerancia
10 mejorada a los herbicidas, en donde se mide la característica deseada con respecto a una planta de algodón que no posee dicho transgén adicional.

La invención proporciona plantas de algodón, progenie, semillas, células de planta, y partes de plantas, tales como polen, ovulo, vaina, flor,
15 tejido de raíz o tallo, y hojas derivados de plantas de algodón transgénicas que comprenden el evento MON 88701. Una muestra representativa de semilla de algodón que comprende el evento MON 88701 ha sido presentado de acuerdo con el Tratado de Budapest en la American Type Culture Collection (ATCC® por sus siglas en inglés, Colección de Cultivos Tipo de
20 EEUU). El depósito ATCC ha asignado la Designación de Depósito de Patente PTA-11754 al evento MON 88701 que comprende semilla.

La invención proporciona un microorganismo que comprende una molécula de ADN que tiene al menos una secuencia seleccionada SEQ ID NO: 1-10 presente en su genoma. Un ejemplo de dicho microorganismo es
25 una célula de planta transgénica. Los microorganismo, tales como células de plantas de la invención, son útiles en muchas aplicaciones industriales, incluyendo pero sin limitarse a: (i) uso de una herramienta de investigación para investigaciones científicas o investigaciones industriales; (ii) uso en cultivo para producir carbohidratos endógenos o recombinantes, lípidos, ácidos nucleicos, o productos de proteínas o pequeñas moléculas que se
30 pueden utilizar para investigaciones científicas posteriores o como productos industriales: y (iii) uso de técnicas de cultivo de un tejido de planta modernas

para producir plantas transgénicas o cultivos de tejidos de plantas que pueden ser luego utilizados para investigaciones agrícolas o producción.. La producción y el uso de microorganismos tales como las células de plantas transgénicas utiliza técnicas de microbiología modernas e intervención humana para producir un microorganismo único, hecho por el hombre. En este proceso, el ADN recombinante se inserta en el genoma de la célula de la planta para crear una célula de planta transgénica que está separada y es única de las células de plantas de origen natural. Esta célula de planta transgénica puede luego ser cultivada como una bacteria y células de levadura utilizando técnicas de microbiología modernas y pueden existir en un estado unicelular, no diferenciado. La nueva composición genética de la célula de la planta nueva y fenotipo es un efecto técnico creado por la integración del ADN heterólogo en el genoma de la célula. Otro aspecto de la invención es un método de uso de un microorganismo de la invención.

Métodos para usar microorganismos de la invención, tales como células de plantas transgénicas, que incluyen (i) métodos para producir células transgénicas integrando ADN recombinante en el genoma de la célula y luego utilizando esta célula para obtener células adicionales que poseen el mismo ADN heterólogo; (ii) métodos para cultivar células que contienen ADN recombinante utilizando técnicas de microbiología modernas: (iii) métodos para producir y purificar carbohidrato endógeno o recombinante, lípido, ácido nucleico, o productos de proteínas de células cultivadas; y (iv) métodos para utilizar técnicas de cultivo de tejido de plantas modernas con células de planta transgénica para producir plantas transgénicas o cultivos de tejido de plantas transgénicas.

Las plantas de la invención pueden también atravesar el evento de ADN, incluyendo el transgén, hasta la descendencia. Tal como se utiliza en la presente, "progenie" incluye cualquier planta, semilla, célula de planta, y/o partes de plantas regenerativas que comprenden el evento de ADN derivado de una planta ancestral y/o que comprende una molécula de ADN que tiene al menos una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-10. Plantas, progenie, y semillas, pueden ser homocigotas o heterocigotas para el

transgén. La progenie puede ser recolectada de las semillas producidas por un evento de algodón MON 88701 que contiene plantas y/o de semillas producidas por una planta fertilizada con polen de un evento de algodón MON 88701 que contiene plantas.

5 Las plantas descendientes pueden ser plantas autopolonizadas (también conocidas como “autofecundantes”) para generar una verdadera línea de fitomejoramiento de plantas, es decir, plantas homocigotas para el transgén. La progenie de autofecundación adecuada puede producir plantas que son homocigotas para ambos genes exógenos agregados.

10 De manera alternativa, las plantas descendientes pueden cruzarse, por ejemplo, con otra planta sin parentesco, para producir una planta o semilla de distinta variedad o híbrida. La otra planta sin parentesco puede ser transgénica o no transgénica. Una planta o semilla de distinta variedad o híbrida de la invención puede por lo tanto obtenerse cruzando un primer
15 progenitor que está desprovisto del ADN específico y único del evento de algodón MON 88701 con un segundo progenitor que comprende el evento de algodón MON 88701, que da como resultado un híbrido que comprende el ADN único y específico del evento de algodón MON 88701. Cada progenitor puede ser un híbrido o un endogámico/de distinta variedad, siempre y
20 cuando el cruzamiento o resultados de fitomejoramiento de una planta o semilla de la invención, es decir, una semilla que posee al menos un alelo que contiene el ADN del evento de algodón MON 88701 y/o una molécula de ADN que tiene al menos una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-10. Dos plantas transgénicas diferentes, pueden por lo tanto cruzarse para
25 producir descendencia híbrida que contienen dos genes independientemente endógenos, segregadores, agregados. Por ejemplo, MON 88701 que contiene algodón tolerante al dicamba y glufosinato puede cruzarse con otras plantas de algodón transgénicas para producir una planta que tiene las características de ambos progenitores transgénicos. Un ejemplo de esto
30 sería un cruzamiento de MON 88701 que contiene algodón tolerante al dicamba y glufosinato con una planta que tiene una o más características adicionales tales como tolerancia al herbicida (ejemplo evento de algodón

MON 1445 o evento de algodón MON 88913) y/o control de insectos (por ejemplo evento de algodón MON 15985, MON 757, o MON 531), dando como resultado una planta descendiente o semilla que es tolerante al dicamba y al glufosinato y que tiene al menos una o más características adicionales. El retrocruzamiento a una planta progenitora y el cruzamiento exogámico con una planta no transgénica también están contemplados, como una propagación vegetativa. Descripciones de otros métodos de fitomejoramiento que se usan por lo general para diferentes rasgos y cultivos se pueden encontrar en una de diversas referencias, por ejemplo, Fehr, in Breeding Methods for Cultivar Development, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison WI (1987).

La invención proporciona una parte de planta que es derivada de plantas de algodón que comprende el evento MON 88701. Tal como se utiliza en la presente, una “parte de planta” se refiere a cualquier parte de una planta que está comprendida de material derivado de una planta de algodón que comprende el evento MON 88701. Las partes de plantas incluyen pero sin limitarse a, polen, óvulo, vaina, flor, tejido de raíz o tallo, fibras, y hojas. Las partes de plantas pueden ser viables, no viables, regeneradoras, y/o no regeneradoras.

La invención proporciona un producto de consumo que está derivado de plantas de algodón que comprenden el evento MON 88701. Tal como se utiliza en la presente, un “producto de consumo” se refiere a cualquier composición o producto que está comprendido de material derivado de un evento de algodón MON 88701 que contiene planta, semilla, célula de planta, o parte de planta. Los productos de consumo pueden ser comercializados a consumidores y pueden ser viables o no viables. Los productos de consumo no viables incluyen pero no se limitan a semillas no viables; semillas procesadas, partes de semilla y partes de planta; pelusas de algodón, partes de semilla y planta procesadas para alimentación o alimentos, aceite, fibra, papel, biomasas, y combustibles. Los productos de consumo viables incluyen pero no se limitan a semillas, plantas, y células de plantas. Las plantas de algodón que comprenden el evento MON 88701 pueden entonces ser

utilizadas para elaborar cualquier producto de consumo típicamente adquirido del algodón. Este producto de consumo que está derivado de plantas de algodón que comprende el evento MON 88701 puede contener al menos una cantidad detectable del ADN específico y único correspondiente al evento de algodón MON 88701, y puede contener específicamente una cantidad detectable de un polinucleótido que comprende una molécula de ADN que tiene al menos una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-10. Cualquier método estándar de detección para moléculas de nucleótidos puede ser utilizado, incluyendo métodos de detección que se divulgan en la presente invención. Un producto de consumo está dentro del alcance de la invención si existe cualquier cantidad detectable de molécula de ADN que tiene al menos una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-10 en el producto de consumo.

Las plantas, progenie, semillas, células de planta, partes de planta (tal como polen, óvulo, vainas, flor, tejido de raíz o tallo, y hojas), y productos de consumo de la invención son por lo tanto útiles para, entre otras cosas, cultivar plantas a fin de producir semilla y/o partes de planta que comprenden el evento de algodón MON 88701 para fines agrícolas, produciendo progenie que comprende el evento de algodón MON 88701 para el fitomejoramiento de la planta y fines de investigación, uso con técnicas microbiológicas para aplicaciones de investigación e industriales, y venta a consumidores.

La invención proporciona métodos para controlar malezas y métodos para producir plantas utilizando herbicidas de dicamba y glufosinato y evento de algodón MON 88701. Se proporciona un método para controlar malezas en un campo y consiste en plantar un evento de algodón MON 88701 que contiene plantas varietales o híbridas en un campo y aplicar una dosis herbicídicamente efectiva de dicamba o glufosinato o dicamba y glufosinato al campo a fin de controlar malezas en el campo sin dañar el MON 88701 que contiene plantas. Dicha aplicación de dicamba o glufosinato o herbicidas de dicamba y glufosinato pueden ser pre emergencia, es decir, en cualquier momento después de que el MON 88701 que contiene semilla es plantado y antes de que el MON 88701 que contiene plantas emerja, o post emergencia,

es decir, en cualquier momento después de que el MON 88701 que contiene plantas emerja. También se proporciona otro método para controlar malezas en un campo y consiste en aplicar una dosis efectiva de dicamba o glufosinato o herbicidas de dicamba y glufosinato para controlar malezas en un campo y luego plantar plantas de algodón que comprenden el evento MON 88701 en el campo. Dicha aplicación de dicamba o glufosinato o herbicidas de dicamba y glufosinato sería pre plantación, es decir, antes de que se plante el MON 88701 que contiene semillas, y podría llevarse a cabo en cualquier momento pre plantación incluyendo, pero sin limitarse a, aproximadamente 14 días pre plantación y aproximadamente 1 día pre plantación. La invención también proporciona un método para producir semillas de algodón o pelusa de algodón esencialmente libre de semillas de maleza plantando semillas de plantas de algodón tolerantes al dicamba y glufosinato que comprenden MON 88701 en un campo, aplicando una dosis post emergencia de dicamba o glufosinato o herbicidas de dicamba y glufosinato suficientes para combatir la maleza en el campo, y cosechar semillas o pelusas de algodón del campo. Una dosis herbicídicamente efectiva de dicamba para uso en el campo debería consistir en un rango de aproximadamente 0,0023 kilos (0,005 libras) por acre (0,40 hectáreas) a aproximadamente 7,25 Kg (16 libras) por acre de dicamba durante una temporada de crecimiento. En una realización, un total de aproximadamente 0,23 kilos (0,5 libras) por acre a aproximadamente 0,90 kg (2 libras) por acre de dicamba se aplica durante la temporada de crecimiento. Se pueden utilizar múltiples aplicaciones de dicamba durante el período de crecimiento, por ejemplo, dos aplicaciones (tales como una aplicación pre plantación y una aplicación post emergencia o una aplicación pre emergencia, y una aplicación post emergencia) o tres aplicaciones (tales como una aplicación pre plantación, una aplicación pre emergencia, y una aplicación post emergencia). Una dosis herbicídicamente efectiva de glufosinato para uso en el campo debería consistir de un rango de aproximadamente 0,0023 kilos (0,005 libras) por acre a aproximadamente 7,25 Kg (16 libras) por acre de glufosinato durante el período de crecimiento. En una realización, se aplica

un total de aproximadamente 0,23 kilos (0,5 libras) por acre a aproximadamente 0,72 kg (1,59 libras) por acre de glufosinato durante el periodo de crecimiento. Se pueden utilizar múltiples aplicaciones de glufosinato durante un período de crecimiento, por ejemplo, dos aplicaciones
5 (tales como una aplicación pre plantación y una aplicación post emergencia o una aplicación pre emergencia y un aplicación post emergencia) o tres aplicaciones (tales como una aplicación pre plantación y una aplicación pre emergencia, y una aplicación post emergencia o tres aplicaciones post emergencia).

10 Se proporcionan métodos para producir una planta de algodón tolerante al herbicida que comprende las secuencias de ADN específicas y únicas al evento MON 88701 de la invención. Las plantas transgénicas utilizadas en estos métodos pueden ser homocigotas o heterocigotas para el transgén. Las plantas descendientes producidas por estos métodos pueden
15 ser plantas varietales o híbridas; se pueden cultivar de semillas producidas por una planta que contiene un evento de algodón MON 88701 y/o de semillas producidas por una planta fertilizada con polen de una planta que contiene un evento de algodón MON 88701; y pueden ser homocigotas o heterocigotas para el transgén. Las plantas descendientes pueden ser
20 posteriormente, autopolonizadas para generar una verdadera línea de fitomejoramiento de plantas, es decir, plantas homocigotas para el transgén, o pueden de manera alternativa autocruzarse, por ejemplo, por ejemplo fitomejorarse con otra planta sin parentesco para producir una semilla de distinta variedad o híbrida o planta.

25 Una planta de algodón que tolera la aplicación de herbicidas de dicamba y glufosinato se puede producir cruzando sexualmente un evento MON 88701 que contiene una planta que comprende una molécula de ADN que tiene al menos una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-10 con otra planta de algodón y por lo tanto producir semilla, que luego crece en
30 plantas descendientes. Estas plantas descendientes pueden luego ser tratadas con herbicidas de dicamba y/o glufosinato para seleccionar plantas descendientes que son tolerantes a los herbicidas de dicamba y glufosinato.

De manera alternativa, estas plantas descendientes pueden ser analizadas utilizando métodos de diagnostico para seleccionar plantas descendientes que contienen el evento ADN MON 88701. La otra planta utilizada en el cruce puede ser o no ser tolerante a los herbicidas de dicamba y glufosinato y pueden ser o no ser transgénicas. La planta descendiente y/o semilla producida puede de distinta variedad o semilla híbrida. Al utilizar este método, el paso de cruzar sexualmente una planta con otra planta, es decir colonización cruzada, se puede llevar a cabo o facilitar a través de la intervención humana, por ejemplo: con la mano de obra humana, recolectando el polen de una planta y contactando ese polen con el estilo o estigma de una segunda planta; mediante la mano de obra humana y/o acciones eliminando, destruyendo, o cubriendo el estambre o anteras de una planta (por ejemplo mediante el despenachado o aplicación de un gametocida químico) de modo que se previene la autopolinización y polinización cruzada debería llevarse a cabo como para que se lleve a cabo la fertilización; mediante la colocación por el hombre de insectos polinizadores en una posición para “polinización directa” (por ejemplo colocando colmenas en huertas o campos o poniendo plantas en jaulas con insectos polinizadores); mediante la intervención del hombre para la apertura o removiendo partes de la flor para permitir el emplazamiento o contacto de polen en el estilo o estigma (por ejemplo en la soja que naturalmente tiene flores que entorpecen o evitan la polinización cruzada, haciendo que sean naturalmente autopolinizadores sin intervención humana); mediante el emplazamiento selectivo de las plantas (por ejemplo plantando plantas intencionalmente en proximidad polinizadora); y/o aplicando químicos para acelerar el florecimiento o para fomentar la receptividad (del estigma para el polen).

Una planta de algodón que tolera la aplicación de herbicidas de dicamba y glufosinato se puede producir autofecundando un evento MON 88701 que contiene una planta que comprende una molécula de ADN que tiene al menos una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-10 y por lo tanto producir semilla, que luego crece en plantas descendientes. Estas

plantas descendientes pueden luego ser tratadas con herbicidas de dicamba y glufosinato para seleccionar plantas descendientes que son tolerantes a los herbicidas de dicamba y glufosinato. De manera alternativa, estas plantas descendientes pueden ser analizadas utilizando métodos de diagnóstico para

5 seleccionar plantas descendientes que contienen el evento ADN MON 88701. Al utilizar este método, el paso de cruzar sexualmente una planta con la misma, es decir autopolinización o autofecundación, se puede llevar a cabo o facilitar a través de la intervención humana, por ejemplo: con intervención humana recolectando el polen de la planta y contactando este

10 polen con el estilo o estigma de la misma planta y luego previniendo opcionalmente la fertilización de la planta; mediante la intervención humana y/o acciones eliminando, destruyendo, o cubriendo el estambre o anteras de otras plantas cercanas (por ejemplo mediante el despenachado o aplicación de un gametocida químico) de modo que se previene la polinización cruzada

15 y la autopolinización debería llevarse a cabo como para que se lleve a cabo la fertilización; mediante la intervención del hombre para colocar insectos polinizadores en una posición para “polinización directa” (por ejemplo colocando una planta en jaula sola con insectos polinizadores); mediante la manipulación humana de la flor o sus partes para permitir la autopolinización;

20 mediante el emplazamiento selectivo de las plantas (por ejemplo plantando intencionalmente plantas más lejos que la proximidad polinizadora); y/o aplicando químicos para acelerar el florecimiento o para fomentar la receptividad (del estigma para el polen).

Las plantas de algodón descendientes abarcadas por estos métodos y

25 producidas utilizando estos métodos serán diferentes de otras plantas de algodón, por ejemplo porque la plantas de algodón descendientes y semillas: son recombinantes y como tal creadas por el hombre; son tolerantes a los herbicidas de dicamba y glufosinato; contienen al menos un alelo que consiste en el ADN transgénico de la invención; y/o contienen una cantidad

30 detectable de molécula de ADN que comprende al menos una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-10. Se puede seleccionar una semilla de una planta descendiente individual, y, mientras la semilla comprenda una

molécula de ADN que tenga al menos una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-10, estará dentro del alcance de la invención.

En la práctica de la invención, se pueden cruzar dos plantas transgénicas diferentes para producir descendencia híbrida que contiene dos genes heterólogos que se segregan independientemente. La autofecundación de progenies adecuadas puede producir plantas que son homocigotas para ambos genes. También se contempla el retrocruzamiento a una planta progenitora y el cruzamiento exogámico con una planta no transgénica, como es la propagación vegetativa. Se pueden encontrar descripciones y otros métodos que son frecuentemente utilizados para diferentes características y cultivos en una de diversas referencias, *e.g.*, Fehr, in *Breeding Methods for Cultivar Development*, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison WI (1987).

Las plantas y semillas utilizadas en los métodos divulgados en la presente invención también pueden contener uno o más transgenes adicionales. Dicho transgén puede ser una secuencia nucleótida que codifica una proteína o molécula de ARN que proporciona una característica deseada incluyendo pero sin limitarse a resistencia a insectos mejorada, eficiencia mejorada del uso de agua, rendimiento mejorado, resistencia a la sequía mejorada, calidad de las semillas mejorada, calidad de nutrición mejorada, y/o tolerancia al herbicida mejorada, en donde la característica deseada se mide con respecto a una planta de algodón que no posee dicho transgén adicional.

Los métodos de la invención son por lo tanto útiles para, entre otras cosas, controlar las malezas en un campo mientras las plantas crecen con el propósito de producir semillas y/o partes de planta que comprenden el evento de algodón MON 88701 para fines agrícolas o de investigación, seleccionando progenies que comprenden en evento de algodón MON 88701 para el fitomejoramiento de plantas o para fines de investigación, y producir plantas progenitoras y semillas que comprenden el evento de algodón MON 88701.

Las plantas, progenie, semillas, células de planta, partes de planta (tal como polen, óvulo, vainas, flor, tejido de raíz o tallo, y hojas), y productos de consumo de la invención pueden ser evaluados para composición de ADN, expresión de gen, y/o expresión de proteína. Dicha evaluación puede llevarse a cabo utilizando cualquier método estándar como PCR, northern blotting, southern analysis, western blotting, inmunoprecipitación, y ELISA o utilizando los métodos de detección y/o kits de detección proporcionados en la presente invención.

Se proporcionan métodos para detectar la presencia de ADN derivado de una célula de algodón, tejido, semilla, o planta que comprende el evento de algodón MON 88701 en una muestra. Un método consiste en (i) extraer una muestra de ADN de al menos una célula de algodón, tejido, semilla, o planta, (ii) poner en contacto la muestra de ADN con al menos un cebador que es capaz de producir una secuencia de ADN específica al evento de ADN MON 88701 bajo condiciones adecuadas para el secuenciamiento de ADN, (iii) realizar una reacción de secuenciamiento de ADN, y luego (iv) confirmar que la secuencia nucleótida comprende una secuencia nucleótida específica para el evento MON 88701, tal como la que se seleccionó para el grupo que consiste de SEQ ID NO: 1-10. Otro método consiste en (i) extraer una muestra de ADN de al menos una célula de algodón, tejido, semilla, o planta, (ii) poner en contacto la muestra de ADN con un par de cebadores que es capaz de producir un amplicón para el evento de ADN MON 88701 bajo condiciones adecuadas para la amplificación de ADN, (iii) realizar una reacción de amplificación de ADN, y luego (iv) detectar la molécula de amplicón y /o confirmar que la secuencia nucleótida del amplicón comprende una secuencia nucleótida específica para el evento MON 88701, tal como la que se seleccionó para el grupo que consiste de SEQ ID NO: 1-10. El amplicón debería ser específico para el evento MON 88701, tal como un amplicón que comprende SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. La detección de una secuencia de nucleótidos específica para el evento MON 88701 en el amplicón es determinante y/o diagnóstica para la presencia de ADN específico del evento de algodón MON 88701 en la muestra. Se proporciona

un ejemplo de un par de cebadores que es capaz de producir un amplicón para el evento de ADN MON 88701 bajo condiciones adecuadas para la amplificación de ADN como SEQ ID NO: 11-12 Otro par de cebadores puede ser diseñado de inmediato por un experto en el arte y comprenderá al menos

5 un fragmento de SEQ ID NO: 10. Otro método para detectar la presencia de ADN derivado de una célula de algodón, tejido, semilla, o planta que comprende el evento de algodón MON 88701 en una muestra consiste en (i) extraer una muestra de ADN de al menos una célula de algodón, tejido, semilla, o planta, (ii) poner en contacto la muestra de ADN con una sonda de

10 ADN específica para el evento de ADN MON 88701, (iii) permitir que la sonda y la muestra de ADN hibriden bajo condiciones de hibridación astringentes, y luego (iv) detectar la hibridación entre la sonda y la muestra de ADN diana. Un ejemplo de la secuencia de sonda de ADN que es específica para el evento de ADN MON 88701 se proporciona como SEQ ID NO: 13. Otras

15 sondas pueden ser diseñadas por un experto en la técnica y comprenderían al menos un fragmento de SEQ ID NO: 10. La detección de la hibridación de la sonda a la muestra de ADN es diagnóstica para la presencia del evento de algodón específico de ADN MON 88701 en la muestra. La ausencia de hibridación es alternativamente diagnóstica de la ausencia del

20 evento de algodón específico de ADN MON 88701 en la muestra.

Se proporciona la detección de kits de ADN que son útiles para la identificación del evento de algodón de ADN MON 88701 en una muestra y puede aplicarse a métodos para el fitomejoramiento de las plantas de algodón que contienen el evento de ADN adecuado. Dichos kits contienen

25 cebadores y/o sondas que comprenden fragmentos de SEQ ID NO: 1-10. Un ejemplo de dicho kit comprende al menos una molécula de ADN de longitud suficiente de nucleótidos adyacentes de SEQ ID NO: 10 que funcionan como una sonda de ADN útil para detectar la presencia y/o ausencia de ADN derivado de plantas de algodón transgénicas que comprenden el evento

30 MON 88701 en una muestra. El ADN derivado de plantas de algodón transgénicas que comprenden el evento MON 88701 comprenderá una molécula de ADN que tiene al menos una secuencia seleccionada de SEQ ID

NO: 1-10. Se proporciona una molécula de ADN suficiente para utilizar como una sonda de ADN que es útil para determinar, detectar, o diagnosticar la presencia y/o ausencia del evento de algodón de ADN MON 88701 en una muestra se proporciona como SEQ ID NO: 13 Otras sondas pueden ser

5 diseñadas por un experto en la técnica y deberían comprender al menos 15 nucleótidos adyacentes de SEQ ID NO: 10 y ser lo suficientemente únicos para el evento de algodón de ADN MON 88701 a fin de identificar el ADN derivado del evento. Otro tipo de kit comprende un par de cebadores útiles para producir un amplicón útil para detectar la presencia y/o ausencia de

10 ADN derivado del evento de algodón transgénico MON 88701 en una muestra. Dicho kit empleará un método que comprende contactar una muestra de ADN diana con un par de cebadores tal como se describe en la presente, luego realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico suficiente para producir un amplicón que comprende una molécula de ADN

15 que tiene al menos una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-10, y luego detectar la presencia y/o ausencia del amplicón. Dicho método también puede incluir secuenciar el amplicón o un fragmento del mismo, que sería determinante, es decir, diagnóstico para, la presencia del evento de algodón específico de ADN MON 88701 en la muestra de ADN diana. Otro para de

20 cebadores puede ser diseñado por un experto en la técnica y debería comprender al menos 15 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 10 y ser lo suficientemente único al ADN MON 88701 del evento de algodón a fin de identificar el ADN derivado del evento.

La amplificación del ácido nucleico se puede llevar a cabo mediante

25 cualquiera de los diversos métodos de amplificación de ácido nucleico conocidos en el arte, incluyendo métodos de amplificación térmica. Muchas técnicas son conocidas en el arte para detectar, cuantificar, y/o secuenciar el amplicón producido por estos métodos. Una técnica ejemplar útil en la práctica de esta invención es TAQMAN® (PE Applied Biosystems, Foster

30 City, CA).

Los kits y métodos de detección de la invención son útiles para, entre otras cosas, identificar el evento de algodón MON 88701, seleccionar

variedades de plantas o híbridos que comprenden el evento de algodón MON 88701, detectar la presencia de ADN derivado de las plantas de algodón transgénicas que comprenden el evento de algodón MON 88701 en una muestra, y monitorear muestras para la presencia y/o ausencia de plantas de algodón que comprenden el evento MON 88701 o partes de plantas derivadas de plantas de algodón que comprenden el evento MON 88701.

La secuencia de inserto de ADN heterólogo, secuencias de unión, o secuencias de flanqueo del evento de algodón MON 88701 se pueden verificar (y corregir si fuere necesario) amplificando dichas secuencias del evento utilizando cebadores derivados de secuencias proporcionadas en la presente invención seguido del secuenciamiento de ADN estándar del amplicón o del ADN clonado.

Tal como se utiliza en la presente, el término “que comprende” significa “que incluye pero que no se limita a”.

Se incluyen los siguientes ejemplos para demostrar ejemplos de ciertas realizaciones preferidas de la invención. Los expertos en la técnica apreciarán que las técnicas divulgadas en los ejemplos que preceden representan enfoques que los inventores han descubierto que funcionan bien en la práctica de la invención, y por lo tanto se puede considerar que constituyen ejemplos de modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los expertos en la técnica deberían, a la luz de la presente invención, apreciar que se pueden hacer diversos cambios en realizaciones específicas que se divulgan y aun así obtener un resultado similar sin alejarse del espíritu y alcance de la invención.

25

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Transformación de Algodón y selección de evento MON 88701

Este ejemplo describe la producción, análisis, y selección del evento MON 88701. En resumen es la producción y análisis de miles de plantas individuales a lo largo de múltiples años mediante la evaluación molecular

30

rigurosa, fenotípica, y de campo que se requiera para la última selección del evento comercial, el evento MON 88701.

El evento comercial MON 88701 de algodón transgénico tolerante a glufosinato y dicamba se creó a través de la transformación mediada por *Agrobacterium* del tejido hipocótilo del algodón utilizando un vector de transformación de planta que comprende el casete de expresión que se ilustra en la Figura 1. Los métodos para transformar el algodón son conocidos en el arte. Para producir el evento MON 88701, se utilizó material de algodón Coker 130 (Asgrow, St Louis, MO) para transformación de planta. Las células de algodón se transformaron y se regeneraron en plantas de algodón intactas. Las plantas enraizadas con características fenotípicas normales fueron seleccionadas y transferidas a la tierra para crecimiento y evaluación posterior.

Las plantas R0 fueron transferidas a la tierra y sometidas a la evaluación selectiva de herbicidas en proporciones de campos de 1X o 2X (es decir, 0,5 o 1,0 lb/acre de ingrediente activo) tanto de dicamba como de glufosinato. Posteriormente, las plantas R0 que contenían solamente un único casete de expresión T-ADN fueron identificados y seleccionados. El casete de expresión T-ADN contiene el promotor del *Peanut chlorotic streak virus* (PCISV) con una región potenciadora duplicada (P-PCISV.FLt-enh); ligado operativamente a un ADN principal que proviene del transcripto de ARN del *Tobacco etch virus* (L-TEV); ligado operativamente a una molécula de ADN que codifica un péptido de tránsito del cloroplasto N-terminal de 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) de *Arabidopsis thaliana* (TS-CTP2); ligado operativamente a una molécula de ADN que codifica dicamba mono-oxigenasa (DMO) de *Stenotrophomonas maltophilia*; ligado operativamente a una molécula de ADN 3' UTR que proviene del gen E6 de proteína de fibra de algodón *sea-island* (T-Gb.E6-3b); ligado operativamente al promotor del transcripto de ARN potenciado 35S (con una región potenciadora duplicada) del *mosaic virus* (P-CaMV.35S-enh); ligado operativamente a un ADN principal que proviene de la región 5 no traducida del gen de la proteína de choque térmico 70 (HSP70) de *Petunia x hybrida*

(L-Ph.DnaK); ligado operativamente al gen de Resistencia a Bialaphos (*bar*) de *Streptomyces hygroscopicus* que codifica una fosfinotricin acetil transferasa (PAT) (CR-Sh.bar); ligado operativamente a una región 3' no traducida del gen de nopalina sintasa (NOS) (que dirige la poliadenilación de ARNm) de *Agrobacterium tumefaciens* (T-AGRtu.nos).

El evento MON 88701 fue seleccionado entre aproximadamente 151 eventos transgénicos individuales en base a su combinación superior de características fenotípicas (que incluye tolerancia a nivel comercial tanto a herbicidas dicamba como glufosinato), características moleculares (que se determinó usando un análisis de perfil molecular comprehensivo), y asociación de haplotipos. La selección del evento MON 88701 de entre los 151 eventos transgénicos originales fue un proceso de muchos años que requirió análisis de datos en cada etapa. Se procesaron dos ondas de eventos de transformación a fin de permitir un número más grande de eventos a partir de los cuales elegir el evento comercial final. La Tabla 1 proporciona una síntesis de cada tipo de análisis con el número de eventos seleccionado y avanzado para cada paso de selección de evento. El estudio de la eficacia de la prueba de campo de Puerto Rico para la Onda 2 precedió la primera prueba de campo de los Estados Unidos.

20

Tabla 1

Paso de Análisis de Estudio Selectivo de Evento	Onda 1	Onda 2
R0 – Análisis de Calidad de Transformación	48	103
R0 – Análisis de Eficacia de Herbicida	26	57
R1 – Producción de Semilla Agronómica	9	26
R1 - Análisis de Eficacia de Herbicida	9	23
Primera Prueba de Campo de Estados Unidos	8	10
Análisis Molecular Preliminar	4	19

Estudio selectivo de Eficacia de Prueba de Campo de Puerto Rico	3	17
Segunda Prueba de Campo de los Estados Unidos	2	n/d
Análisis Molecular Detallado	1	6

Los 151 eventos R0 transgénicos originales fueron analizados usando una combinación de técnicas analíticas (Análisis de Calidad de Transformación que incluye TaqMan y/o análisis PCR) y Análisis de Eficacia de Herbicida R0 (aerosol de herbicida). Las plantas que contenían el evento
5 seleccionado R0 fueron luego auto-fertilizadas para producir la semilla R1, y 32 de los eventos se avanzaron luego para el Análisis de Eficacia de Herbicida R1.

El análisis molecular detallado se finalizó sobre los eventos que
10 pasaron las pruebas de campo de eficacia y agronómicas. Los análisis por Northern blot se utilizaron para confirmar que los transcritos de ARN mensajero *dmo* y *bar* estaban presentes en muestras preparadas a partir de semillas de los eventos evaluados. El análisis por Western blot se llevó a cabo para confirmar que una única banda de proteína DMO y PAT estaba
15 presente en muestras preparadas a partir de tejido de hojas de los eventos evaluados. La secuenciación N-terminal de la proteína PAT aislada purificada, mostró la secuencia de aminoácidos esperada en la terminal N de la proteína PAT. La secuenciación N-terminal de la proteína DMO aislada purificada mostró 9 aminoácidos de la CTP (TS-CTP2) presentes en la
20 terminal N de la proteína DMO.

La evaluación de campo agronómica constó de eventos de sembrado pareados de isolina positiva e isolina negativa (que contienen el casete transgén y que carece del casete transgén, respectivamente) uno al lado del otro con dos hileras de Coker 130 de tipo salvaje (no-transgénico) por
25 parcela. Se mantuvieron las parcelas libres de malezas y sin insectos usando programas de control convencionales para la duración del ensayo. Los datos recolectados incluyeron fecha de sembrado, conteos de postura,

altura de la planta, número de nódulos, diferencias agronómicas/fenotípicas
brutas, muestras de cápsula de algodón, fecha de la cosecha, y rendimiento.
Los conteos de postura para cada parcela se tomaron a los 10 días después
del sembrado (DAP, siglas para *days after planting*) y nuevamente a los 20
5 DAP. Las cotiledóneas que habían salido completamente de la tierra fueron
consideradas “emergentes”. Cualquier diferencia observada en la densidad
de la planta, es decir crostas, germinación pobre, pérdida debido a crostas,
depuración, *etc.*, fueron observadas. Las posturas finales tuvieron 10 plantas
por metro en promedio. Las mediciones de altura de la planta se tomaron a
10 la primera flor más dos semanas (FF2). Las mediciones promedio de altura
de la planta (cm) de cinco plantas por parcela fueron registradas. Sobre las
mismas plantas que se utilizaron para las mediciones de altura de las
plantas, se realizó el conteo del número de nódulos (cotiledón es nódulo 0).
Cualquier diferencia agronómica bruta se registró, tal como morfología de las
15 hojas, hábito de ramificación, color de la hoja, tiempo para floración, patrón
de fructificación, *etc.* Las muestras de cápsulas se cosecharon de forma
aleatoria a partir de primera posición de cápsulas 50 (solamente semilla de
algodón) desde el medio de las plantas (notas 8-12). Las muestras de
cápsulas se usaron para calcular la fracción de pelusa y calidad de la fibra.
20 Para determinaciones del rendimiento, las parcelas fueron desfoliadas y se
usó un abridor de cápsulas (con etefon, es *decir* PREP) antes de la cosecha.
Las parcelas se cosecharon y se registraron como libras por parcela de
semillas de algodón y se expresaron como libras por acre de semillas de
algodón. No hubo diferencia de rendimiento significativa entre eventos de
25 isolina positiva, los eventos de isolina negativos pareados, y algodón Coker
130 de tipo salvaje para dos años de pruebas de campo agronómicas (Figura
2).

En el año 1, la evaluación de eficacia se llevó a cabo con ocho
eventos comparados con Coker 130 de tipo salvaje, no-transgénico. Para
30 esta evaluación, las parcelas pareadas fueron rociadas con dicamba
(Clarity®, BASF, Research Triangle Park, NC) y glufosinato (Ignite®, Bayer
CropScience, Research Triangle Park, NC) o se dejaron sin rociar. Las

parcelas se mantuvieron libres de malezas y de insectos usando programas de control convencionales para la duración del ensayo. Todos los tratamientos con herbicidas se representan como libras de ingrediente activo por acre (lb/A). Para las parcelas que fueron rociadas, se realizaron las

5 siguientes aplicaciones: se aplicó dicamba pre-emergencia a 1 lb/A seguido por glufosinato aplicado 1,09 lb/A en la etapa de 2 nódulos, seguido por dicamba aplicado a 1 lb/A en la etapa de 5 nódulos, seguido por glufosinato aplicado a 1,09 lb/A en la etapa de 8 nódulos, seguido por dicamba aplicado a 1 lb/A en la etapa de 12 nódulos. Ni dicamba ni glufosinato se aplicaron

10 con tensioactivos, aditivos fertilizantes, u otro adyuvante. Se tomaron las calificaciones de lesiones en las siguientes etapas, que fueron inmediatamente anteriores a la siguiente aplicación de herbicida asignada: en la etapa del algodón de 2 nódulos, se tomó la actividad de calificación de acuerdo a epinastia porcentual (daño por dicamba) y lesión total porcentual,

15 con foco en la epinastia; en la etapa de 5 nódulos, se tomó la actividad de calificación de acuerdo a epinastia porcentual, quemado o necrosis porcentual (lesión por glufosinato) y lesión total porcentual, con foco en la necrosis; en la etapa de 8 nódulos, se tomó la clasificación de actividad de acuerdo a epinastia porcentual, quemado o necrosis porcentual, y lesión total

20 porcentual, con foco en epinastia; en la etapa de 12 nódulos, se tomó la clasificación de actividad de acuerdo a epinastia porcentual, quemado o necrosis porcentual y lesión total porcentual, con foco en necrosis; en la etapa media de floración, se tomó la clasificación de actividad de acuerdo a epinastia porcentual, quemado o necrosis porcentual y lesión total

25 porcentual, con foco en epinastia; y para etapa tardía de floración, se tomó la clasificación de actividad de acuerdo a epinastia porcentual, quemado o necrosis porcentual y lesión total porcentual. Se recolectaron datos agronómicos adicionales en estas pruebas de campo de eficacia que incluye: fecha de plantación, conteo de conteos de postura (tomados a los 7 y 14

30 DAP), diferencias agronómicas/fenotípicas brutas, fecha de cosecha, y rendimiento. Las clasificaciones de lesiones utilizaron escalas porcentuales de ciencias de las malezas estándares donde 0% significa sin lesión del

cultivo y 100% significa muerte del cultivo total. Las clasificaciones realizadas para lesiones por dicamba se denominan como epinastia y aparecen como torceduras, malformación en el crecimiento. Las clasificaciones realizadas para lesión por glufosinato se denominan como quemado o necrosis y aparecen como clorosis y o necrosis. Para determinaciones de rendimiento, las parcelas fueron desfoliadas y se usó un abridor de cápsulas (con etefon, es *decir* PREP) antes de la cosecha. Las parcelas fueron cosechadas y se registraron los rendimientos como lbs/parcela de semilla de algodón y se expresaron como lb/acre de semilla de algodón. Las diferencias agronómicas/fenotípicas fueron perfil de fructificación de notedin como normal o como no usual. No hubo diferencia significativa en rendimiento de semillas de algodón entre eventos pareados rociados y no rociados en comparación con Coker 130 de tipo salvaje sin rociar (Figura 3). El Coker 130 de tipo salvaje no sobrevivió el régimen de rociado (Figura 7).

En el año 2, la evaluación de eficacia se llevó a cabo con doce eventos comprados con Coker 130 de tipo salvaje, no transgénico. Para esta evaluación, las parcelas pareadas fueron tanto rociadas como no rociadas. Las parcelas se mantuvieron libres de malezas y de insectos usando programas de control convencionales para la duración del ensayo. Para las parcelas que fueron rociadas, se llevó a cabo las siguientes aplicaciones de tratamiento (1) 0,5 lb/A dicamba se aplicó PRE, Temprano POST, Medio POST y Tardío POST; (2) 1 lb/A dicamba se aplicó PRE, Temprano POST, Medio POST y Tardío POST; (3) 2 lb/A dicamba se aplicó PRE, Temprano POST, Medio POST y Tardío POST; (4) 0,5 lb/A glufosinato se aplicó Temprano POST, Medio POST y Tardío POST; (5) 1 lb/A glufosinato se aplicó Temprano POST, Medio POST y Tardío POST; (6) 2 lb/A glufosinato se aplicó Temprano POST, Medio POST y Tardío POST; y 7) Control (sin rociar). Pre-emergencia (PRE) se define como inmediatamente después de la siembra del algodón (dentro de las 24 horas); Temprano POST como algodón de 2 nódulos; Medio POST como algodón de 8 nódulos; y Tardío POST como algodón de 14 nódulos. Para estas pruebas de campo de

eficacia, hubo tres parcelas compuestas completamente de algodón de tipo salvaje (Coker 130). En cada momento post-emergencia (Temprano, Medio, Tardío), una mitad de la parcela se roció con la proporción de 1X (0,5 lb/A) de dicamba y una mitad de la misma parcela se roció con la proporción 1X (0,5 lb/A) de glufosinato. Cada una de las tres parcelas recibieron rociado de dicamba y glufosinato en una de las aplicaciones de rociado en el momento post-emergencia (Temprano, Medio, Tardío).

El protocolo de rociado consistió en los herbicidas aplicados a razón de 37,85 litros (10 galones) por acre de volumen de agua utilizando la siguiente configuración de rociado (que está dentro de las medias utilizadas para la mayoría de las investigaciones científicas sobre la maleza). Se utilizaron puntas de rociado planas extendidas XR TeeJet® con un ángulo de rociado de 80 grados (TeeJet Technologies, Wheaton, IL). Había 2 boquillas por hilera (boquillas espaciadas en 15" para 30" hileras, 19" para 38" hileras y 20" para 40" hileras). El tamaño de la boquilla dependió de la velocidad de rociado y del espaciado de la boquilla; sin embargo, el tamaño de la boquilla se seleccionó para lograr una presión de rociado de 25 a 35 PSI. La altura del aguilón se ajustó para permitir una superposición de rociado de 50% (que se lleva acabo aproximadamente a 30" por encima del cultivo).

En cada momento de la clasificación, se registraron la siguientes observaciones: 1) necrosis porcentual o quemado en las hojas más afectadas. 2) necrosis porcentual o quemado en la base total de la planta; 3) epistanía; y 4) cualquier otro daño relevante que se haya observado. Se tomaron las clasificaciones durante cuatro días después de cada aplicación inmediatamente antes de las aplicaciones subsiguientes. El tiempo del esquema de clasificación y objetivo fueron los siguientes: 1) 4-7 días post-emergencia y nuevamente inmediatamente antes del rociado de 2 nódulos para controlar efectos de preemergencia de rociado de dicamba. 2) 4 días después del rociado de 2 nódulos y nuevamente inmediatamente antes del rociado de 8 nódulos para determinar la clasificación del rociado de 2 nódulos; 3) 4 días después del rociado de 8 nódulos y nuevamente

inmediatamente antes del rociado de 14 nódulos para determinar la clasificación del rociado de 8 nódulos; 4); 4 días después del rociado de 14 nódulos y nuevamente 10 días después del rociado de 14 nódulos para determinar la clasificación del rociado de 14 nódulos; y 5) corte para

5 determinar la clasificación de la temporada tardía del efecto neto de todos los rociadores. Las clasificaciones de lesión utilizaron escalas porcentuales de ciencias de las malezas estándares donde 0% significa sin lesión del cultivo y 100% significa muerte del cultivo total. Las clasificaciones realizadas para lesiones provocadas por el dicamba se denominan como epinastia y

10 aparecen como curvaturas, malformación en el crecimiento. Las clasificaciones realizadas para lesiones provocadas por el glufosinato se denominan como quemado o necrosis y aparecen como clorosis y o necrosis. Para determinaciones de rendimiento, las parcelas fueron desfoliadas y se usó un abridor de cápsulas (con etefon, es *decir* PREP) antes de la cosecha.

15 Las parcelas fueron cosechadas y se registraron los rendimientos como lbs/parcela de semilla de algodón y se expresaron como lb/acre de semilla de algodón. El Coker 130 de tipo salvaje no sobrevivió el rociado de herbicida y por lo tanto no se registró rendimiento para las parcelas de Coker 130. Como se observa en la figura 4.A, el rendimiento fue prácticamente el mismo para

20 las plantas que comprenden el evento MON 88701 con clasificaciones de aplicación mayores para el herbicida dicamba. Como se observa en la Figura 4.B, el rendimiento fue prácticamente el mismo para las plantas que comprenden el evento MON 88701 con clasificaciones de aplicación mayores para el herbicida de glufosinato. Para las clasificaciones de la lesión, la

25 Figura 5.A muestra un porcentaje de lesión mayor para las plantas que comprenden el evento MON 88701 con clasificaciones de aplicación mayores de dicamba. La Figura 5.B muestra un porcentaje de lesión mayor para las plantas que comprenden el evento MON 88701 con clasificaciones de aplicación mayores de glufosinato.

30 En el año 3, la evaluación de eficacia del campo de evento MON 88701 fue conducida para estudiar la clasificación y el tiempo de aplicación del dicamba y/o glufosinato. Las parcelas se mantuvieron libres de malezas y

de insectos usando programas de control convencionales para la duración del ensayo. El tratamiento y tiempo de aplicación se detallan en la Tabla 2. Ni dicamba ni glufosinato se aplicaron con tensioactivos, aditivos fertilizantes, u otro adyuvante. El protocolo de rociado fue como se describió para el ensayo de la evaluación de eficacia del campo del año 2. La clasificación de la postura de la planta, clasificación de la lesión visual (porcentaje de epinastía, porcentaje de necrosis), altura de la planta y número de nódulo, muestra de cápsulas 50, y determinación del rendimiento se describieron previamente para ensayos de eficacia y agronómicos del campo.

Tabla 2

Tratamiento	Proporción (lb ai/A)	Momento de la Aplicación			
		1 a 3 Nódulos	5 a 7 nódulos	10 a 12 nódulos	15 a 18 nódulos
1	0,5	Dicamba	Glufosinato	Dicamba	Glufosinato
2	1	Dicamba	Glufosinato	Dicamba	Glufosinato
3	0,5	Glufosinato	Dicamba	Glufosinato	Dicamba
4	1	Glufosinato	Dicamba	Glufosinato	Dicamba
5	0,25*	Mezcla en Tanque	Mezcla en Tanque	Mezcla en Tanque	Mezcla en Tanque
6	0,5*	Mezcla en Tanque	Mezcla en Tanque	Mezcla en Tanque	Mezcla en Tanque
7	1*	Mezcla en Tanque	Mezcla en Tanque	Mezcla en Tanque	Mezcla en Tanque
8	0,5	Dicamba	Dicamba	Dicamba	Dicamba
9	1	Dicamba	Dicamba	Dicamba	Dicamba
10	0,5	Glufosinato	Glufosinato	Glufosinato	Glufosinato
11	1	Glufosinato	Glufosinato	Glufosinato	Glufosinato
12	-	Control	-	-	-
*Con mezclas en Tanques, la proporción es la que se utilizó para los herbicidas individuales: 0,25 = 0.25 lb/A dicamba + 0,25 lb /A glufosinato					

Apareció un leve obstáculo de rendimiento cuando el dicamba y el glufosinato se mezclaron en un tanque y se aplicaron cuatro veces durante la estación a razón de 1 lb/acre cada uno (Figura 6). Para todos los otros regímenes de tratamiento, no hubo pérdida de rendimiento de las plantas que

comprendían el evento MON 88701 cuando se rociaron con dicamba, glufosinato, o dicamba y glufosinato (Figura 6).

Ejemplo 2: caracterización de las secuencias de ADN MON 88701

5 Este ejemplo describe la caracterización molecular del evento MON 88701. El ADN insertado en el genoma de las plantas de algodón que comprende MON 88701 y la secuencia genómica que flanquea esta inserción fueron caracterizados mediante análisis molecular detallados. Estos análisis incluyeron: la secuencia del inserto, la cantidad de inserto (cantidad de sitios
10 de integración dentro del genoma de algodón), cantidad de copias (cantidad de copias del ADN transgénico dentro del sitio), la integridad del casete del gen insertado, las secuencias flanqueantes, y la asociación de la inserción con regiones haplotipas del genoma de algodón.

Se utilizaron sondas moleculares de ADN que incluyeron la región de
15 codificación intacta y sus elementos regulatorios respectivos, las secuencias de promotores, nitrones, y poliadenilación de los casetes de expresión de la planta. El análisis mostró que MON 88701 contenía una sola inserción ADN transgénico con una copia del casete de expresión. La PCR inversa y los análisis de secuencia de ADN se llevaron a cabo para determinar las uniones
20 del genoma inserto a la planta 5' y 3', confirmar la organización de los elementos dentro del inserto (Figura 1), y determinar la secuencia de ADN completa del inserto en plantas de algodón que comprende el evento MON 88701 (denominado en la presente SEQ ID NO: 9). Es una aspecto de la invención una planta de algodón que comprende en su genoma elementos
25 genéticos del transgén unido ilustrados en la Figura 1 y es resistente a los herbicidas de dicamba y glufosinato en un aspecto de la invención.

Las secuencias que flanquean la inserción de ADN transgénico en MON 88701 fueron determinadas utilizando PCR inversa tal como se describe en Ochman *et al.*, 1990 (PCR Protocols: A guide to Methods and
30 Applications, Academic Press, Inc.) y/o técnicas de paseo cromosómico. El ADN genómico de la planta fue aislado tanto de Coker 130 como de la líneas de algodón transgénico que crecen bajo condiciones de invernadero

estándar. Aproximadamente 0,2 gramos de tejido de hojas jóvenes se liofilizaron y potenciaron mediante el agregado de varias pequeñas perlas de metal seguido de agitación vigorosa. Se lavó el tejido dos veces con 5mL de metanol al 100% seguido de un lavado con 5mL de metanol al 50% para
5 eliminar los compuestos fenólicos que interfieren. Se extrajo el ADN con la adición de 7 mL de extracción de buffer de CTAB (100 mM Tris pH 8,0, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2 % p/v bromuro de hexadeciltrimetilamonio, 1 % p/v polivinilpirrolidona, 1% p/v poli(vinilpolipirrolidona), 0,07% de beta-mercaptoetanol, 1 mM DTT). Se incubaron muestras a 65°C durante 45 min
10 para lisar completamente las células luego, hilar durante 5 min a 3000g para eliminar el desecho insoluble. Se extrajo el sobrenadante con 7 mL de cloroformo-alcohol isoamil 24:1, se hiló a 3000 g durante 5 min para separar las fases, y se extrajo el ADN de la fase acuosa en un tubo fresco con el agregado de 6 mL de isopropanol. Los pellets de ADN se lavaron con 6 mL
15 de etanol al 70% para remover la sal, y los pellets se dejaron secar al aire. Los pellets de ADN se resuspendieron en 10 mM Tris pH 8,0 que contienen 0,5 ug/mL DNase-libre RNase y se incubaron a 37°C 1 hora. Siguiendo el tratamiento, se cuantificó el ADN utilizando Quant-iT™ PicoGreen® (Sondas moleculares, Inc. Eugene, OR). Este método puede ser modificado por un
20 experto en la técnica para extraer el ADN de cualquier tejido de algodón. Se digirió una alícuota de ADN con endonucleasas de restricción seleccionadas en base al análisis de restricción del transgén de ADN. Después de la auto ligación de los fragmentos de restricción, el PCR se llevó a cabo utilizando cebadores diseñados a partir de la secuencia del ADN transgénico que
25 amplificaría las secuencias que se extienden desde los extremos 5' y 3' del transgén de ADN. Los productos de PCR se separaron con electroforesis en geles de agarosa y se purificaron utilizando un kit en gel para purificación QIAGEN (Qiagen, Valencia, CA). Los siguientes productos de ADN se secuenciaron utilizando directamente los protocolos de secuenciamiento de
30 ADN estándares. La secuencia flanqueante 5' que se extiende en el borde derecho de la secuencia del ADN transgénico del casete de expresión se presenta como SEQ ID NO: 7 ([C], véase Figura 1). La secuencia

flanqueante 3' que se extiende en el borde izquierdo de la secuencia del ADN transgénico del casete de expresión se presenta como SEQ ID NO: 8 ([D], véase Figura 1). La porción del casete de expresión del ADN transgénico que fue totalmente integrado en el ADN genómico Coker se presenta como SEQ ID NO: 9 ([E], véase Figura 1).

Las secuencias de moléculas de ADN aisladas se compararon con la secuencia del ADN transgénico para identificar la secuencia flanqueante y el fragmento del ADN transgénico co aislado. La confirmación de la presencia del casete de expresión se logró por PCR con los cebadores diseñados en base a los datos de la secuencia flanqueante deducida y la secuencia del ADN transgénico conocida. La secuencia de tipo salvaje que corresponde a la misma región en la cual se integró el ADN transgénico en la línea transformada se aisló utilizando cebadores diseñados para secuencias flanqueantes en MON 88701. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando la Mezcla Maestro Universal para PCR de alta fidelidad Phusion® con buffer HF (New England Biolabs, Ipswich, MA). Las secuencias flanqueantes de ADN en MON 88701 y la secuencia de Coker de tipo salvaje se analizaron utilizando nucleótidos múltiples y base se datos de proteínas. Esta información fue utilizada para examinar la relación del transgén con el genoma de la planta y para lograr la integridad del sitio de inserción. La secuencia flanqueante y las secuencias del tipo salvaje se utilizaron para diseñar los cebadores para los análisis del punto neutro TAQMAN® utilizados para identificar los eventos. Los ensayos de cigocidad se desarrollaron utilizando esta información.

El casete del transgén de tolerancia al glufosinato y dicamba fue mapeado en plantas de algodón que comprenden el evento MON 88701 en el cromosoma A08 en la posición del mapa 19,3 cM y bordeado por NG0207927 en la posición del mapa de 18,6 cM a la izquierda y por NG0207529 en la posición del mapa de 20,0 cM a la derecha.

30

Ejemplo 3: Análisis del punto neutro TAQMAN® del evento específico

Este ejemplo describe un método de amplificación térmica del punto neutro TAQMAN® del evento específico desarrollado para identificar el evento MON 88701 en una muestra. Los ejemplos de condiciones útiles con el método de punto neutro TAQMAN® específico del evento MON 88701 son

5 los siguientes: Paso 1: 18 megohm de agua ajustado a un volumen final de 10 µl. Paso 2: 5,0 µl de Mezcla Maestro Universal 2X (dNTPs, enzima, buffer) a una concentración final de 1X. Paso 3: 0,5 µl Evento Cebador-1 (SQ21654) y Evento Cebador-2 (SQ23205). Mezcla (resuspendida en 18 megohm de agua a una concentración de 20 µM para cada cebador) a 1,0

10 µM de concentración final (por ejemplo en un tubo microcentrifugo, debería agregarse lo siguiente para lograr 500 µl a una concentración final de 20 µM: 100 µl de Cebador SQ21654 a una concentración de 100 µM; 100 µl de Cebador SQ23205 a una concentración de 100 µM; 300 µl de 18 megohm de agua). Paso 4: 0,2 µl Evento 6-FAM™ MGB Sonda PB10280 (resuspendido

15 en 18 megohm de agua a una concentración de 10 µM a 0,2 µM concentración final. Paso 5: 0,5 µl Cebador-1 de Control Interno y Mezcla de Cebador-2 de Control Interno (resuspendido en 18 megohm de agua a una concentración de 20 µM para cada cebador) a 1,0 µM concentración final. Paso 6: 0,2 µl Control Interno Sonda VIC™ a 0,2 µM concentración

20 final (resuspendido en 18 megohm de agua a una concentración de 10 µM) Paso 7: 3,0 µl de ADN extraído (templado) para cada muestra con uno de lo siguiente que comprende 1. Muestras de hoja a ser analizadas; 2. Control Negativo (ADN no transgénico); 3. Control de agua negativo (no templado); 4. Control Positivo ADN MON 88701. Paso 8: Condiciones de Termociclado

25 de la siguiente forma: Un ciclo a 50°C durante 2 minutos; un ciclo a 95°C durante 10 minutos; Diez ciclos de 95°C durante 15 segundos luego 64°C durante 1 minuto con -1°C/ciclo; Treinta ciclos de 95°C durante 15 segundos luego 54°C durante 1 minuto, de 10 a 20 ciclos adicionales opcionales (95°C durante 15 segundos luego 64°C durante 1 minuto (-1°C/ciclo) pueden

30 proporcionar separación de población diferente durante el análisis de punto neutro TaqMan®; Ciclo final de 10°C.

Los cebadores de ADN utilizados en el análisis del punto neutro son cebadores SQ21654 (SEQ ID NO: 11), SQ23205 (SEQ ID NO: 12), y la sonda rotulada 6-FAMTM PB10280 (SEQ ID NO: 13). 6-FAMTM es un producto de tinte fluorescente de Applied Biosystems (Foster City, CA) unido a la sonda de ADN. Para las sondas TAQMAN® MGBTM la actividad exonucleasa 5' de la Taq ADN polimerasa se adhiere a la sonda de un extremo 5', entre el fluoróforo y el inhibidor. Cuando se hibrida a la cepa de ADN diana, el inhibidor y el fluorófono se separan lo suficientemente para producir una señal fluorescente, emitiendo de ese modo fluorescencia. SQ21654 (SEQ ID NO: 11) y SQ23205 (SEQ ID NO: 12) cuando se utilizan con estos métodos de reacción con PB10280 (SEQ ID NO: 13) produce un amplicón de ADN que se utiliza para diagnosticar el evento de ADN MON 88701. Los controles para este análisis deberían incluir un control positivo del algodón que contiene el evento de ADN MON 88701, y un control negativo para e algodón no transgénico, y un control negativo que no contiene ADN templado. Adicionalmente, un control para la reacción de PCR incluye Cebadores de Control Interno y una Sonda de Control Interno, específicos para un gen de copia única en el genoma *Gossypium*. Un experto en la técnica sabrá cómo diseñar cebadores específicos para un gen de copia única en el genoma *Gossypium*. Se optimizan estos ensayos para utilizar ya sea con Biosistemas Aplicados del Sistema PCR 9700 GeneAmp® (que funciona a su máxima velocidad) o un termociclador MJ Research PTC-225 DNA Engine. Otros métodos y aparatos conocidos por los expertos en la técnica que producen amplicones para identificar el evento de ADN MON 88701 están dentro de la técnica del arte.

Las plantas RO que demuestran la presencia del casete de expresión se dejaron desarrollar en plantas totalmente maduras y se cosechó la semilla de estas. Las sondas basadas en la secuencia del casete de expresión se utilizaron para determinar el número de copia del casete de expresión transgénico en las plantas R1 utilizando una combinación del análisis Southern en el punto neutro TAQMAN®.

Un ensayo de cigocidad es útil para determinar si una planta que comprende un evento es homocigota para el evento de ADN; es decir que comprende el ADN exógeno en el mismo sitio en cada cromosoma de un par de cromosomas; o heterocigota para un evento de ADN, es decir que

5 comprende el ADN exógeno en solamente un cromosoma de un par de cromosomas; o es nulo para el evento de ADN, que es del tipo salvaje. El método de amplificación térmica del punto neutro TAQMAN® también fue utilizado para desarrollar ensayos de cigocidad para el evento MON 88701. Este ejemplo describe un método de amplificación térmica del punto neutro

10 TAQMAN® específico del evento desarrollado para determinar la cigocidad del evento MON 88701 en una muestra. Para este ensayo, se empleó un ensayo de tres cebadores en donde el cebador SQ21654 hibrida y se extiende específicamente desde la unión 3' del ADN exógeno insertado y el ADN genómico, el cebador SQ23205 hibrida y se extiende específicamente

15 desde el ADN que flanquea el lado 3' del ADN exógeno insertado, y el cebador SQ23901 hibrida y se extiende específicamente desde el ADN genómico en el cual se integró el ADN exógeno insertado. Los tres cebadores son diagnósticos para el evento. En este ejemplo, el cebador SQ21654 y el cebador SQ23205 y la sonda de oligonucleótidos rotulada 6-

20 FAM™ PB10280 son diagnósticos cuando existe una copia del ADN exógeno insertado. En este ejemplo, SQ23205 y el cebador SQ23901 y la sonda de oligonucleótidos rotulada VIC™ PB10631 son diagnósticos cuando no existe una copia de ADN exógeno presente en el ADN genómico, es decir, del tipo salvaje. Cuando los tres cebadores y las dos sondas se mezclan en una

25 reacción de PCR con ADN extraído de una planta homocigota para el evento MON 88701, existe una señal fluorescente solamente para la sonda de oligonucleótidos rotulada 6-FAM™ PB10280 que es indicativa de y diagnóstica para una planta heterocigota para el evento MON 88701. Cuando los tres cebadores y las dos sondas se mezclan en una reacción de PCR con

30 ADN extraído de una planta heterocigota para el evento MON 88701, existe una señal fluorescente para la sonda de oligonucleótidos rotulada 6-FAM™ PB10280 y para la sonda de oligonucleótidos rotulada VIC™ PB10631 que

es indicativa de y diagnóstica para una planta homocigota para el evento MON 88701. Cuando los tres cebadores y las dos sondas se mezclan en una reacción de PCR con ADN extraído de una planta que es nula para el evento MON 88701 (es decir del tipo salvaje), existe una señal fluorescente

5 solamente para la sonda de oligonucleótidos rotulada VIC™ PB10631 que es indicativa de y diagnóstica para una planta homocigota para el evento MON 88701, es decir del tipo salvaje. Los ejemplos de condiciones útiles con este método son los siguientes. Paso 1: 18 megohm de agua ajustado a un volumen final de 10 µl. Paso 2: 5,0 µl de Mezcla Maestro Universal 2X

10 (Applied Biosystems cat # 4304437; dNTPs, enzima, buffer) a una concentración final de 1X. Paso 3: 0,5 µl de cebadores de Cigocidad SQ21654; SQ23205 y SQ23901 (resuspendidos en 18 megohm de agua a una concentración de 20 µM para cada cebador) a una concentración final de 1,0 µM. Paso 4: 0,2 µl Cebador 6-FAM™ PB10280 (resuspendido en 18

15 megohm de agua a una concentración de 10 µM) a una concentración final de 0,2 µM. Paso 5: 0,2 µl Cebador VIC™ PB10631 (resuspendidos en 18 megohm de agua a una concentración de 10 µM) a una concentración final de 0,2 µM. Paso 6: 3,0 µl de ADN extraído (templado) para cada muestra con uno cada uno de los siguientes comprende 1. Muestras de hojas a ser

20 analizadas (4-5 ng/ul de ADN genómico diluido en agua); 2. Control Negativo (ADN de algodón no transgénico; 5 ng/ul diluido en agua); 3. Control de agua negativo (sin templado; solución en la cual se re suspendió el ADN); 4 Control Positivo de ADN genómico MON 88701 de muestras heterocigotas conocidas (5 ng/ul diluido en agua); 5.4. Control positivo del ADN genómico

25 MON 88701 de muestras homocigotas conocidas (5ng/ul diluido en agua) Paso 7: mezclar suavemente. Paso 8: Condiciones de Termociclado cuando se utiliza Biosistemas Aplicados GeneAmp® PCR Sistema 9700 (funciona a su máxima velocidad) o ciclado térmico MJ Research DNA Motor PTC-225 de la siguiente manera: Un ciclo a 50°C durante 2 minutos; un ciclo a 95°C

30 durante 10 minutos; Diez ciclos de (95°C durante 15 segundos luego 64°C durante 1 minuto (-1°C/ciclo); Treinta ciclos de (95°C durante 15 segundos luego 54°C durante 1 minuto); de 10 a 20 ciclos opcionales adicionales (95°C

durante 15 segundos luego 64°C durante 1 minuto (-1°C/ciclo) pueden proporcionar separación de población diferente durante el análisis de punto neutro TaqMan®; 1 ciclo a 10°C.

5 **Ejemplo 4: Identificación del evento MON 88701 en cualquier actividad de fitomejoramiento**

Este ejemplo describe cómo se puede identificar el evento MON 88701 dentro de la progenie de cualquier actividad de fitomejoramiento del algodón. Los pares de cebadores del evento de ADN se utilizan para producir
 10 un amplicón diagnóstico para el evento del algodón MON 88701. Un amplicón diagnóstico para MON 88701 comprende al menos una de las secuencias proporcionadas como SEQ ID NO: 1-10. Los pares de cebadores del evento que producirán un amplicón diagnóstico para MON 88701 incluyen pares de cebadores en base a las secuencias de flaqueo y el casete de
 15 expresión insertado. Por ejemplo, para producir un amplicón diagnóstico en el cual se encuentra un SEQ ID NO: 1 se debería diseñar un cebador directo en base a la porción de la secuencia genómica flanqueante de SEQ ID NO: 7 y un cebador inverso en base a la secuencia de ADN del casete de expresión insertado con los cebadores de longitud suficiente de nucleótidos contiguos
 20 para hibridar específicamente el evento de ADN. Para producir un amplicón diagnóstico en el cual se encuentra un SEQ ID NO: 2 se debería diseñar un cebador directo en base a la secuencia de ADN del casete de expresión insertado y un cebador inverso en base a la porción genómica de la secuencia flanqueante de SEQ ID NO: 8 con los cebadores de longitud
 25 suficiente de nucleótidos contiguos para hibridar específicamente el evento de ADN. A los efectos prácticos, se debería diseñar cebadores que producen amplicones de un rango de tamaño limitado, por ejemplo, entre 100 y 1000 bases. Los amplicones de tamaño más pequeño (longitud de polinucleótido más corta) son en general mas confiables producidos con reacciones de
 30 PCR, permiten ciclos de tiempo más cortos, y se pueden separar fácilmente y visualizar en geles de agarosa o adaptados para usar en los análisis del punto neutro tipo TAQMAN®. Los amplicones más pequeños se pueden

producir y detectar mediante métodos conocidos en el arte de detección del amplicón de ADN. Además, los amplicones producidos que utilizan los pares de cebadores se pueden clonar en vectores, propagar, aislar, y secuenciar, o se pueden secuenciar directamente con métodos bien establecidos en la técnica. Cualquier par de cebadores es útil en un método de amplificación de ADN para producir un amplicón diagnóstico para MON 88701 o plantas que comprenden MONS 88701 o su progenie es un aspecto de la invención. Un ejemplo de las condiciones para este análisis se ilustra en el ejemplo 3.

Un análisis para el evento MON 88701 que contiene la muestra del tejido de planta debería incluir un control de tejido positivo de una planta que comprende el evento MON 88701, un control negativo de una planta de algodón no contiene el evento MON 88701 (por ejemplo, pero sin limitarse a Coker) y un control negativo que no contiene ADN de algodón genómico. Un par de cebadores que amplificará una molécula de ADN de algodón endógena servirá como control interno para las condiciones de amplificación del ADN. Las secuencias de cebadores adicionales se pueden seleccionar de SEQ ID NO: 10 por los expertos en la técnica de los métodos de amplificación de ADN, y condiciones seleccionadas para la producción de un amplicón por los métodos ilustrados en el Ejemplo 3 pueden diferir, pero resultan en un amplicón diagnóstico para el evento de ADN MON 88701. Los kits de detección de ADN contienen al menos un cebador de ADN de longitud suficiente de nucleótidos contiguos derivados de SEQ ID NO: 10, que cuando se utilizan en métodos de amplificación de ADN produce un amplicón diagnóstico para MON 88701 es un aspecto de la invención.

Se ha realizado un depósito de una muestra representativa de semilla de algodón que comprende el evento MON 88701 de acuerdo con el Tratado de Budapest en la Colección de Cultivo Tipo de EEUU (American Type Culture Collection (ATCC)) con domicilio en 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia USA, Código Postal 20110. La Designación de Depósito de Patente ATCC (número de acceso) para semillas que comprenden el evento MON 88701 es PTA-11754 y la fecha de depósito fue el 17 de marzo de 2011. El acceso a los depósitos estará disponible durante el curso de la

solicitud al Comisario de Patentes y Marcas y personas designadas por el Comisario que serán designadas para ello a petición. Se mantendrá este depósito en el depositario por un período de 30 años, o 5 años después de la última solicitud, o durante la vida efectiva de la Patente, lo que sea más largo, y será reemplazado si fuere necesario durante ese período.

Habiendo ilustrado y descrito los principios de la invención, resultará evidente para los expertos en la técnica que la invención puede ser modificada en cuanto a su disposición y detalles sin alejarse de dichos principios. Reivindicamos todas las modificaciones que están dentro del espíritu y alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia nucleótida seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 1-10, y
5 complementos de los mismos.

2. La molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1 que se forma por la inserción de una molécula de ácido nucleico heteróloga en el ADN genómico de una planta de algodón o célula.

3. La molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1, en donde
10 dicha molécula de ADN es derivada de una planta de algodón transgénica que comprende el evento MON 88701, una muestra representativa de una semilla que comprende el evento de algodón MON 88701 que ha sido depositada en la ATCC No. de Acceso PTA-11754.

4. La molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1, en donde
15 dicha molécula de ADN está en una planta de algodón, célula de planta, semilla, parte de planta, o producto de consumo.

5. La molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1, en donde dicha molécula de ADN es un amplicón diagnóstico para la presencia de ADN derivado del evento MON 88701.

20 6. Una sonda de ADN que comprende una secuencia nucleótida de longitud suficiente de nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 10, o un complemento del mismo, para funcionar como una sonda de ADN que hibrida bajo condiciones de hibridación rigurosas con una molécula de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que
25 consiste de SEQ ID NO: 1-10 y no hibrida bajo condiciones rigurosas de hibridación con una molécula de ADN que no comprende una secuencia nucleótida seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 1-10.

7. Un par de moléculas de ADN que comprende una primera molécula de ADN y una segunda molécula de ADN diferente de la primera molécula de
30 ADN, en donde dicha primera y segunda moléculas de ADN comprenden cada una, una secuencia nucleótida de longitud suficiente de nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 10, o un complemento del mismo, para funcionar

como cebadores de ADN cuando se utilizan juntos en una reacción de amplificación con ADN derivado del evento MON 88701 para producir un amplicón diagnóstico para el evento de algodón de ADN MON 88701 en una muestra.

5 8. Un método para detectar la presencia de una molécula de ADN derivada de una planta de algodón que comprende el evento MON 88701 en una muestra, dicho método comprende:

- a) contactar dicha muestra con la sonda de ADN de la reivindicación 6;
- b) someter dicha muestra y dicha sonda de ADN a condiciones de
10 hibridación rigurosas; y
- c) detectar la hibridación de dicha sonda de ADN a una molécula de ADN en dicha muestra, en donde la hibridación de dicha sonda de ADN a dicha molécula de ADN indica la presencia de una molécula de ADN derivada de un evento de algodón MON 88701 en dicha muestra.

15 9. Un método para detectar la presencia de una molécula de ADN derivada de una planta de algodón que comprende el evento MON 88701 en una muestra, dicho método comprende:

- a) contactar dicha muestra con el par de moléculas de ADN de la reivindicación 7;
- 20 b) llevar a cabo una reacción de amplificación suficiente para producir un amplicón de ADN que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 1-10, y complementos de los mismos; y
- c) detectar la presencia de dicho amplicón de ADN en dicha reacción, en
25 donde la presencia de dicho amplicón de ADN en dicha reacción indica la presencia de una molécula de ADN derivada de una planta de algodón que comprende el evento MON 88701 en dicha muestra.

30 10. Un kit de detección de ADN que comprende al menos una molécula de ADN que comprende una secuencia nucleótida de longitud suficiente de nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 10, y sus complementos, para funcionar como una sonda o cebador de ADN específico para detectar la presencia de ADN derivado de una planta de algodón que comprende el

evento MON 88701, en donde la detección de dicho ADN es diagnóstica para la presencia del evento de ADN MON 88701 en una muestra.

11. Una planta de algodón recombinante, semilla, célula, o parte de planta de la misma que comprende la molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1.

12. La planta de algodón recombinante, semilla, célula, o parte de planta de la misma de la reivindicación 11, en donde dicha planta, semilla, o parte de planta de la misma es tolerante al tratamiento con herbicidas de dicamba y glufosinato.

13. La planta de algodón recombinante, semilla, célula, o parte de planta de la misma de la reivindicación 11, el genoma del cual produce un amplicón que comprende una molécula de ADN seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 1-10, y sus complementos, cuando se ensayan en un método de amplificación de ADN.

14. Una planta de algodón, semilla, célula o parte de la misma que comprende el evento MON 88701, una muestra representativa de la semilla que comprende el evento MON 88701 que ha sido depositado bajo la ATCC No de acceso PTA-11754.

15. La planta de algodón, semilla, célula o parte de la misma de la reivindicación 14, en donde dicha planta de algodón o semilla es un híbrido que tiene al menos un progenitor que comprende el evento de algodón MON 88701.

16. Un material de planta no viviente que comprende la molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1.

17. Un microorganismo que comprende la molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1.

18. El microorganismo de la reivindicación 17, en donde dicho microorganismo es una célula de planta.

19. Un producto de consumo que comprende la molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1.

20. Un método para controlar malezas en un campo que comprende plantar plantas de algodón que comprenden el evento MON 88701 en un

campo y aplicar una dosis efectiva de dicamba o glufosinato o herbicidas de dicamba y glufosinato para controlar malezas en dicho campo sin dañar dichas plantas de algodón que comprenden el evento MON 88701.

21. El método de la reivindicación 20, en donde dicha dosis efectiva de herbicida de dicamba es un total de aproximadamente 0,0023 kg (0,005 libras) por acre a aproximadamente 7,25 kg (16 libras) por acre de herbicida de dicamba durante la temporada de crecimiento.

22. El método de la reivindicación 20, en donde dicha dosis efectiva de herbicida de dicamba es un total de aproximadamente 0,23 kg (0,5 libras) por acre a aproximadamente 0,90 kg (2 libras) por acre de herbicida de dicamba durante la temporada de crecimiento.

23. El método de la reivindicación 20, en donde dicha dosis efectiva de herbicida de glufosinato es un total de aproximadamente 0,023 (0,005 libras) por acre a aproximadamente 7,25 kg (16 libras) por acre de herbicida de glufosinato durante la temporada de crecimiento.

24. El método de la reivindicación 20, en donde dicha dosis efectiva de herbicida de glufosinato es un total de aproximadamente 0,03 (0,5 libras) por acre a aproximadamente 0,72 kg (1,59 libras) por acre de herbicida de glufosinato durante la temporada de crecimiento.

25. Un método para controlar malezas en un campo que comprende aplicar una dosis efectiva de dicamba o glufosinato o herbicida de dicamba y glufosinato para controlar malezas en un campo y luego plantar plantas de algodón que comprende el evento MON 88701 en dicho campo.

26. El método de la reivindicación 25, en donde dicha dosis efectiva de herbicida de dicamba es de aproximadamente 0,023 kg (0,005 libras) a aproximadamente 7,25 kg (16 libras) por acre y dichas plantas de algodón plantadas que comprenden el evento MON 88701 está dentro de los 14 días de dicha aplicación de dosis efectiva de herbicida de dicamba.

27. Un método para producir semillas de algodón o pelusa de algodón esencialmente libres de semillas de maleza, dicho método comprende:

a) plantar semillas que comprenden el evento de algodón MON 88701 en un campo;

b) aplicar una dosis efectiva de dicamba o glufosinato o herbicida de dicamba y glufosinato a dicho campo para eliminar las malezas en dicho campo sin dañar las plantas de algodón que comprenden el evento MON 88701; y

5 c) cosechar la semilla de algodón o pelusa de algodón de dicho campo.

28. Un método para producir una planta de algodón que tolera la aplicación de herbicida de dicamba y glufosinato que comprende:

a) cruzar sexualmente una planta de algodón transgénica que
10 comprende el evento MON 88701 que comprende una molécula de nucleótidos que tiene una secuencia nucleótida seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 1-8, y sus complementos, con una segunda planta de algodón;

b) recolectar la semilla producida por dicho cruzamiento;

15 c) cultivar dicha semilla para producir una pluralidad de plantas descendientes;

d) tratar dicha pluralidad de plantas descendientes con dicamba o glufosinato o dicamba y glufosinato; y

e) seleccionar una planta descendiente que sea tolerante al dicamba y
20 glufosinato.

29. Un método para producir una planta de algodón que tolera la aplicación del herbicida de dicamba y glufosinato que comprende

a) autofecundar una planta de algodón transgénica que comprende el evento MON 88701 que comprende una molécula de nucleótidos que tiene
25 una secuencia nucleótida seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 1-8, y sus complementos;

b) recolectar la semilla producida de dicha autofecundación;

c) cultivar dicha semilla para producir una pluralidad de plantas descendientes;

30 d) tratar dicha pluralidad de plantas descendientes con dicamba o glufosinato o dicamba y glufosinato; y

e) seleccionar una planta descendiente que sea tolerante al dicamba y glufosinato.

30. Un método para determinar la cigocidad de una planta de algodón o semilla que comprende el evento MON 88701 que comprende:

5 a) contactar una muestra que comprende el ADN de algodón con un juego de cebadores y un juego de sondas que

i) cuando se usan con una reacción de amplificación de ácido nucleico con el evento de ADN MON 88701, produce un primer amplicón que es diagnóstico para el evento MON 88701; y

10 ii) cuando se usan con una reacción de amplificación de ácido nucleico con el ADN genómico otro que el evento de ADN MON 88701, produce un segundo amplicón que es diagnóstico nativo para el ADN genómico otro que el evento MON 88701;

b) llevar a cabo una reacción de amplificación de ácido nucleico con dicha muestra, juego de cebadores, y juego de sonda;

c) detectar en dicha reacción de amplificación de ácido nucleico una primera señal fluorescente que es diagnóstica para el evento MON 88701 y una segunda señal fluorescente diferente de dicha primera señal fluorescente y diagnóstica para el ADN genómico de algodón nativo que corresponde al sitio de inserción del transgén del evento MON 88701; y

20 d) Analizar la presencia o ausencia de dicha primera señal fluorescente y dicha segunda señal fluorescente en dicha reacción de amplificación de ácido nucleico, en donde la presencia de ambas señales fluorescentes indica que dicha muestra es heterocigota para el evento MON 88701 y la presencia de solo dicha primera señal fluorescente indica que dicha muestra es homocigota para el evento MON 88701.

31. El método de la reivindicación 30, en donde el juego de cebadores comprende SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 14.

32. El método de la reivindicación 30, en donde el juego de sondas comprende SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 15.

33. Una región haplotipa de algodón que comprende el evento MON 88701 y mapeada en el cromosoma A08 en la posición del mapa de 19,3 cM

y bordeada por NG0207927 en la posición del mapa de 18,6 cM a la izquierda y por NG0207529 en la posición del mapa a la derecha.

RESUMEN

La invención proporciona el evento de algodón MON 88701, y plantas, células de plantas, semillas, partes de plantas, y productos de consumo que
5 comprenden el evento MON 88701. La invención también proporciona polinucleótidos específicos para el evento MON 88701 y plantas, células de plantas, semillas, partes de planta, y productos de consumo que comprenden polinucleótidos específicos para el evento MON 88701. La invención también proporciona métodos relacionados con el evento MON
10 88701.

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> Monsanto Technology LLc	
	Brinker, Ronald J	
5	Burns, Wen C	
	Feng, Paul C.C.	
	Kendig, John A	
	LeClere, Sherry	
	Lutke, Jennifer Lynn	
10	Malven, Marianne	
	<120> EVENTO DE ALGODÓN TRANSGÉNICO MON 88701 Y SUS MÉTODOS DE USO	
15	<130> MONS:302US	
	<140> Desconocido	
	<141> 2011-03-09	
20	<150> 61/469,118	
	<151> 2011-03-30	
	<160> 15	
25	<170> Versión PatentIn 3.5	
	<210> 1	
	<211> 20	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de ADN artificial que comprende la secuencia de algodón genómica y la secuencia transgénica	
35	<400> 1	
	taggacatat tctcttaagg	20
40	<210> 2	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Secuencia de ADN artificial que comprende la secuencia de algodón genómica y la secuencia transgénica	
	<400> 2	
50	acatgaagcc ttaattcaat	20
	<210> 3	
	<211> 60	
55	<212> ADN	

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de ADN artificial que comprende la secuencia de algodón
 5 genómica y la secuencia transgénica
 <400> 3
 aaccttattt atataaaaat taggacatat tctcttaagg tagccaaagc ccgggcttaa 60
 10
 <210> 4
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Secuencia de ADN artificial que comprende la secuencia de algodón
 genómica y la secuencia transgénica
 20 <400> 4
 gatccatgta gatttcccgg acatgaagcc ttaattcaat attggctcta gaacataact 60
 <210> 5
 25 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Secuencia de ADN artificial que comprende la secuencia de algodón
 genómica y la secuencia transgénica
 <400> 5
 35 gttacaagaa catccttgat aaccttattt atataaaaat taggacatat tctcttaagg 60
 tagccaaagc ccgggcttaa ttaaggcgcg ccggccaagt 100
 40 <210> 6
 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Secuencia de ADN artificial que comprende la secuencia de algodón
 genómica y la secuencia transgénica
 50 <400> 6
 tgaccatcat actcattgct gatccatgta gatttcccgg acatgaagcc ttaattcaat 60
 attggctcta gaacataact tgtttaacac taaatataag 100
 55
 <210> 7

<211> 1176
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Secuencia de ADN artificial que comprende la secuencia de algodón
 genómica y la secuencia transgénica

<400> 7

10 cattatataa aaagaaaaat tttaaataa aaaaaaatat attaaaacag tgaatcaaca 60
 atcatgtctc taaaatgaa aaaaattatc attaaaatt ttaattaat aaaagtaaaa 120
 tgaaattaaa acattttacc tgactttaac agtatagata attcaaaagt aaatatgatt 180
 15 tcttctgatt ttcaaaaca aatttagaga ttataaatgc cattcgtcga tcatttgac 240
 acgaaagatt taagaaaagc aaatgtaacc ttgacatga tgagcataat cacttcaaat 300
 20 agtatttttt ttattttcca acgtcaatat attgaaatat tttttatag aataaactat 360
 agcaattttt gccatgatgg tcaacttat accactatcc ttaaccaata tattttgtt 420
 tagacattag gagttaagtc tgatgtcgga tgtttgttc cttatttatt caggtgtttt 480
 25 ataattttac ttatgaaaga ggttggtttt tctcaatgca ttctaatat catatataca 540
 cattgattga gcaaaaaaaaa aaaaaactat cctcaaccaa tgtagaagtg agttggttgc 600
 30 atgatctttt attgaattt tcaatattga aaaaactaaa accacatgtc ttaatccatc 660
 gtaataatac tgctattatt tgaaaagttg atagcaaata ttacaataga aaatgtagat 720
 ctataagaag aaagtatagc tatgtgaaat ctcatataac taatggtatg attaagtgtg 780
 35 attatattca aagtgttgat aatctcacat attctttgac aaaagcttta gtagagaaa 840
 aaaatatgga tagtaataat gaggataaga ctaaagcctg aacaataata aaaatcaata 900
 40 ataaggatac ttacataat gattagagat cccaaaaatt agattcaaaa ggaaaaatga 960
 atacatattt aaaaaatctc tctttcggg ataatgaatg tatgtataac aataatagaa 1020
 gttgagtata actatactct taatgaggtc cataactagt ttgagtgaat tgcagagtta 1080
 45 caagaacatc ctgataacc ttatttatat aaaaattagg acatattctc ttaaggtagc 1140
 caaagcccgg gcttaattaa ggcgcgccgg ccaagt 1176

50 <210> 8
 <211> 1188
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>

<223> Secuencia de ADN artificial que comprende la secuencia de algodón genómica y la secuencia transgénica

<400> 8

```

5  tgaccatcat actcattgct gatccatgta gatttcccgg acatgaagcc ttaattcaat    60
   attggctcta gaacataact tgtttaacac taaatataag tttatgccat tgacatatgt    120
   ataatgcata actttctatc ttacttgaa aagagagatt tactttcttc aaaatgtttg    180
10  tgtattaatt tagaagattt aaaccacgag acttgaagat ttaagatat cgatagattc    240
   aagtacactt tcgcatatat tttatgttct taatgatttg acatgataaa actcgggtta    300
   tttagtttta tattataatt ttatgattgt aacacttaat tgataatgac atgatcaact    360
   attaatttga caaaatcaaa agaaatagaa accgactttt cattttatgt ttagaatgaa    420
   aaattcagtg tctaatttag atgagtcaaa tatttattca taattaggtc aggaatatac    480
20  ttaattactt gggtaaccaa aattggagtt tgattttcaa taattagatc aagttagtgt    540
   ttaattact tataagaaaa tttaataacc caaattacta atcaaatcta ttagaataaa    600
   attagatgaa gatagaaaaa ttagctaata tatttaatga aaatttaatt ctaggtattt    660
   actattgatt gattattctt ttgtagag ttatgtgacc tgaatcccgt ttgatctgat    720
   ctgaaaagtt cgacgtacaa ttcatgtgc aaataaataa aataaagagg caaaatagga    780
30  gatctgtata ggactatatt tcttcaatta aacattgatt ctaaaagggt tgtttaatcc    840
   ttaaaatgcg ttagtcgaa aacctcttgt attgtgattt tttaatatta gtgaatttct    900
   cctcttctgt ccgtgatatt tcccgataag ggttttcaa ataaaacttg tgtattctta    960
   ttttcttctc ttattgtttt acgatccttc ctattgccat tatcgaagta tagtataaca   1020
   cttttaaadc tttaaaaaat tatattatca attattttta taagttaaaa gaatataagt   1080
40  taaaataat aattttata ccatttatca cgaaatatat acttgcgggt acgatatttg   1140
   tccacaaacc ctaacctcg tgttgagttg tgaacttcag ctatataa               1188

```

45

<210> 9

<211> 4105

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> Secuencia de ADN artificial que comprende la secuencia transgénica

<400> 9

```

55  tctcttaagg tagccaaagc ccgggcttaa ttaaggcgcg ccggccaagt cggccgcggc    60

```

	cgcgtaaca agcttctgca gaattcgtca acgagatctt gagccaatca aagaggagtg	120
	atgtagacct aaagcaataa tggagccatg acgtaagggc ttacgccccat acgaaataat	180
5	taaaggctga tgtgacctgt cggctctca gaacctttac ttttatgtt tggcgtgtat	240
	tttaaattt ccacggcaat gacgatgtga cccaacgaga tcttgagcca atcaaagagg	300
	agtgatgtag acctaaagca ataatggagc catgacgtaa gggcttacgc ccatacga	360
10	taattaaagg ctgatgtgac ctgtcggctc ctacgaacct ttactttta tattggcgt	420
	gtattttta attccacgg caatgacgat gtgacctgtg catccgctt gcctataaat	480
15	aagtttagt ttgtattgat cgacacggc gagaagacac ggccattcta gttctcaaca	540
	caacatatac aaaacaaacg aatctcaagc aatcaagcat tctacttcta ttgcagcaat	600
	ttaaatacatt tcttttaaag caaaagcaat ttctgaaaa ttccacat ttacgaacga	660
20	tagccatggc gcaagttagc agaactctgca atggtgtgca gaacctatct ctatctcca	720
	atctctgaa atccagtcaa cgcaaactc cttatcggt ttctctgaag acgcagcagc	780
25	atccacgagc ttatccgatt tcgtcgtcgt ggggattgaa gaagagtggg atgacgttaa	840
	ttggctctga gcttcgtcct ctaaggctca tgtctctgt ttccacggcg tgcattgctca	900
	cttcgttag aaacgcttg tacgttgctg cacttctga ggagttgagc gagaagcctc	960
30	taggaagaac tatctcgat actccactag ctctctatcg tcaacctgac ggagttgtcg	1020
	ctgccctgct tgatattgt ccgcatcgct tcgctccgtt gagtgacggt attctagtca	1080
35	acggacatct ccagtgtcca taccacggc tggaaattga cggaggtggc cagtgtgtcc	1140
	acaacccgca cggcaacgga gcccgccctg ctctctgaa cgtgcgatca ttccctgtcg	1200
	tggaaagaga cgcattgatc tggatctggc ctggagatcc agcactcgca gatcccggcg	1260
40	ctatccctga cttgggtgt cgtgttgatc cagcttaccg tactgtcgga ggttacggc	1320
	acgtggactg caactacaag ctcttgtgg ataacctcat ggatcttga cagctcagt	1380
45	acgtgcaccg cgtaacgcc caaacagacg cttcgatag acttgagcgt gaggtgatcg	1440
	ttggcgacgg cgagatccag gcgctcatga agatccctgg tggcacaccc tcagttctca	1500
50	tggctaagtt ctgctggt gctaacacac cagttgacgc ctggaacgac atccggtgga	1560
	ataaggtgtc ggctatgctg aacttcatcg cggctcgccc ggaagggacg ccgaaggagc	1620
55	agtcaatcca ctccgagga acccatatcc ttactctga gaccgaggca agctgccatt	1680

actttctcgg tagttcccg aacttcggta tagacgatcc agagatggac ggtgttctca 1740

ggagctggca agtcaagcc ctggtgaagg aggacaaagt ggtcgtgaa gctatcgaaa
1800

5 ggcggagggc ttacgtcgaa gcgaacggga tcagacccgc catgttgtcc tgcgacgagg
1860

cagccgtcag ggtatccagg gagattgaga agtcgaaca actagaagcg gcgtgaggat
10 1920

ccactagtaa cggccgccag tgtgctggaa ttcgcccttg aattcaggcc tgatcacctg 1980

tcgtacagta ttctacatt tgatgtgtga ttgtgaaga acatcaaaca aaacaagcac 2040

15 tggctttaat atgatgataa gtattatggt aattaattaa ttggcaaaaa caacaatgaa 2100

gctaaaattt tatttattga gccttgcggt taatttcttg tgatgatctt ttttttatt 2160

20 ttctaattat atatagttc ctttgcttg aaatgctaaa ggttgagag agttatgctc 2220

tttttctt cctcttctt tttaactt atcatacaaa tttgaataa aaatgtgagt 2280

acattgagct ctctgcagg cgtattgaga ctttcaaca aagggtata tccggaacc 2340

25 tcctcggatt ccattgccca gctatctgtc actttattgt gaagatagt gaaaaggaag 2400

gtggctccta caaatgcat cattgcgata aaggaaaggc catcgttgaa gatgcctctg 2460

30 ccgacagtgg tcccaaagat ggacccccac ccacgaggag catcgttgaa aaagaagacg
2520

ttccaaccac gtcttcaaag caagtggatt gatgtgatgg tccgattgag acttttcaac 2580

35 aaagggtaat atccggaac ctctcggat tccattgccc agctatctgt cactttattg 2640

tgaagatagt ggaaaaggaa ggtggctcct acaaatgcca tcattgcat aaaggaaagg
2700

40 ccacgttga agatgcctct gccgacagt gtcccaaaga tggaccccc cccacgagga
2760

gcatcgtgga aaaagaagac gtccaacca cgtcttcaaa gcaagtggat tgatgtgata 2820

45 tctccactga cgtaaggat gacgcacaat cccactatcc ttcgaagac ccttctcta 2880

tataaggaag ttcatatcat ttggagaggc ctcaaaaaa ttgctacat tgttcacaa 2940

actcaaata ttattcatt attgtcagc ttcaaactc ttgtttctt gttgttgat 3000

50 tgagaatagg atccatgagc ccagaacgac gcccggccga catccgccgt gccaccgagg
3060

cggacatgcc ggcggtctgc accatcgtca accactacat cgagacaagc acggtcaact
55 3120

tccgtaccga gccgcaggaa ccgcaggagt ggacggacga cctcgtccgt ctgcgggagc
3180

5 gctatccctg gctcgtcgcc gaggtggacg gcgaggtcgc cggcatcgcc tacgcggggc
3240

cctggaaggc acgcaacgcc tacgactgga cggccgagtc gaccgtgtac gtctcccccc
3300

10 gccaccagcg gacgggactg ggctccacgc tctacacca cctgctgaag tccctggagg
3360

cacagggctt caagagcgtg gtcgctgtca tcgggctgcc caacgacccg agcgtgcgca
3420

15 tgcacgaggc gctcggatat gccccccgcg gcatgctgcg ggcgggccggc ttcaagcacg
3480

ggaactggca tgacgtgggt ttctggcagc tggacttcag cctgccggta ccgccccgtc 3540

20 cggctctgcc cgtcaccgag atctgagaat tgatcgttca aacatttggc aataaagttt 3600

cttaagattg aatcctgttg ccggtcttgc gatgattatc atataatttc tgtgaatta 3660

25 cgtaagcat gtaataatta acatgtaatg catgacgtta ttatgagat gggttttat 3720

gattagagtc ccgcaattat acatttaata cgcatagaa aacaaaatat agcgcgcaaa 3780

ctaggataaa ttatcgcgcg cgggtgtcatc tatgttacta gatcctcgag tggaggcctc 3840

30 atcctcatct aagcccccat ttggacgtga atgtagacac gtcgaaataa agatttccga 3900

attagaataa ttgtttatt gctttcgct ataaatacga cggatcgtaa ttgtcgttt 3960

35 tatcaaaatg tactttcatt ttataataac gctgcggaca tctacatttt tgaattgaaa 4020

aaaaattggt aattactctt tcttttctc catattgacc atcactactca ttgctgatcc 4080

atgtagattt cccggacatg aagcc 4105

40

<210> 10
<211> 6369
<212> ADN

45 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de ADN artificial que comprende la secuencia de algodón
genómica y la secuencia transgénica

50

<400> 10
cattatataa aaagaaaaat tttaaataa aaaaaaatat attaaaacag tgaatcaaca 60

atcatgtctc taaaatgaa aaaaattatc attaaaatt ttaattaat aaaagtaaaa 120

55 tgaaattaaa acattttacc tgactttaac agtatagata attcaaaagt aaatatgatt 180

tcttctgatt ttcaaaaca aatttagaga ttataaatgc cattcgtcga tcattttgac 240
 acgaaagatt taagaaaagc aaatgtaacc ttgacatga tgagcataat cacttcaa 300
 5 agtattttt ttatttcca acgtcaatat attgaaatat tttttatag aataaactat 360
 agcaatttt gccatgatgg ttcaacttat accactatcc ttaaccaata tattttgtt 420
 10 tagacattag gagttaagtc tgatgtcgga tgtttgttc ctatttatt caggtgttt 480
 ataattttac ttatgaaaga ggttggttt tctcaatgca ttctaatat catatataca 540
 cattgattga gcaaaaaaaaa aaaaaactat cctcaaccaa ttagaagtg agttggttc 600
 15 atgatcttt attgaattt tcaatattga aaaaaactaaa accacatgtc ttaatccatc 660
 gtaataatac tgctattatt tgaaaagttg atagcaaata ttacaataga aaatgtagat 720
 20 ctataagaag aaagtatagc tatgtgaaat ctcatataac taatggtatg attaagtgtg 780
 attatattca aagtgttgat aatctcacat attcttgac aaaagcttta gtagagaaa 840
 aaaatatgga tagtaataat gaggataaga ctaaagcctg aacaataata aaaatcaata 900
 25 ataaggatac ttacataat gattagagat cccaaaaatt agattcaaaa ggaaaaatga 960
 atacatattt aaaaaatctc tctttcggg ataataatg tatgtataac aataatagaa 1020
 30 gttgagtata actatactct taatgaggtc cataactagt ttgagtgaat tgcagagtta 1080
 caagaacatc ctgataacc ttatttatat aaaaattagg acatattctc ttaaggtagc 1140
 caaagcccgg gcttaattaa ggcgcgccgg ccaagtcggc cgcgcccgcg ttaacaagct
 35 1200
 tctgcagaat tcgtcaacga gatcttgagc caatcaaaga ggagtgatgt agacctaaag 1260
 caataatgga gccatgacgt aagggttac gccatacga aataattaa ggctgatgtg 1320
 40 acctgtcggg ctctcagaac cttactttt tatgtttggc gtgtatttt aaattccac 1380
 ggcaatgacg atgtgaccca acgagatctt gagccaatca aagaggagtg atgtagacct
 45 1440
 aaagcaataa tggagccatg acgtaagggc ttacgcccac acgaaataat taaaggctga
 1500
 tgtgacctgt cggctctca gaacctttac ttttatatt tggcgtgtat ttttaaattt 1560
 50 ccacggcaat gacgatgtga cctgtgcatc cgctttgcct ataaataagt ttagttgt 1620
 attgatcgac acggtcgaga agacacggcc atttagttc tcaacacaac atatacaaaa 1680
 55 caaacgaatc tcaagcaatc aagcattcta ctctattgc agcaatttaa atcatttctt 1740

ttaaagcaaa agcaatttc tgaaaatttt caccatttac gaacgatagc catggcgcaa 1800
 gttagcagaa tctgcaatgg tgtgcagaac ccattcttta tctccaatct ctcgaaatcc 1860
 5 agtcaacgca aatctccctt atcggtttct ctgaagacgc agcagcatcc acgagcttat 1920
 ccgatttcgt cgtcgtggg attgaagaag agtgggatga cgtaattgg ctctgagctt 1980
 cgtcctctta aggtcatgtc ttctgtttcc acggcgtgca tgctcacttt cgtagaaaac 2040
 10 gcttggtacg ttgctgcact tctgaggag ttgagcgaga agcctctagg aagaactatc 2100
 ctcgatactc cactagctct ctatcgtcaa cctgacggag ttgtcgtgc cctgcttgat 2160
 15 attgtccgc atcgcttcgc tccgttgagt gacggtattc tagtcaacgg acatctccag 2220
 tgtccatata acggtctgga attgacgga ggtggccagt gtgtccacaa cccgcacggc 2280
 aacggagccc gccctgcttc tctgaacgtg cgatcattcc ctgctgtgga aagagacgca 2340
 20 ttgatctgga tctggcctgg agatccagca ctgcagatc ccggtgctat ccctgacttt 2400
 ggggtgctg ttgatccagc ttaccgtact gtcggagggt acggtcacgt ggactgcaac 2460
 25 tacaagctcc ttgtggataa cctcatggat ctggacacg ctacgtacgt gcaccgcgct 2520
 aacgccccaa cagacgcctt cgatagactt gagcgtgagg tgatcgttgg cgacggcgag
 2580
 30 atccaggcgc tcatgaagat ccctggtggc acaccctcag ttctcatggc taagtcttg 2640
 cgtggtgcta acacaccagt tgacgcctgg aacgacatcc ggtggaataa ggtgtcggct 2700
 atgtgaact tcatcgcggt cgcgccgga gggacgccga aggagcagtc aatccactcc
 35 2760
 cgaggaaccc atatccttac tctgagacc gaggcaagct gccattactt cttcggtagt 2820
 tcccgaact tcggtataga cgatccagag atggacggtg ttctcaggag ctggcaagct 2880
 40 caagccctgg tgaaggagga caaagtggc gttgaagcta tcgaaaggcg gagggcttac
 2940
 gtcgaagcga acgggatcag acccgccatg ttgtctgcg acgaggcagc cgtcagggta
 45 3000
 tccagggaga ttgagaagct cgaacaacta gaagcggcgt gaggatccac tagtaacggc
 3060
 50 cgccagtgtg ctggaattcg ccctgaatt caggcctgat cacctgtcgt acagtatttc 3120
 tacatttgat gtgtgatttg tgaagaacat caaacaaaac aagcactggc ttaatatga 3180
 tgataagtat tatggaatt aattaattg caaaaacaac aatgaagcta aaattttatt 3240
 55 tattgagcct tgcggttaat ttcttgat gatcttttt ttattttct aattatatat 3300

agtttccttt gctttgaaat gctaaagggt tgagagaggt atgctctttt ttcttcctc 3360
 ttctttttt aactttatca tacaaatttt gaataaaaat gtgagtacat tgagctctct 3420
 5 gcagggtccga ttgagacttt tcaacaaagg gtaatatccg gaaacctcct cggattccat 3480
 tgcccagcta tctgtcactt tattgtgaag atagtggaaa aggaagggtg ctctacaaa 3540
 10 tgccatcatt gcgataaagg aaaggccatc gttgaagatg cctctgccga cagtgggtccc 3600
 aaagatggac cccacccac gaggagcatc gtggaaaaag aagacgttc aaccacgtct
 3660
 15 tcaaagcaag tggattgatg tgatgggtccg attgagactt ttcaacaaag ggtaatatcc 3720
 ggaaacctcc tcggattcca ttgccagct atctgtcact ttattgtgaa gatagtggaa 3780
 aaggaagggtg gctcctacaa atgcatcat tcgataaag gaaaggccat cgttgaagat 3840
 20 gcctctgccg acagtgggtc caaagatgga cccccacca cgaggagcat cgtggaaaaa
 3900
 gaagacgttc caaccacgtc ttcaaagcaa gtggattgat gtgatctc cactgacgta 3960
 25 agggatgacg cacaatcca ctatcctcg caagaccctt cctctatata aggaagtca 4020
 ttctatttg agaggcctca gaaaaattg ctacattgtt tcacaaactt caaatattat 4080
 30 tcatttattt gtcagcttc aaactcttg ttcttggtt gttgattgag aataggatcc 4140
 atgagcccag aacgacgccc ggccgacatc cgccgtgcc aagaggcgga catgccggcg
 4200
 35 gtctgcacca tcgtcaacca ctacatcgag acaagcacgg tcaacttccg taccgagccg 4260
 caggaaccgc aggagtggac ggacgacctc gtccgtctgc gggagcgcta tcctggctc
 4320
 40 gtcgccgagg tggacggcga ggtcgccgc atgcctacg cgggccctg gaaggcacgc
 4380
 aacgcctacg actggacggc cgagtcgacc gtgtacgtt cccccgcca ccagcggacg
 4440
 45 ggactgggct ccacgtcta caccacctg ctgaagtccc tggaggcaca gggcttcaag 4500
 agcgtggctg ctgtcatcg gctgccaac gaccgagcg tgcgcatgca cgaggcgctc
 4560
 50 ggatatgcc cccgcggcat gctgcggcg gccggctca agcacgggaa ctggcatgac
 4620
 gtgggtttct ggcagctgga cttcagcctg ccggtaccgc cccgtccgt cctgccgctc 4680
 55 accgagatct gagaattgat cgttcaaaca ttggcaata aagtttcta agattgaatc 4740

ctgttgccgg tctgcatg attatcatat aatttctgt gaattacgtt aagcatgtaa 4800
 taattaacat gtaatgcatg acgttattha tgagatgggt tttatgatt agagtcccg 4860
 5 aattatacat ttaatacgcg atagaaaaca aaatatagcg cgcaaactag gataaattat 4920
 cgcgcgcggt gtcattatg ttactagatc ctcgagtggg ggcctcatcc tcatctaagc 4980
 10 cccatttgg acgtgaatgt agacacgtcg aaataaagat ttccgaatta gaataatttg 5040
 tttattgctt tcgcctataa atacgacgga tcgtaatttg tcgtttatc aaaatgtact 5100
 ttcatthtat aataacgctg cggacatcta cattttgaa ttgaaaaaaa attggaatt 5160
 15 actctttctt tttctcata ttgacatca tactcattgc tgatccatgt agatttccc 5220
 gacatgaagc ctaattcaa tattggctct agaacataac ttgttaaca ctaaatataa 5280
 20 gtttatgcca ttgacatag tataatgcat aactttctat cttcattga aaagagagat 5340
 ttactttctt caaaatgttt gtgtattaat ttagaagatt taaaccacga gactgaaga 5400
 ttttaagata tcgatagatt caagtacact ttcgcatata tttatgttc ttaatgatt 5460
 25 gacatgataa aactcgggtt atttagttt atattataat ttatgattg taacacttaa 5520
 ttgataatga catgatcaac tattaatttg acaaaatcaa aagaaataga aaccgactt 5580
 30 tcattttatg ttagaatga aaaattcagt gtctaattta gatgagtcaa atattattc 5640
 ataattaggt caggaatata ctaattact tgggtaacca aaattggagt ttgatttca 5700
 ataattagat caagttagtg ttttaattac ttataagaaa atttaatac ccaaattact 5760
 35 aatcaaatct attagaataa aattagatga agatagaaaa attagcta atatttaattg 5820
 aaaattta atctaggtatt tactattgat tgattattct tttgttaga gttatgtgac 5880
 40 ctgaatcccg ttgatctga tctgaaaagt tcgacgtaca attcattgt caaataaata 5940
 aaataaagag gcaaaatagg agatctgtat aggactatat ttctcaatt aaacattgat 6000
 tctaaaaggg ttgttaatc cttaaatgc gtgtagtcga aaacctctg tattgtgatt 6060
 45 ttttaatt agtgaattc tcctctctg tccgtgatat ttccgataa gggttttca 6120
 aataaaact gtgtattctt attttctt cttattgtt tacgatcct cctattgcca 6180
 50 ttatcgaagt atagtataac acttttaaat cttttaaaaa ttatattatc aattatttt 6240
 ataagttaa agaataaag ttacaaataa taattttat accatttat acgaaatata 6300
 tacttgcggt tacgatatt gtccacaaac ccttaacctc gtgttgagt gtgaactca 6360
 55 gctatataa 6369

	<210> 11		
	<211> 24		
5	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador PCR de oligonucleótidos químicamente sintetizados		
10	<400> 11		
	gaccatcata ctcatgctg atcc	24	
15	<210> 12		
	<211> 31		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
20	<220>		
	<223> Cebador PCR de oligonucleótidos químicamente sintetizados		
	<400> 12		
	gtgttaaaca agttatgttc tagagccaat a	31	
25	<210> 13		
	<211> 19		
	<212> ADN		
30	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sonda PCR de oligonucleótidos químicamente sintetizados		
35	<400> 13		
	tagatttccc ggacatgaa	19	
40	<210> 14		
	<211> 29		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
45	<223> Cebador PCR de oligonucleótidos químicamente sintetizados		
	<400> 14		
	gaaatctatg tgttgacac aatacacag	29	
50	<210> 15		
	<211> 16		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
55	<220>		
	<223> Sonda PCR de oligonucleótidos químicamente sintetizados		

<400> 15
ttccccaag aagcct

16

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia nucleótida seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 1-10, y
5 complementos de los mismos.

2. La molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1 que se forma por la inserción de una molécula de ácido nucleico heteróloga en el ADN genómico de una planta de algodón o célula.

3. La molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1, en donde
10 dicha molécula de ADN es derivada de una planta de algodón transgénica que comprende el evento MON 88701, una muestra representativa de una semilla que comprende el evento de algodón MON 88701 que ha sido depositada en la ATCC No. de Acceso PTA-11754.

4. La molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1, en donde
15 dicha molécula de ADN está en una planta de algodón, célula de planta, semilla, parte de planta, o producto de consumo.

5. La molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1, en donde dicha molécula de ADN es un amplicón diagnóstico para la presencia de ADN derivado del evento MON 88701.

20 6. Una sonda de ADN que comprende una secuencia nucleótida de longitud suficiente de nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 10, o un complemento del mismo, para funcionar como una sonda de ADN que hibrida bajo condiciones de hibridación rigurosas con una molécula de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID
25 NO: 1-10 y no hibrida bajo condiciones rigurosas de hibridación con una molécula de ADN que no comprende una secuencia nucleótida seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 1-10.

7. Un par de moléculas de ADN que comprende una primera molécula de ADN y una segunda molécula de ADN diferente de la primera molécula de ADN,
30 en donde dicha primera y segunda moléculas de ADN comprenden cada una, una secuencia nucleótida de longitud suficiente de nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 10, o un complemento del mismo, para funcionar como cebadores de ADN

cuando se utilizan juntos en una reacción de amplificación con ADN derivado del evento MON 88701 para producir un amplicón diagnóstico para el evento de algodón de ADN MON 88701 en una muestra.

8. Un método para detectar la presencia de una molécula de ADN derivada de una planta de algodón que comprende el evento MON 88701 en una muestra, dicho método comprende:

- a) contactar dicha muestra con la sonda de ADN de la reivindicación 6;
- b) someter dicha muestra y dicha sonda de ADN a condiciones de hibridación rigurosas; y
- 10 c) detectar la hibridación de dicha sonda de ADN a una molécula de ADN en dicha muestra, en donde la hibridación de dicha sonda de ADN a dicha molécula de ADN indica la presencia de una molécula de ADN derivada de un evento de algodón MON 88701 en dicha muestra.

9. Un método para detectar la presencia de una molécula de ADN derivada de una planta de algodón que comprende el evento MON 88701 en una muestra, dicho método comprende:

- a) contactar dicha muestra con el par de moléculas de ADN de la reivindicación 7;
- b) llevar a cabo una reacción de amplificación suficiente para producir un amplicón de ADN que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 1-10, y complementos de los mismos; y
- 20 c) detectar la presencia de dicho amplicón de ADN en dicha reacción, en donde la presencia de dicho amplicón de ADN en dicha reacción indica la presencia de una molécula de ADN derivada de una planta de algodón que comprende el evento MON 88701 en dicha muestra.

10. Un kit de detección de ADN que comprende al menos una molécula de ADN que comprende una secuencia nucleótida de longitud suficiente de nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 10, y sus complementos, para funcionar como una sonda o cebador de ADN específico para detectar la presencia de ADN derivado de una planta de algodón que comprende el evento MON 88701, en donde la detección de dicho ADN es diagnóstica para la presencia del evento de ADN MON 88701 en una muestra.

11. Una planta de algodón recombinante, semilla, célula, o parte de planta de la misma que comprende la molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1.

12. La planta de algodón recombinante, semilla, célula, o parte de planta de la misma de la reivindicación 11, en donde dicha planta, semilla, o parte de planta de la misma es tolerante al tratamiento con herbicidas de dicamba y glufosinato.

13. La planta de algodón recombinante, semilla, célula, o parte de planta de la misma de la reivindicación 11, el genoma del cual produce un amplicón que comprende una molécula de ADN seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 1-10, y sus complementos, cuando se ensayan en un método de amplificación de ADN.

14. Una planta de algodón, semilla, célula o parte de la misma que comprende el evento MON 88701, una muestra representativa de la semilla que comprende el evento MON 88701 que ha sido depositado bajo la ATCC No de acceso PTA-11754.

15. La planta de algodón, semilla, célula o parte de la misma de la reivindicación 14, en donde dicha planta de algodón o semilla es un híbrido que tiene al menos un progenitor que comprende el evento de algodón MON 88701.

16. Un material de planta no viviente que comprende la molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1.

17. Un microorganismo que comprende la molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1.

18. El microorganismo de la reivindicación 17, en donde dicho microorganismo es una célula de planta.

19. Un producto de consumo que comprende la molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1.

20. Un método para controlar malezas en un campo que comprende plantar plantas de algodón que comprenden el evento MON 88701 en un campo y aplicar una dosis efectiva de dicamba o glufosinato o herbicidas de dicamba y glufosinato para controlar malezas en dicho campo sin dañar dichas plantas de algodón que comprenden el evento MON 88701.

21. El método de la reivindicación 20, en donde dicha dosis efectiva de herbicida de dicamba es un total de aproximadamente 0,0023 kg (0,005 libras) por acre a aproximadamente 7,25 kg (16 libras) por acre de herbicida de dicamba durante la temporada de crecimiento.

5 22. El método de la reivindicación 20, en donde dicha dosis efectiva de herbicida de dicamba es un total de aproximadamente 0,23 kg (0,5 libras) por acre a aproximadamente 0,90 kg (2 libras) por acre de herbicida de dicamba durante la temporada de crecimiento.

10 23. El método de la reivindicación 20, en donde dicha dosis efectiva de herbicida de glufosinato es un total de aproximadamente 0,023 (0,005 libras) por acre a aproximadamente 7,25 kg (16 libras) por acre de herbicida de glufosinato durante la temporada de crecimiento.

15 24. El método de la reivindicación 20, en donde dicha dosis efectiva de herbicida de glufosinato es un total de aproximadamente 0,03 (0,5 libras) por acre a aproximadamente 0,72 kg (1,59 libras) por acre de herbicida de glufosinato durante la temporada de crecimiento.

20 25. Un método para controlar malezas en un campo que comprende aplicar una dosis efectiva de dicamba o glufosinato o herbicida de dicamba y glufosinato para controlar malezas en un campo y luego plantar plantas de algodón que comprende el evento MON 88701 en dicho campo.

25 26. El método de la reivindicación 25, en donde dicha dosis efectiva de herbicida de dicamba es de aproximadamente 0,023 kg (0,005 libras) a aproximadamente 7,25 kg (16 libras) por acre y dichas plantas de algodón plantadas que comprenden el evento MON 88701 está dentro de los 14 días de dicha aplicación de dosis efectiva de herbicida de dicamba.

27. Un método para producir semillas de algodón o pelusa de algodón esencialmente libres de semillas de maleza, dicho método comprende:

a) plantar semillas que comprenden el evento de algodón MON 88701 en un campo;

30 b) aplicar una dosis efectiva de dicamba o glufosinato o herbicida de dicamba y glufosinato a dicho campo para eliminar las malezas en dicho campo sin dañar las plantas de algodón que comprenden el evento MON 88701; y

c) cosechar la semilla de algodón o pelusa de algodón de dicho campo.

28. Un método para producir una planta de algodón que tolera la aplicación de herbicida de dicamba y glufosinato que comprende:

a) cruzar sexualmente una planta de algodón transgénica que comprende el
5 evento MON 88701 que comprende una molécula de nucleótidos que tiene una
secuencia nucleótida seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 1-8, y
sus complementos, con una segunda planta de algodón;

b) recolectar la semilla producida por dicho cruzamiento;

c) cultivar dicha semilla para producir una pluralidad de plantas
10 descendientes;

d) tratar dicha pluralidad de plantas descendientes con dicamba o
glufosinato o dicamba y glufosinato; y

e) seleccionar una planta descendiente que sea tolerante al dicamba y
glufosinato.

15 29. Un método para producir una planta de algodón que tolera la aplicación
del herbicida de dicamba y glufosinato que comprende

a) autofecundar una planta de algodón transgénica que comprende el
evento MON 88701 que comprende una molécula de nucleótidos que tiene una
secuencia nucleótida seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 1-8, y
20 sus complementos;

b) recolectar la semilla producida de dicha autofecundación;

c) cultivar dicha semilla para producir una pluralidad de plantas
descendientes;

d) tratar dicha pluralidad de plantas descendientes con dicamba o
25 glufosinato o dicamba y glufosinato; y

e) seleccionar una planta descendiente que sea tolerante al dicamba y
glufosinato.

30. Un método para determinar la cigocidad de una planta de algodón o
semilla que comprende el evento MON 88701 que comprende:

30 a) contactar una muestra que comprende el ADN de algodón con un juego
de cebadores y un juego de sondas que

i) cuando se usan con una reacción de amplificación de ácido nucleico con el evento de ADN MON 88701, produce un primer amplicón que es diagnóstico para el evento MON 88701; y

ii) cuando se usan con una reacción de amplificación de ácido nucleico con el ADN genómico otro que el evento de ADN MON 88701, produce un segundo amplicón que es diagnóstico nativo para el ADN genómico otro que el evento MON 88701;

b) llevar a cabo una reacción de amplificación de ácido nucleico con dicha muestra, juego de cebadores, y juego de sonda;

c) detectar en dicha reacción de amplificación de ácido nucleico una primera señal fluorescente que es diagnóstica para el evento MON 88701 y una segunda señal fluorescente diferente de dicha primera señal fluorescente y diagnóstica para el ADN genómico de algodón nativo que corresponde al sitio de inserción del transgén del evento MON 88701; y

d) Analizar la presencia o ausencia de dicha primera señal fluorescente y dicha segunda señal fluorescente en dicha reacción de amplificación de ácido nucleico, en donde la presencia de ambas señales fluorescentes indica que dicha muestra es heterocigota para el evento MON 88701 y la presencia de solo dicha primera señal fluorescente indica que dicha muestra es homocigota para el evento MON 88701.

31. El método de la reivindicación 30, en donde el juego de cebadores comprende SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 14.

32. El método de la reivindicación 30, en donde el juego de sondas comprende SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 15.

33. Una región haplotipa de algodón que comprende el evento MON 88701 y mapeada en el cromosoma A08 en la posición del mapa de 19,3 cM y bordeada por NG0207927 en la posición del mapa de 18,6 cM a la izquierda y por NG0207529 en la posición del mapa a la derecha.



(51) International Patent Classification:
C12N 15/82 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2012/028949

(22) International Filing Date:

13 March 2012 (13.03.2012)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

61/469,118 30 March 2011 (30.03.2011) US

(71) Applicant (for all designated States except US):
MONSANTO TECHNOLOGY LLC [US/US]; 800
North Lindbergh Blvd., St. Louis, MO 63167 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **BRINKER, Ronald, J.** [US/US]; 800 North Lindbergh Blvd., St. Louis, MO 63167 (US). **BURNS, Wen, C.** [US/US]; 800 North Lindbergh Blvd., St. Louis, MO 63167 (US). **FENG, Paul, C.C.** [US/US]; 800 North Lindbergh Blvd., St. Louis, MO 63167 (US). **KENDIG, John, A.** [US/US]; 800 North Lindbergh Blvd., St. Louis, MO 63167 (US). **LECLERE, Sherry** [US/US]; 800 North Lindbergh Blvd., St. Louis, MO 63167 (US). **LUTKE, Jennifer, Lynn** [US/US]; 800 North Lindbergh Blvd., St. Louis, MO 63167 (US). **MALVEN, Marianne** [US/US]; 800 North Lindbergh Blvd., St. Louis, MO 63167 (US).

(74) Agent: **HANSON, Robert, E.**; SNR Denton US LLP,
7800 Willis Tower, 233 South Wacker Dr., Chicago, IL
60606 (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, QA, RO, RS, RU, RW, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, 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, RS, 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))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(54) Title: COTTON TRANSGENIC EVENT MON 88701 AND METHODS OF USE THEREOF

(57) Abstract: The invention provides cotton event MON 88701, and plants, plant cells, seeds, plant parts, and commodity products comprising event MON 88701. The invention also provides polynucleotides specific for event MON 88701 and plants, plant cells, seeds, plant parts, and commodity products comprising polynucleotides specific for event MON 88701. The invention also provides methods related to event MON 88701.



COTTON TRANSGENIC EVENT MON 88701 AND METHODS OF USE THEREOF

CROSS REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

This application claims the benefit of United States Provisional Application
5 No. 61/469,118, filed on March 30, 2011, herein incorporated by reference in its
entirety.

INCORPORATION OF SEQUENCE LISTING

The sequence listing contained in the file named "MONS302WO.txt", which
is 21 kilobytes (size as measured in Microsoft Windows®) and was created on
10 March 9, 2012, is filed herewith by electronic submission and is incorporated by
reference herein.

FIELD OF THE INVENTION

The invention relates to transgenic *Gossypium hirsutum* event MON 88701.
The event exhibits tolerance to dicamba and glufosinate herbicides. The invention
15 also relates to plants, plant parts, plant seeds, plant cells, agricultural products, and
methods related to event MON 88701 and provides nucleotide molecules that are
unique to the event and were created in connection with the insertion of transgenic
DNA into the genome of a *Gossypium hirsutum* plant.

BACKGROUND OF THE INVENTION

20 Cotton (*Gossypium hirsutum*) is an important crop in many areas of the world,
and the methods of biotechnology have been applied to this crop in order to produce
cotton with desirable traits. One such desirable trait is herbicide tolerance. The
expression of an herbicide tolerance transgene in a plant can confer the desirable trait
of herbicide tolerance on the plant, but expression of the transgene may be influenced
25 by the chromosomal location and the genomic result of the transgene insertion. For
example, it has been observed in plants that there often is variation in the level and
pattern of transgene expression among individual events that differ in the
chromosomal insertion site of the transgene but are otherwise identical. There may
also be undesirable and/or desirable phenotypic or agronomic differences between
30 events. Because of this, it is often necessary to produce and analyze a large number

of individual plant transformation events in order to select an event having both the desirable trait and the optimal phenotypic and agricultural characteristics necessary to make it suitable for commercial purposes. Such selection often requires greenhouse and field trials with many events over multiple years, in multiple locations, and under
5 a variety of conditions so that a significant amount of agronomic, phenotypic, and molecular data may be collected. The resulting data and observations must then be analyzed by teams of scientists and agronomists with the goal of selecting a commercially suitable event. Such an event, once selected, may then be used for introgressing the desirable trait into other genetic backgrounds using plant breeding
10 methods, and thus producing a number of different crop varieties that contain the desirable trait and are suitably adapted to specific local growing conditions.

SUMMARY OF THE INVENTION

The invention provides transgenic cotton plants comprising event MON 88701, which exhibit commercially acceptable tolerance to applications of dicamba and glufosinate herbicides, having a representative seed sample deposited
15 with the American Type Culture Collection (ATCC®) under Patent Deposit Designation PTA-11754. The invention also provides novel DNA molecules related to cotton event MON 88701 and methods of using these molecules. The invention also provides seeds, progeny, plant parts, cells, and commodity products of cotton
20 plants comprising event MON 88701. The invention also provides methods of using cotton event MON 88701 and methods of producing cotton tolerant to both dicamba and glufosinate herbicides.

The invention provides recombinant DNA molecules related to cotton event MON 88701. These recombinant DNA molecules may comprise nucleotide
25 molecules having a nucleotide sequence representing a region of the genomic DNA flanking the transgene insertion, and/or a region of the transgene insertion, and/or a contiguous sequence of any of these regions such as a region of the junction between the transgene insertion and flanking genomic DNA of cotton event MON 88701. The invention also provides DNA molecules useful as primers and probes diagnostic for
30 cotton event MON 88701 and amplicons diagnostic for the presence of cotton event MON 88701. Cotton plants, plant cells, plant parts, commodity products, progeny, and seeds comprising these molecules are also disclosed.

The invention provides methods, compositions, and kits useful for detecting the presence and/or absence of DNA derived from cotton event MON 88701 and thus the presence and/or absence of the event. The invention provides a method for detection of MON 88701 by contacting a sample comprising DNA with a primer set
5 that when used in a nucleic acid amplification reaction with genomic DNA from a cotton plant or seed comprising event MON 88701 produces an amplified DNA diagnostic for cotton event MON 88701, performing a nucleic acid amplification reaction thereby producing the amplified DNA, and detecting the presence and/or absence of the amplified DNA. The invention also provides a method for detection of
10 MON 88701 by contacting a sample comprising DNA with a probe that when used in a hybridization reaction with DNA from cotton event MON 88701 hybridizes to a DNA molecule specific for cotton event MON 88701, performing a hybridization reaction, and detecting the hybridization of the probe to the DNA molecule. Kits comprising the methods and compositions of the invention useful for detecting the
15 presence of DNA derived from cotton event MON 88701 are also provided.

The invention provides a cotton plant, seed, plant cell, progeny plant, plant part, or commodity product derived from a plant, plant cell, or seed comprising cotton event MON 88701. The invention also provides a cotton plant, seed, plant cell, progeny plant, plant part, or commodity product comprising a recombinant DNA
20 molecule having a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 1-10, and complements and fragments thereof. The invention also provides a cotton plant, seed, plant cell, progeny plant, plant part, or commodity product derived from the plant or seed comprising cotton event MON 88701 and comprising a recombinant DNA molecule that produces an amplified DNA molecule comprising a
25 sequence selected from SEQ ID NO: 1-10 in a DNA amplification method.

The invention provides a method for controlling weeds in a field by planting cotton plants comprising event MON 88701 and then applying an effective dose of dicamba, glufosinate, or both dicamba and glufosinate herbicides capable of controlling the weeds without injuring the cotton event MON 88701 containing
30 plants. The invention also provides a method for controlling weeds in a field by applying an effective dose of at least dicamba, glufosinate, or dicamba and glufosinate herbicides to control weeds in a field and then planting cotton plants comprising event MON 88701 in the field. The invention also provides a method for producing cotton seed or lint essentially free of weed seeds by planting seeds of a dicamba and

glufosinate tolerant cotton plants comprising MON 88701 in a field, applying to the field a post-emergence effective dose of at least dicamba, glufosinate, or dicamba and glufosinate herbicides sufficient to kill the weed species, and harvesting seed or lint from the field.

- 5 The invention provides methods of producing a cotton plant and/or seed that tolerates application of dicamba and glufosinate herbicides by sexually crossing a cotton event MON 88701 containing plant comprising a sequence selected from SEQ ID NO: 1-10 with a second cotton plant, thereby producing seed, growing the seed to produce progeny plants, treating the progeny plants with dicamba and/or glufosinate, and selecting a progeny plant that is tolerant to both dicamba and glufosinate. The methods may also include selfing the selected progeny plant to produce a plurality of second generation progeny plants and selecting from these a dicamba and glufosinate tolerant plant. The methods may also include sexually crossing the selected progeny plant with another cotton plant to produce seed, growing the seed to produce a second generation of progeny plants, treating the second generation of progeny plants with dicamba and/or glufosinate, and selecting a second generation progeny plant that is tolerant to dicamba and glufosinate. The invention provides methods of producing a cotton plant and/or seed that tolerates application of dicamba and glufosinate herbicides by selfing a dicamba and glufosinate tolerant cotton plant comprising event MON 88701 comprising a sequence selected from SEQ ID NO: 1-10, thereby producing seed, growing the seed to produce progeny plants, treating the progeny plants with dicamba and/or glufosinate; and selecting a progeny plant that is tolerant to dicamba and glufosinate. The invention provides methods of determining the zygosity of a cotton event MON 88701 containing plant or seed comprising contacting a cotton DNA sample with a primer set comprising SEQ ID NO: 11, 12, and 14 and a probe set comprising SEQ ID NO: 13 and 15; then performing a nucleic acid amplification reaction with the sample, primer set, and probe set; then detecting in the nucleic acid amplification reaction a first fluorescent signal that is diagnostic for event MON 88701 and a second fluorescent signal different from the first fluorescent signal and that is diagnostic for native cotton genomic DNA corresponding to the location of insertion of the event MON 88701 transgene; and analyzing the presence and/or absence of the first fluorescent signal and the second fluorescent signal in the nucleic acid amplification reaction, wherein the presence of both fluorescent signals indicates the sample is heterozygous for event MON 88701

and the presence of only the first fluorescent signal indicates the sample is homozygous for event MON 88701. The invention also provides a cotton plant, seed, plant cell, or plant part comprising dicamba and glufosinate tolerance genes mapped on chromosome A08 at the map position of 19.3 cM and bordered by NG0207927 at the map position of 18.6 cM on left and by NG0207529 at the map position of 20.0 cM on right, and methods of using the same. The foregoing and other aspects of the invention will become more apparent from the following detailed description.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 illustrates the organization of the transgenic insert in the genome of a cotton plant comprising event MON 88701. [A] corresponds to the relative position of SEQ ID NO: 1; [A'] corresponds to the relative position of SEQ ID NO: 3; [A''] corresponds to the relative position of SEQ ID NO: 5; [B] corresponds to the relative position of SEQ ID NO: 2; [B'] corresponds to the relative position of SEQ ID NO: 4; [B''] corresponds to the relative position of SEQ ID NO: 6; [C] corresponds to the relative position of SEQ ID NO: 7; [D] corresponds to the relative position of SEQ ID NO: 8; [E] corresponds to the relative position of SEQ ID NO: 9; [F] corresponds to the relative position of SEQ ID NO: 10; SQ21654 and SQ23205 correspond to the relative position of primers used to identify cotton event MON 88701.

Figure 2 shows two years of agronomic yield field trial data reported as pounds of seedcotton per acre.

Figure 3 shows first year yield field trial data reported as pounds of seedcotton per acre.

Figure 4 shows second year yield field trial data reported as pounds of seedcotton per acre with increasing amounts of either dicamba (4.A.) or glufosinate (4.B.) herbicide.

Figure 5 shows percentage of necrotic spotting occurring with increasing amounts of either dicamba (5.A.) or glufosinate (5.B.) herbicide.

Figure 6 shows yield field trial data as pounds of seedcotton per acre of the spray regimen for event MON 88701.

Figure 7 shows plants comprising event MON 88701 versus nontransgenic Coker 130 plants sprayed with dicamba and glufosinate in the field. Herbicide applications were 1 lb dicamba (2X) at pre; 1 lb glufosinate (2X) at 2-leaf; 1 lb dicamba at 5-leaf; and 1 lb glufosinate at 8 leaf.

BRIEF DESCRIPTION OF THE SEQUENCES

SEQ ID NO: 1 is a twenty nucleotide sequence representing the 5' junction region of cotton genomic DNA and the integrated transgenic expression cassette. SEQ ID NO: 1 is positioned in SEQ ID NO: 10 at nucleotide position 1117-1136.

- 5 **SEQ ID NO: 2** is a twenty nucleotide sequence representing the 3' junction region of cotton genomic DNA and the integrated transgenic expression cassette. SEQ ID NO: 2 is positioned in SEQ ID NO: 10 at nucleotide position 5222-5241.

SEQ ID NO: 3 is a sixty nucleotide sequence representing the 5' junction region of cotton genomic DNA and the integrated transgenic expression cassette.

- 10 **SEQ ID NO: 4** is a sixty nucleotide sequence representing the 3' junction region of cotton genomic DNA and the integrated transgenic expression cassette.

SEQ ID NO: 5 is a one-hundred nucleotide sequence representing the 5' junction region of cotton genomic DNA and the integrated transgenic expression cassette.

- 15 **SEQ ID NO: 6** is a one-hundred nucleotide sequence representing the 3' junction region of cotton genomic DNA and the integrated transgenic expression cassette.

SEQ ID NO: 7 is the 5' sequence flanking the inserted DNA of MON 88701 up to and including a portion of integrated transgenic expression cassette.

- 20 **SEQ ID NO: 8** is the 3' sequence flanking the inserted DNA of MON 88701 up to and including a portion of integrated transgenic expression cassette.

SEQ ID NO: 9 is the sequence of the integrated transgenic expression cassette.

- 25 **SEQ ID NO: 10** is the contiguous nucleotide sequence of the 5' sequence flanking the inserted DNA (SEQ ID NO: 7), the integrated transgenic expression cassette (SEQ ID NO: 9), and the 3' sequence flanking the inserted DNA (SEQ ID NO: 8). SEQ ID NO: 10 includes SEQ ID NO: 1-9.

- 30 **SEQ ID NO: 11** is the sequence of a primer referred to as Primer SQ21654 and used to identify cotton event MON 88701. It is complimentary to the inserted expression cassette at the region close to the 3' transgene insertion border. A PCR amplicon produced from a TAQMAN® (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) assay using the combination of primers SQ21654 and SQ23205 (SEQ ID NO: 12) is a

positive result for the presence of the event MON 88701. This primer set may also be used to identify a MON 88701 event in a zygosity assay.

5 **SEQ ID NO: 12** is the sequence of a primer referred to as Primer SQ23205 and used to identify cotton event MON 88701. It is complimentary to a 3' region flanking the inserted expression cassette and close to the transgene DNA insertion border. A PCR amplicon produced from a TAQMAN® (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) assay using the combination of primers SQ21654 (SEQ ID NO: 11) and SQ23205 is a positive result for the presence of the event MON 88701. This is also the primer used to identify MON 88701 event and wild-type with a zygosity
10 assay.

SEQ ID NO: 13 is the sequence of a probe referred to as Probe PB10280 and used to identify cotton event MON 88701. It is complimentary to a region of the inserted expression cassette and adjacent to the 3' junction of the genomic DNA. This probe is a 6-FAMTM-labeled synthetic oligonucleotide. Release of a fluorescent
15 signal in an amplification reaction using primers SQ21654 and SQ23205 (SEQ ID NO: 11-12) in combination with 6-FAMTM-labeled probe PB10280 is diagnostic of event MON 88701 in a TAQMAN® assay. PB10280 is also the probe used to identify a MON 88701 event in a zygosity assay.

SEQ ID NO: 14 is the sequence of a primer referred to as Primer SQ23901
20 and used to identify a cotton wild-type allele in a MON 88701 zygosity assay.

SEQ ID NO: 15 is the sequence of a VIC TM-labeled probe referred to as Probe PB10631 and used to identify a cotton wild-type allele in a MON 88701 zygosity assay.

DETAILED DESCRIPTION

25 The following definitions and methods are provided to better define the invention and to guide those of ordinary skill in the art in the practice of the invention. Unless otherwise noted, terms are to be understood according to conventional usage by those of ordinary skill in the relevant art.

 The invention provides a transgenic cotton event MON 88701 that exhibits
30 commercially acceptable tolerance to applications of dicamba and glufosinate herbicides. The event comprises a single insertion of transgenic DNA into the chromosome/genome of the cotton germplasm. An "event" is produced by: (i) transformation of a plant cell with a nucleic acid construct that includes a transgene of

interest, (ii) regeneration of a population of plants resulting from the insertion of the transgene into the genome of the plant, and (iii) selection of a particular plant characterized by insertion of the transgene into a particular location in the plant's genome.

5 The term "event" refers to a DNA molecule comprising the inserted DNA and the flanking cotton genomic DNA immediately adjacent to either side of the inserted DNA. This DNA molecule is created by the act of inserting the transgenic DNA into the genome of the cotton plant, *i.e.*, by the act of transformation. This DNA molecule therefore comprises a nucleotide sequence that is both specific to the event and that is
10 unique to the genome of the cotton plant into which the transgenic DNA has been inserted, in that this nucleotide sequence contains both the sequence of a particular region of cotton genomic DNA and of the transgenic DNA insert. The arrangement of the inserted DNA in cotton event MON 88701 in relation to the surrounding cotton plant genome DNA is therefore specific and unique for cotton event MON 88701.
15 This DNA molecule is also an integral part of the cotton chromosome of event MON 88701 containing plants and as such is static in the plant and may be passed on to progeny of the plant.

 The present invention also provides the original transformant that includes the transgene inserted into the particular location in the plant's genome and progeny of
20 the transformant that include the transgene inserted into the particular location in the plant's genome. Such progeny may be produced by a sexual outcross between the transformant, or its progeny, and another plant. Such other plant may be a transgenic plant comprising the same or different transgene and/or a nontransgenic plant, such as one from a different variety. Even after repeated back-crossing to a recurrent parent,
25 the inserted DNA and flanking DNA from the transformed parent is present in the progeny of the cross at the same genomic location.

 As used herein, the term "cotton" means *Gossypium hirsutum* and includes all plant varieties that can be bred with cotton, including wild cotton species as well as those plants belonging to *Gossypium* that permit breeding between species.

30 Event MON 88701 comprises an integrated transgenic expression cassette that confers tolerance to applications of dicamba and glufosinate herbicides to the cotton plant. "Dicamba" refers to 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid. Dicamba is a synthetic auxin herbicide useful for controlling broadleaf weeds. Cotton plants were transformed with a gene (*dmo*) from *Stenotrophomonas maltophilia* encoding

dicamba mono-oxygenase (DMO). DMO is an enzyme that catalyzes the deactivation of dicamba via an O-demethylation reaction to the nonherbicidal compound 3,5-dichlorosalicylic acid. “Glufosinate” refers to 2-amino-4-(hydroxymethylphosphinyl)butanoic acid. Glufosinate is an organophosphorus herbicide useful for controlling a broad spectrum of annual and perennial grass and broadleaf weeds. Cotton plants were transformed with a Bialaphos Resistance gene (*bar*) from *Streptomyces hygroscopicus* encoding phosphinothricin acetyl transferase (PAT). PAT is an enzyme that catalyzes acetylation and thus inactivation of glufosinate.

As used herein, the term “recombinant” refers to a form of DNA and/or protein and/or an organism that would not normally be found in nature and as such was created by human intervention. Such human intervention may produce a recombinant DNA molecule and/or a recombinant plant. As used herein, a “recombinant DNA molecule” is a DNA molecule comprising a combination of DNA molecules that would not naturally occur together and is the result of human intervention, *e.g.*, a DNA molecule that is comprised of a combination of at least two DNA molecules heterologous to each other, and/or a DNA molecule that is artificially synthesized and comprises a polynucleotide sequence that deviates from the polynucleotide sequence that would normally exist in nature, and/or a DNA molecule that comprises a transgene artificially incorporated into a host cell’s genomic DNA and the associated flanking DNA of the host cell’s genome. An example of a recombinant DNA molecule is a DNA molecule described herein resulting from the insertion of the transgene into the cotton genomic DNA, which may ultimately result in the expression of a recombinant RNA and/or protein molecule in that organism. As used herein, a “recombinant plant” is a plant that would not normally exist in nature, is the result of human intervention, and contains a transgene and/or heterologous DNA molecule incorporated into its genome. As a result of such genomic alteration, the recombinant plant is distinctly different from the related wildtype plant. An example of a recombinant plant is a cotton plant described herein as comprising event MON 88701.

As used herein, the term “transgene” refers to a nucleotide molecule artificially incorporated into a host cell’s genome. Such transgene may be heterologous to the host cell. The term “transgenic plant” refers to a plant comprising such a transgene.

As used herein, the term “heterologous” refers to a first molecule not normally found in combination with a second molecule in nature. For example, a molecule may be derived from a first species and inserted into the genome of a second species. The molecule would thus be heterologous to the host and artificially incorporated into a host cell’s genome.

As used herein, the term “chimeric” refers to a single DNA molecule produced by fusing a first DNA molecule to a second DNA molecule, where neither first nor second DNA molecule would normally be found in that configuration, *i.e.*, fused to the other. The chimeric DNA molecule is thus a new DNA molecule not otherwise normally found in nature.

The invention provides DNA molecules and their corresponding nucleotide sequences. As used herein, the term “DNA”, “DNA molecule”, “nucleotide molecule” refers to a DNA molecule of genomic or synthetic origin, *i.e.*, a polymer of deoxyribonucleotide bases or a polynucleotide molecule, read from the 5’ (upstream) end to the 3’ (downstream) end. As used herein, the term “DNA sequence”, “nucleotide sequence” or “polynucleotide sequence” refers to the nucleotide sequence of a DNA molecule. The nomenclature used herein is that required by Title 37 of the United States Code of Federal Regulations § 1.822 and set forth in the tables in WIPO Standard ST.25 (1998), Appendix 2, Tables 1 and 3. By convention, the nucleotide sequences of the invention provided as SEQ ID NOS: 1-10 and fragments thereof are disclosed with reference to only one strand of the two complementary nucleotide sequence strands. By implication, the complementary sequences (*i.e.* the sequences of the complementary strand), also referred to in the art as the reverse complementary sequences, are within the scope of the invention and are expressly intended to be within the scope of the subject matter claimed.

The nucleotide sequence corresponding to the complete nucleotide sequence of the inserted transgenic DNA and substantial segments of the cotton genome DNA flanking either end of the inserted transgenic DNA is provided herein as SEQ ID NO: 10. A subsection of this is the inserted transgenic DNA provided as SEQ ID NO: 9. The nucleotide sequence of the cotton genome DNA physically linked by phosphodiester bond linkage to and therefore flanking the 5’ end of the inserted transgenic DNA is set forth as shown in Figure 1 and provided as SEQ ID NO: 1, 3, 5, and 7. The nucleotide sequence of the cotton genome DNA physically linked by phosphodiester bond linkage to and therefore flanking the 3’ end of the inserted

transgenic DNA is set forth as shown in Figure 1 and provided as SEQ ID NO: 2, 4, 6, and 8.

The cotton event MON 88701 further comprises two regions, one spanning the 5' location and one spanning the 3' location where the transgenic DNA is inserted into the genomic DNA, referred to herein as the 5' and 3' junction, respectively. A "junction sequence" or "junction region" refers to the DNA sequence and/or corresponding DNA molecule that spans the inserted transgenic DNA and the adjacent flanking genomic DNA. The junction sequences may be arbitrarily represented by the nucleotide sequences provided as SEQ ID NO: 1 and SEQ ID NO: 2, each representing 10 nucleotides of the flanking genomic DNA adjacent to and contiguous with 10 nucleotides of insert DNA. Alternatively, the junction sequences may be arbitrarily represented by the two 60 nucleotide sequences provided as SEQ ID NO: 3 and SEQ ID NO: 4, each representing 30 nucleotides of the flanking genomic DNA adjacent to and contiguous with 30 nucleotides of insert DNA. Alternatively, the junction sequences may be arbitrarily represented by the two 100 nucleotide sequences provided as SEQ ID NO: 5 and SEQ ID NO: 6, each representing 50 nucleotides of the flanking genomic DNA adjacent to and contiguous with 50 nucleotides of insert DNA. These nucleotides are connected by phosphodiester linkage and in cotton event MON 88701 are present as part of the genome. The identification of one or more of SEQ ID NO: 1-10 in a sample derived from a cotton plant, seed, or plant part is determinative that the DNA was obtained from cotton event MON 88701 and is diagnostic for the presence in a sample of DNA from cotton event MON 88701. The invention thus provides a DNA molecule that contains at least one of the nucleotide sequences provided as SEQ ID NO: 1-10. Any segment of DNA derived from transgenic cotton event MON 88701 that is sufficient to include at least one of the sequences provided as provided as SEQ ID NO: 1-10 is within the scope of the invention. In addition, any polynucleotide comprising a sequence complementary to any of the sequences described within this paragraph is within the scope of the invention. Figure 1 illustrates the physical arrangement of SEQ ID NO: 1-9 relative to SEQ ID NO: 10 arranged from 5' to 3'.

The invention provides exemplary DNA molecules that can be used either as primers or probes for diagnosing the presence of DNA derived from a cotton plant comprising event MON 88701 in a sample. Such primers or probes are specific for a target nucleic acid sequence and as such are useful for the identification of cotton

event MON 88701 nucleic acid sequence by the methods of the invention described herein.

A “primer” is typically a highly purified, isolated polynucleotide that is designed for use in specific annealing or hybridization methods that involve thermal amplification. A pair of primers may be used with template DNA, such as a sample of cotton genomic DNA, in a thermal amplification, such as polymerase chain reaction (PCR), to produce an amplicon, where the amplicon produced from such reaction would have a DNA sequence corresponding to sequence of the template DNA located between the two sites where the primers hybridized to the template. As used herein, an “amplicon” is a piece or fragment of DNA that has been synthesized using amplification techniques. An amplicon of the invention comprises at least one of the sequences provided as provided as SEQ ID NO: 1-10. A primer is typically designed to hybridize to a complementary target DNA strand to form a hybrid between the primer and the target DNA strand, and the presence of the primer is a point of recognition by a polymerase to begin extension of the primer (*i.e.*, polymerization of additional nucleotides into a lengthening nucleotide molecule) using as a template the target DNA strand. Primer pairs, as used in the invention, are intended to refer to use of two primers binding opposite strands of a double stranded nucleotide segment for the purpose of amplifying linearly the polynucleotide segment between the positions targeted for binding by the individual members of the primer pair, typically in a thermal amplification reaction or other conventional nucleic-acid amplification methods. Exemplary DNA molecules useful as primers are provided as SEQ ID NO: 11-12. The primer pair provided as SEQ ID NO: 11 and SEQ ID NO: 12 are useful as a first DNA molecule and a second DNA molecule that is different from the first DNA molecule, and both are each of sufficient length of contiguous nucleotides of SEQ ID NO: 10 to function as DNA primers that, when used together in a thermal amplification reaction with template DNA derived from cotton event MON 88701, to produce an amplicon diagnostic for cotton event MON 88701 DNA in a sample.

A “probe” is an isolated nucleic acid that is complementary to a strand of a target nucleic acid. Probes according to the invention include not only deoxyribonucleic or ribonucleic acids but also polyamides and other probe materials that bind specifically to a target DNA sequence and the detection of such binding can be useful in diagnosing, discriminating, determining, or confirming the presence of

that target DNA sequence in a particular sample. A probe may be attached to a conventional detectable label or reporter molecule, *e.g.*, a radioactive isotope, ligand, chemiluminescent agent, or enzyme. An exemplary DNA molecule useful as a probe is provided as SEQ ID NO: 13.

5 Probes and primers according to the invention may have complete sequence identity with the target sequence, although primers and probes differing from the target sequence that retain the ability to hybridize preferentially to target sequences may be designed by conventional methods. In order for a nucleic acid molecule to serve as a primer or probe it need only be sufficiently complementary in sequence to
10 be able to form a stable double-stranded structure under the particular solvent and salt concentrations employed. Any conventional nucleic acid hybridization or amplification method can be used to identify the presence of transgenic DNA from cotton event MON 88701 in a sample. Probes and primers are generally at least about 11 nucleotides, at least about 18 nucleotides, at least about 24 nucleotides, or at least
15 about 30 nucleotides or more in length. Such probes and primers hybridize specifically to a target DNA sequence under stringent hybridization conditions. Conventional stringency conditions are described by Sambrook *et al.*, 1989, and by Haymes *et al.*, In: *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, DC (1985). As used herein, two nucleic acid molecules are capable of
20 specifically hybridizing to one another if the two molecules are capable of forming an anti-parallel, double-stranded nucleic acid structure. A nucleic acid molecule is the “complement” of another nucleic acid molecule if they exhibit complete complementarity. As used herein, two molecules exhibit “complete complementarity” if when aligned every nucleotide of the first molecule is
25 complementary to every nucleotide of the second molecule. Two molecules are “minimally complementary” if they can hybridize to one another with sufficient stability to permit them to remain annealed to one another under at least conventional “low-stringency” conditions. Similarly, the molecules are “complementary” if they can hybridize to one another with sufficient stability to permit them to remain
30 annealed to one another under conventional “high-stringency” conditions. Departures from complete complementarity are therefore permissible, as long as such departures do not completely preclude the capacity of the molecules to form a double-stranded structure.

As used herein, the term “isolated” refers to at least partially separating a

molecule from other molecules normally associated with it in its native or natural state. In one embodiment, the term “isolated” refers to a DNA molecule that is at least partially separated from the nucleic acids which normally flank the DNA molecule in its native or natural state. Thus, DNA molecules fused to regulatory or coding sequences with which they are not normally associated, for example as the result of recombinant techniques, are considered isolated herein. Such molecules are considered isolated even when integrated into the chromosome of a host cell or present in a nucleic acid solution with other DNA molecules.

Any number of methods well known to those skilled in the art can be used to isolate and manipulate a DNA molecule, or fragment thereof, disclosed in the invention. For example, PCR (polymerase chain reaction) technology can be used to amplify a particular starting DNA molecule and/or to produce variants of the original molecule. DNA molecules, or fragment thereof, can also be obtained by other techniques such as by directly synthesizing the fragment by chemical means, as is commonly practiced by using an automated oligonucleotide synthesizer.

The DNA molecules and corresponding nucleotide sequences provided herein are therefore useful for, among other things, identifying cotton event MON 88701, selecting plant varieties or hybrids comprising cotton event MON 88701, detecting the presence of DNA derived from the transgenic cotton event MON 88701 in a sample, and monitoring samples for the presence and/or absence of cotton event MON 88701 or plant parts derived from cotton plants comprising event MON 88701.

The invention provides cotton plants, progeny, seeds, plant cells, plant parts (such as pollen, ovule, pod, flower tissue, root tissue, stem tissue, and leaf tissue), and commodity products. These plants, progeny, seeds, plant cells, plant parts, and commodity products contain a detectable amount of a polynucleotide of the invention, *i.e.*, such as a polynucleotide having at least one of the sequences provided as SEQ ID NO: 1-10. Plants, progeny, seeds, plant cells, and plant parts of the invention may also contain one or more additional transgenes. Such transgene may be any nucleotide sequence encoding a protein or RNA molecule conferring a desirable trait including but not limited to increased insect resistance, increased water use efficiency, increased yield performance, increased drought resistance, increased seed quality, improved nutritional quality, and/or increased herbicide tolerance, in which the desirable trait is measured with respect to a cotton plant lacking such additional transgene.

The invention provides cotton plants, progeny, seeds, plant cells, and plant part such as pollen, ovule, pod, flower, root or stem tissue, and leaves derived from a transgenic cotton plant comprising event MON 88701. A representative sample of cotton seed comprising event MON 88701 has been deposited according to the
5 Budapest Treaty with the American Type Culture Collection (ATCC®). The ATCC repository has assigned the Patent Deposit Designation PTA-11754 to the event MON 88701 comprising seed.

The invention provides a microorganism comprising a DNA molecule having at least one sequence selected from SEQ ID NO: 1-10 present in its genome. An
10 example of such a microorganism is a transgenic plant cell. Microorganisms, such as a plant cell of the invention, are useful in many industrial applications, including but not limited to: (i) use as research tool for scientific inquiry or industrial research; (ii) use in culture for producing endogenous or recombinant carbohydrate, lipid, nucleic acid, or protein products or small molecules that may be used for subsequent scientific
15 research or as industrial products; and (iii) use with modern plant tissue culture techniques to produce transgenic plants or plant tissue cultures that may then be used for agricultural research or production. The production and use of microorganisms such as transgenic plant cells utilizes modern microbiological techniques and human intervention to produce a man-made, unique microorganism. In this process,
20 recombinant DNA is inserted into a plant cell's genome to create a transgenic plant cell that is separate and unique from naturally occurring plant cells. This transgenic plant cell can then be cultured much like bacteria and yeast cells using modern microbiology techniques and may exist in an undifferentiated, unicellular state. The new plant cell's genetic composition and phenotype is a technical effect created by
25 the integration of the heterologous DNA into the genome of the cell. Another aspect of the invention is a method of using a microorganism of the invention. Methods of using microorganisms of the invention, such as transgenic plant cells, include (i) methods of producing transgenic cells by integrating recombinant DNA into the genome of the cell and then using this cell to derive additional cells possessing the
30 same heterologous DNA; (ii) methods of culturing cells that contain recombinant DNA using modern microbiology techniques; (iii) methods of producing and purifying endogenous or recombinant carbohydrate, lipid, nucleic acid, or protein products from cultured cells; and (iv) methods of using modern plant tissue culture

techniques with transgenic plant cells to produce transgenic plants or transgenic plant tissue cultures.

Plants of the invention may pass along the event DNA, including the transgene, to progeny. As used herein, “progeny” includes any plant, seed, plant cell, and/or regenerable plant part comprising the event DNA derived from an ancestor plant and/or comprising a DNA molecule having at least one sequence selected from SEQ ID NO: 1-10. Plants, progeny, and seeds may be homozygous or heterozygous for the transgene. Progeny may be grown from seeds produced by a cotton event MON 88701 containing plant and/or from seeds produced by a plant fertilized with pollen from a cotton event MON 88701 containing plant.

Progeny plants may be self-pollinated (also known as “selfing”) to generate a true breeding line of plants, *i.e.*, plants homozygous for the transgene. Selfing of appropriate progeny can produce plants that are homozygous for both added, exogenous genes.

Alternatively, progeny plants may be outcrossed, *e.g.*, bred with another unrelated plant, to produce a varietal or a hybrid seed or plant. The other unrelated plant may be transgenic or nontransgenic. A varietal or hybrid seed or plant of the invention may thus be derived by crossing a first parent that lacks the specific and unique DNA of the cotton event MON 88701 with a second parent comprising cotton event MON 88701, resulting in a hybrid comprising the specific and unique DNA of the cotton event MON 88701. Each parent can be a hybrid or an inbred/variatal, so long as the cross or breeding results in a plant or seed of the invention, *i.e.*, a seed having at least one allele containing the DNA of cotton event MON 88701 and/or a DNA molecule having at least one sequence selected from SEQ ID NO: 1-10. Two different transgenic plants may thus be crossed to produce hybrid offspring that contain two independently segregating, added, exogenous genes. For example, the MON 88701 containing dicamba and glufosinate tolerant cotton can be crossed with other transgenic cotton plants to produce a plant having the characteristics of both transgenic parents. One example of this would be a cross of MON 88701 containing dicamba and glufosinate tolerant cotton with a plant having one or more additional traits such as herbicide tolerance (*e.g.* cotton event MON 1445 or cotton event MON 88913) and/or insect control (*e.g.* cotton event MON 15985, MON 757, or MON 531), resulting in a progeny plant or seed that is tolerant to dicamba and glufosinate and has at least one or more additional traits. Back-crossing to a parental

plant and out-crossing with a non-transgenic plant are also contemplated, as is vegetative propagation. Descriptions of other breeding methods that are commonly used for different traits and crops can be found in one of several references, *e.g.*, Fehr, in *Breeding Methods for Cultivar Development*, Wilcox J. ed., American Society of
5 Agronomy, Madison WI (1987).

The invention provides a plant part that is derived from cotton plants comprising event MON 88701. As used herein, a “plant part” refers to any part of a plant which is comprised of material derived from a cotton plant comprising event MON 88701. Plant parts include but are not limited to pollen, ovule, pod, flower, root
10 or stem tissue, fibers, and leaves. Plant parts may be viable, nonviable, regenerable, and/or nonregenerable.

The invention provides a commodity product that is derived from cotton plants comprising event MON 88701. As used herein, a “commodity product” refers to any composition or product which is comprised of material derived from a cotton event
15 MON 88701 containing plant, seed, plant cell, or plant part. Commodity products may be sold to consumers and may be viable or nonviable. Nonviable commodity products include but are not limited to nonviable seeds; processed seeds, seed parts, and plant parts; lint; seeds and plant parts processed for feed or food, oil, fiber, paper, biomasses, and fuel products. Viable commodity products include but are not limited
20 to seeds, plants, and plant cells. The cotton plants comprising event MON 88701 can thus be used to manufacture any commodity product typically acquired from cotton. Any such commodity product that is derived from cotton plants comprising event MON 88701 may contain at least a detectable amount of the specific and unique DNA corresponding to cotton event MON 88701, and specifically may contain a detectable
25 amount of a polynucleotide comprising a DNA molecule having at least one sequence selected from SEQ ID NO: 1-10. Any standard method of detection for nucleotide molecules may be used, including methods of detection disclosed herein. A commodity product is within the scope of the invention if there is any detectable amount of a DNA molecule having at least one sequence selected from SEQ ID NO:
30 1-10 in the commodity product.

The plants, progeny, seeds, plant cells, plant parts (such as pollen, ovule, pod, flower, root or stem tissue, and leaves), and commodity products of the invention are therefore useful for, among other things, growing plants for the purpose of producing seed and/or plant parts comprising cotton event MON 88701 for agricultural purposes,

producing progeny comprising cotton event MON 88701 for plant breeding and research purposes, use with microbiological techniques for industrial and research applications, and sale to consumers.

The invention provides methods for controlling weeds and methods for
5 producing plants using dicamba and glufosinate herbicides and cotton event
MON 88701. A method for controlling weeds in a field is provided and consists of
planting cotton event MON 88701 containing varietal or hybrid plants in a field and
applying a herbicidally effective dose of dicamba or glufosinate or dicamba and
glufosinate to the field for the purpose of controlling weeds in the field without
10 injuring the MON 88701 containing plants. Such application of dicamba or
glufosinate or dicamba and glufosinate herbicides may be pre-emergence, *i.e.*, any
time after MON 88701 containing seed is planted and before MON 88701 containing
plants emerge, or post-emergence, *i.e.*, any time after MON 88701 containing plants
emerge. Another method for controlling weeds in a field is also provided and consists
15 of applying an effective dose of dicamba or glufosinate or dicamba and glufosinate
herbicides to control weeds in a field and then planting cotton plants comprising event
MON 88701 in the field. Such application of dicamba or glufosinate or dicamba and
glufosinate herbicides would be pre-planting, *i.e.*, before MON 88701 containing seed
is planted, and could be done any time pre-planting including, but not limited to,
20 about 14 days pre-planting to about 1 day pre-planting. The invention also provides a
method for producing cotton seed or lint essentially free of weed seeds by planting
seeds of a dicamba and glufosinate tolerant cotton plants comprising MON 88701 in a
field, applying a post-emergence effective dose of dicamba or glufosinate or dicamba
and glufosinate herbicides sufficient to kill the weed to the field, and harvesting seed
25 or lint from the field. A herbicidally effective dose of dicamba for use in the field
should consist of a range from about 0.005 pounds per acre to about 16 pounds per
acre of dicamba over a growing season. In one embodiment, a total of about 0.5
pounds per acre to about 2 pounds per acre of dicamba is applied over a growing
season. Multiple applications of dicamba may be used over a growing season, for
30 example, two applications (such as a pre-planting application and a post-emergence
application or a pre-emergence application and a post-emergence application) or three
applications (such as a pre-planting application, a pre-emergence application, and a
post-emergence application). A herbicidally effective dose of glufosinate for use in
the field should consist of a range from about 0.005 pounds per acre to about 16

pounds per acre of glufosinate over a growing season. In one embodiment, a total of about 0.5 pounds per acre to about 1.59 pounds per acre of glufosinate is applied over a growing season. Multiple applications of glufosinate may be used over a growing season, for example, two applications (such as a pre-planting application and a post-emergence application or a pre-emergence application and a post-emergence application) or three applications (such as a pre-planting application, a pre-emergence application, and a post-emergence application or three post-emergence applications).

Methods for producing an herbicide tolerant cotton plant comprising the DNA sequences specific and unique to event MON 88701 of the invention are provided.

Transgenic plants used in these methods may be homozygous or heterozygous for the transgene. Progeny plants produced by these methods may be varietal or hybrid plants; may be grown from seeds produced by a cotton event MON 88701 containing plant and/or from seeds produced by a plant fertilized with pollen from a cotton event MON 88701 containing plant; and may be homozygous or heterozygous for the transgene. Progeny plants may be subsequently self-pollinated to generate a true breeding line of plants, *i.e.*, plants homozygous for the transgene, or alternatively may be outcrossed, *e.g.*, bred with another unrelated plant, to produce a varietal or a hybrid seed or plant.

A cotton plant that tolerates application of dicamba and glufosinate herbicides may be produced by sexually crossing an event MON 88701 containing plant comprising a DNA molecule having at least one sequence selected from SEQ ID NO: 1-10 with another cotton plant and thereby producing seed, which is then grown into progeny plants. These progeny plants may then be treated with dicamba and/or glufosinate herbicides to select for progeny plants that are tolerant to dicamba and glufosinate herbicides. Alternatively, these progeny plants may be analyzed using diagnostic methods to select for progeny plants that contain the event MON 88701 DNA. The other plant used in the crossing may or may not be tolerant to dicamba and glufosinate herbicides and may or may not be transgenic. The progeny plant and/or seed produced may be varietal or hybrid seed. In practicing this method, the step of sexually crossing one plant with another plant, *i.e.*, cross-pollinating, may be accomplished or facilitated by human intervention, for example: by human hands collecting the pollen of one plant and contacting this pollen with the style or stigma of a second plant; by human hands and/or actions removing, destroying, or covering the stamen or anthers of a plant (*e.g.*, by detasseling or by application of a chemical

gametocide) so that natural self-pollination is prevented and cross-pollination would have to take place in order for fertilization to occur; by human placement of pollinating insects in a position for “directed pollination” (*e.g.*, by placing beehives in orchards or fields or by caging plants with pollinating insects); by human opening or removing of parts of the flower to allow for placement or contact of foreign pollen on the style or stigma (*e.g.*, in soy which naturally has flowers that hinder or prevent cross-pollination, making them naturally obligate self-pollinators without human intervention); by selective placement of plants (*e.g.*, intentionally planting plants in pollinating proximity); and/or by application of chemicals to precipitate flowering or to foster receptivity (of the stigma for pollen).

A cotton plant that tolerates application of dicamba and glufosinate herbicides may be produced by selfing an event MON 88701 containing plant comprising a DNA molecule having at least one sequence selected from SEQ ID NO: 1-10 and thereby producing seed, which is then grown into progeny plants. These progeny plants may then be treated with dicamba and glufosinate herbicides to select for progeny plants that are tolerant to dicamba and glufosinate herbicides. Alternatively, these progeny plants may be analyzed using diagnostic methods to select for progeny plants that contain the event MON 88701 DNA. In practicing this method, the step of sexually crossing one plant with itself, *i.e.*, self-pollinating or selfing, may be accomplished or facilitated by human intervention, for example: by human hands collecting the pollen of the plant and contacting this pollen with the style or stigma of the same plant and then optionally preventing further fertilization of the plant; by human hands and/or actions removing, destroying, or covering the stamen or anthers of other nearby plants (*e.g.*, by detasseling or by application of a chemical gametocide) so that natural cross-pollination is prevented and self-pollination would have to take place in order for fertilization to occur; by human placement of pollinating insects in a position for “directed pollination” (*e.g.*, by caging a plant alone with pollinating insects); by human manipulation of the flower or its parts to allow for self-pollination; by selective placement of plants (*e.g.*, intentionally planting plants beyond pollinating proximity); and/or by application of chemicals to precipitate flowering or to foster receptivity (of the stigma for pollen).

Progeny cotton plants and seeds encompassed by these methods and produced by using these methods will be distinct from other cotton plants, for example because the progeny cotton plants and seeds: are recombinant and as such created by human

intervention; are dicamba and glufosinate herbicide tolerant; contain at least one allele that consists of the transgene DNA of the invention; and/or contain a detectable amount of a DNA molecule comprising at least one sequence selected from SEQ ID NO: 1-10. A seed may be selected from an individual progeny plant, and so long as
5 the seed comprises a DNA molecule having at least one sequence selected from SEQ ID NO: 1-10, it will be within the scope of the invention.

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

The plants and seeds used in the methods disclosed herein may also contain one or more additional transgenes. Such transgene may be any nucleotide sequence encoding a protein or RNA molecule conferring a desirable trait including but not limited to increased insect resistance, increased water use efficiency, increased yield performance, increased drought resistance, increased seed quality, improved
15 nutritional quality, and/or increased herbicide tolerance, in which the desirable trait is measured with respect to a cotton plant lacking such additional transgene.

The methods of the invention are therefore useful for, among other things, controlling weeds in a field while growing plants for the purpose of producing seed and/or plant parts comprising cotton event MON 88701 for agricultural or research
25 purposes, selecting for progeny comprising cotton event MON 88701 for plant breeding or research purposes, and producing progeny plants and seeds comprising cotton event MON 88701.

The plants, progeny, seeds, plant cells, plant parts (such as pollen, ovule, pod, flower, root or stem tissue, and leaves), and commodity products of the invention may be evaluated for DNA composition, gene expression, and/or protein expression. Such
30 evaluation may be done by using any standard method such as PCR, northern blotting, southern analysis, western blotting, immuno-precipitation, and ELISA or by using the methods of detection and/or the detection kits provided herein.

Methods of detecting the presence of DNA derived from a cotton cell, tissue, seed, or plant comprising cotton event MON 88701 in a sample are provided. One method consists of (i) extracting a DNA sample from at least one cotton cell, tissue, seed, or plant, (ii) contacting the DNA sample with at least one primer that is capable of producing DNA sequence specific to event MON 88701 DNA under conditions appropriate for DNA sequencing, (iii) performing a DNA sequencing reaction, and then (iv) confirming that the nucleotide sequence comprises a nucleotide sequence specific for event MON 88701, such as one selected from the group consisting of SEQ ID NO: 1-10. Another method consists of (i) extracting a DNA sample from at least one cotton cell, tissue, seed, or plant, (ii) contacting the DNA sample with a primer pair that is capable of producing an amplicon from event MON 88701 DNA under conditions appropriate for DNA amplification, (iii) performing a DNA amplification reaction, and then (iv) detecting the amplicon molecule and/or confirming that the nucleotide sequence of the amplicon comprises a nucleotide sequence specific for event MON 88701, such as one selected from the group consisting of SEQ ID NO: 1-10. The amplicon should be one that is specific for event MON 88701, such as an amplicon that comprises SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 2. The detection of a nucleotide sequence specific for event MON 88701 in the amplicon is determinative and/or diagnostic for the presence of the cotton event MON 88701 specific DNA in the sample. An example of a primer pair that is capable of producing an amplicon from event MON 88701 DNA under conditions appropriate for DNA amplification is provided as SEQ ID NO: 11-12. Other primer pairs may be readily designed by one of skill in the art and would comprise at least one fragment of SEQ ID NO: 10. Another method of detecting the presence of DNA derived from a cotton cell, tissue, seed, or plant comprising cotton event MON 88701 in a sample consists of (i) extracting a DNA sample from at least one cotton cell, tissue, seed, or plant, (ii) contacting the DNA sample with a DNA probe specific for event MON 88701 DNA, (iii) allowing the probe and the DNA sample to hybridize under stringent hybridization conditions, and then (iv) detecting hybridization between the probe and the target DNA sample. An example of the sequence a DNA probe that is specific for event MON 88701 DNA is provided as SEQ ID NO: 13. Other probes may be readily designed by one of skill in the art and would comprise at least one fragment of SEQ ID NO: 10. Detection of probe hybridization to the DNA sample is diagnostic for the presence of cotton event MON 88701 specific DNA in the sample. Absence of

hybridization is alternatively diagnostic of the absence of cotton event MON 88701 specific DNA in the sample.

DNA detection kits are provided that are useful for the identification of cotton event MON 88701 DNA in a sample and can also be applied to methods for breeding cotton plants containing the appropriate event DNA. Such kits contain DNA primers and/or probes comprising fragments of SEQ ID NO: 1-10. One example of such a kit comprises at least one DNA molecule of sufficient length of contiguous nucleotides of SEQ ID NO: 10 to function as a DNA probe useful for detecting the presence and/or absence of DNA derived from transgenic cotton plants comprising event MON 88701 in a sample. The DNA derived from transgenic cotton plants comprising event MON 88701 would comprise a DNA molecule having at least one sequence selected from SEQ ID NO: 1-10. A DNA molecule sufficient for use as a DNA probe is provided that is useful for determining, detecting, or diagnosing the presence and/or absence of cotton event MON 88701 DNA in a sample is provided as SEQ ID NO: 13. Other probes may be readily designed by one of skill in the art and should comprise at least 15 contiguous nucleotides of SEQ ID NO: 10 and be sufficiently unique to cotton event MON 88701 DNA in order to identify DNA derived from the event. Another type of kit comprises a primer pair useful for producing an amplicon useful for detecting the presence and/or absence of DNA derived from transgenic cotton event MON 88701 in a sample. Such a kit would employ a method comprising contacting a target DNA sample with a primer pair as described herein, then performing a nucleic acid amplification reaction sufficient to produce an amplicon comprising a DNA molecule having at least one sequence selected from SEQ ID NO: 1-10, and then detecting the presence and/or absence of the amplicon. Such a method may also include sequencing the amplicon or a fragment thereof, which would be determinative of, *i.e.* diagnostic for, the presence of the cotton event MON 88701 specific DNA in the target DNA sample. Other primer pairs may be readily designed by one of skill in the art and should comprise at least 15 contiguous nucleotides of SEQ ID NO: 10 and be sufficiently unique to cotton event MON 88701 DNA in order to identify DNA derived from the event.

Nucleic-acid amplification can be accomplished by any of the various nucleic-acid amplification methods known in the art, including thermal amplification methods. Many techniques are known in the art for detecting, quantifying, and/or sequencing the amplicon produced by these methods. One exemplary technique

useful in practicing this invention is TAQMAN® (PE Applied Biosystems, Foster City, CA).

The kits and detection methods of the invention are useful for, among other things, identifying cotton event MON 88701, selecting plant varieties or hybrids comprising cotton event MON 88701, detecting the presence of DNA derived from the transgenic cotton plants comprising event MON 88701 in a sample, and monitoring samples for the presence and/or absence of cotton plants comprising event MON 88701 or plant parts derived from cotton plants comprising event MON 88701.

The sequence of the heterologous DNA insert, junction sequences, or flanking sequences from cotton event MON 88701 can be verified (and corrected if necessary) by amplifying such sequences from the event using primers derived from the sequences provided herein followed by standard DNA sequencing of the amplicon or of the cloned DNA.

As used herein, the term “comprising” means “including but not limited to”.

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

EXAMPLES

Example 1: Transformation of Cotton and MON 88701 event selection

This example describes the production, analysis, and selection of event MON 88701. Summarized is the production and analysis of thousands of individual plants over multiple years through the rigorous molecular, phenotypic, and field testing required for the ultimate selection of the commercial event, the MON 88701 event.

The transgenic dicamba and glufosinate tolerant cotton event MON 88701 was created through *Agrobacterium*-mediated transformation of cotton hypocotyl tissue utilizing a plant transformation vector comprising the expression cassette illustrated in Figure 1. Methods for transforming cotton are known in the art. To produce the

MON 88701 event, Coker 130 cotton material (Asgrow, St Louis, MO) was used for plant transformation. Cotton cells were transformed and regenerated into intact cotton plants. Rooted plants with normal phenotypic characteristics were selected and transferred to soil for growth and further assessment.

5 R0 plants were transferred to soil and subjected to herbicide screening at 1X or 2X field rates (*i.e.*, 0.5 or 1.0 lb/acre active ingredient) of both dicamba and glufosinate. Subsequently, R0 plants containing only a single T-DNA expression cassette were identified and selected. The T-DNA expression cassette contains the
 10 *Peanut chlorotic streak virus* (PCISV) promoter with a duplicated enhancer region (P-PCISV.FLt-enh); operably linked to a DNA leader derived from RNA transcript of *Tobacco etch virus* (L-TEV); operably linked to a DNA molecule encoding an N-terminal chloroplast transit peptide from chloroplast transit peptide from 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) from *Arabidopsis thaliana* (TS-CTP2); operably linked to a DNA molecule encoding dicamba mono-oxygenase
 15 (DMO) from *Stenotrophomonas maltophilia*; operably linked to a 3' UTR DNA molecule derived from the fiber protein E6 gene of sea-island cotton (T-Gb.E6-3b); operably linked to the promoter of the enhanced 35S RNA transcript (with a duplicated enhancer region) from *Cauliflower mosaic virus* (P-CaMV.35S-enh); operably linked to a DNA leader derived from the 5 untranslated region of the heat
 20 shock protein 70 (HSP70) gene from *Petunia x hybrida* (L-Ph.DnaK); operably linked to the Bialaphos Resistance gene (*bar*) gene from *Streptomyces hygroscopicus* encoding a phosphinothricin acetyl transferase (PAT) (CR-Sh.bar); operably linked to a 3' untranslated region from the nopaline synthase (NOS) gene (which directs polyadenylation of mRNA) from *Agrobacterium tumefaciens* (T-AGRtu.nos).

25 The MON 88701 event was selected from among approximately 151 individual transgenic events based on its superior combination of phenotypic characteristics (including commercial level tolerance to both dicamba and glufosinate herbicides), molecular characteristics (determined using a comprehensive molecular profile analysis), and haplotype association. Selection of the MON 88701 event from
 30 among the original 151 transgenic events was a multi-year process requiring data analysis at each step. Two waves of transformation events were processed to allow for a larger number of events from which to choose the final commercial event. Table 1 provides a summary of each type of analysis with the number of events selected and

advanced for each step of event screening. The Puerto Rico field trial efficacy screen for Wave 2 preceded the first U.S. field trial.

Table 1

Event Screening Analysis Step	Wave 1	Wave 2
R0 - Transformation Quality Analysis	48	103
R0 - Herbicide Efficacy Analysis	26	57
R1 - Agronomic Seed Production	9	26
R1 - Herbicide Efficacy Analysis	9	23
First U.S. Field Trial	8	10
Preliminary Molecular Analysis	4	19
Puerto Rico Field Trial Efficacy Screen	3	17
Second U.S. Field Trial	2	n/d
Detailed Molecular Analysis	1	6

The original 151 transgenic R0 events were analyzed using a combination of analytical techniques (Transformation Quality Analysis including TaqMan and/or PCR analysis) and R0 Herbicide Efficacy Analysis (herbicide spray). Selected R0 event containing plants were then self-fertilized to produce R1 seed, and 32 of the events were then advanced for R1 Herbicide Efficacy Analysis.

Detailed molecular analysis was completed on events passing agronomic and efficacy field trials. Northern blots were used to confirm that the *dmo* and *bar* messenger RNA transcripts were present in samples prepared from seed of the tested events. Western blot analysis was done to confirm that a single DMO and PAT protein band was present in samples prepared from leaf tissue of the tested events. N-terminal sequencing of the isolated, purified PAT protein showed the expected amino acid sequence at the N-terminus of the PAT protein. N-terminal sequencing of the isolated, purified DMO protein showed 9 amino acids from the CTP (TS-CTP2) present at the N-terminus of the DMO protein.

Agronomic field testing consisted of planting paired positive isoline and negative isoline events (containing the transgene cassette and lacking the transgene cassette, respectively) side-by-side with two rows of wild type (non-transgenic) Coker 130 per plot. The plots were maintained weed and insect free using conventional

control programs for the duration of the trial. Data collected included planting date, stand counts, plant height, node number, gross agronomic/phenotypic differences, boll samples, harvest date, and yield. Stand counts for each plot were taken at 10 days after planting (DAP) and again at 20 DAP. Cotyledons that had completely cleared the soil were considered “emerged”. Any differences noted in plant density, *i.e.* skips, poor germination, loss due to crusting, washouts, *etc.*, were noted. Final stands had 10 plants per meter on average. Plant height measurements were taken at first flower plus two weeks (FF2). Average measurements of plant height (cm) of five plants per plot were recorded. On the same plants used for plant height measurements, the number of nodes were counted (cotyledon is node 0). Any gross agronomic differences were recorded, such as leaf morphology, branching habit, leaf color, time to flowering, fruiting pattern, *etc.* Boll samples were randomly harvested from 50 first position bolls (seedcotton only) from the middle of the plants (notes 8-12). The boll samples were used to calculate lint fraction and fiber quality. For yield determinations, plots were defoliated and a boll opener (with ethephon, *i.e.* PREP) was used prior to harvest. Plots were harvested and recorded as pounds per plot of seedcotton and expressed as pounds per acre of seedcotton. There was no significant yield difference between positive isoline events, the paired negative isoline events, and wild-type Coker 130 cotton for two years of agronomic field trials (Figure 2).

In year 1, efficacy testing was conducted with eight events compared to non-transgenic, wild-type Coker 130. For this testing, paired plots were sprayed with dicamba (Clarity®, BASF, Research Triangle Park, NC) and glufosinate (Ignite®, Bayer CropScience, Research Triangle Park, NC) or left unsprayed. The plots were maintained weed- and insect-free using conventional control programs for the duration of the trial. All herbicide treatments are represented as pounds of active ingredient per acre (lb/A). For plots that were sprayed, the following applications were conducted: dicamba was applied preemergence at 1 lb/A followed by glufosinate applied 1.09 lb/A at the 2 node stage, followed by dicamba applied at 1 lb/A at the 5 node stage, followed by glufosinate applied 1.09 lb/A at the 8 node stage, followed by dicamba applied at 1 lb/A at the 12 node stage. Neither dicamba nor glufosinate were applied with surfactants, fertilizer additive, or other adjuvant. Injury ratings were taken at the following stages, which were immediately prior to the next assigned herbicide application: at the 2-node cotton stage, rating activity was taken for percent epinasty (dicamba damage) and percent total injury, with focus on

epinasty; at the 5-node stage, rating activity was taken for percent epinasty, percent burn or necrosis (glufosinate injury) and percent total injury, with focus on necrosis; at the 8-node stage, rating activity was taken for percent epinasty, percent burn or necrosis, and percent total injury, with focus on epinasty; at the 12-node stage, rating activity was taken for percent epinasty, percent burn or necrosis and percent total injury, with focus on necrosis; at mid-bloom stage, rating activity was taken for percent epinasty, percent burn or necrosis and percent total injury, with focus on epinasty; and for late bloom stage, rating activity was taken for percent epinasty, percent burn or necrosis and percent total injury. Additional agronomic data were collected in these efficacy field trials including: planting date, stand counts (taken at 7 and 14 DAP), gross agronomic/phenotypic differences, harvest date, and yield. Injury ratings used standard weed science percent scales where 0% equals no crop injury and 100% equals complete crop death. Ratings made for dicamba injury are referred to as epinasty and appears as twisting, growth malformation. Ratings made for glufosinate injury are referred to as burn or necrosis and appears as chlorosis and or necrosis. For yield determinations, plots were defoliated and a boll opener (with ethephon, *i.e.* PREP) was used prior to harvest. Plots were harvested and yield recorded as lbs/plot of seed cotton and expressed as lb/acre of seed cotton. Agronomic/phenotypic differences were noted in fruiting profile as normal or as unusual. There was no significant difference in yield of seed cotton between paired sprayed and unsprayed events compared to unsprayed wild-type Coker 130 (Figure 3). The wild-type Coker 130 did not survive the spray regimen (Figure 7).

In year 2, efficacy testing was conducted with twelve events compared to non-transgenic, wild-type Coker 130. For this testing, paired plots were either sprayed or not sprayed. The plots were maintained weed- and insect-free using conventional control programs for the duration of the trial. For the plots that were sprayed, the following treatment applications were conducted (1) 0.5 lb/A dicamba applied PRE, Early POST, Mid POST and Late POST; (2) 1 lb/A dicamba applied PRE, Early POST, Mid POST and Late POST; (3) 2 lb/A dicamba applied PRE, Early POST, Mid POST and Late POST; (4) 0.5 lb/A glufosinate applied Early POST, Mid POST and Late POST; (5) 1 lb/A glufosinate applied Early POST, Mid POST and Late POST; (6) 2 lb/A glufosinate applied Early POST, Mid POST and Late POST; and (7) Control (unsprayed). Preemergence (PRE) is defined as immediately after cotton planting (within 24 hours); Early POST as 2-node cotton; Mid POST as 8-node

cotton; and Late POST as 14 node cotton. For these efficacy field trials, there were three plots composed entirely of wild-type cotton (Coker 130). At each post-emergence timing (Early, Mid, Late), one-half of a plot was sprayed with the 1X rate (0.5 lb/A) of dicamba and one-half of the same plot was sprayed with the 1X rate (0.5 lb/A) of glufosinate. Each of the three plots received dicamba and glufosinate spray at one of the post-emergence timing spray applications (Early, Mid, Late).

The spray protocol consisted of the herbicides applied at 10 gallons per acre water volume using the following sprayer set up (which is within the standards used for most weed science research). XR TeeJet® extended range flat spray tips with an 80-degree spray angle were used (TeeJet Technologies, Wheaton, IL). There were 2 nozzles per row (nozzles spaced at 15" for 30" rows, 19" for 38" rows and 20" for 40" rows). Nozzle size depended on sprayer speed and nozzle spacing; however, nozzle size was selected to result in a spray pressure of 25 to 35 PSI. Boom height was adjusted to allow for 50% spray overlap (which occurs at roughly 30" above the top of the crop).

At each rating time, the following observations were recorded: 1) percent necrosis or burn on the most affected leaves; 2) percent necrosis or burn on a whole-plant basis; 3) epinasty; and 4) any other relevant injury that was observed. Ratings were taken four days after each application and immediately prior to subsequent applications. The rating schedule time and objective were as follows: 1) 4-7 days after emergence and again immediately before 2-node spray to check for preemergence effects of dicamba spray; 2) 4 days after the 2-node spray and again immediately before the 8-node spray to determine the rating of the 2-node spray; 3) 4 days after the 8-node spray and again immediately before the 14-node spray to determine the rating of the 8-node spray 4) 4 days after the 14-node spray and again 10 days after the 14-node spray to determine the rating of the 14-node spray; and 5) at cutout to determine the late season rating of the net effect of all sprays. Injury ratings used standard weed science percent scales where 0% equals no crop injury and 100% equals complete crop death. Ratings made for dicamba injury are referred to as epinasty and appears as twisting, growth malformation. Ratings made for glufosinate injury are referred to as burn or necrosis and appears as chlorosis and or necrosis. For yield determinations, plots were defoliated and a boll opener (with ethephon, *i.e.* PREP) was used prior to harvest. Plots were harvested and recorded as lbs/plot of seedcotton and expressed as lb/acre of seedcotton. Wild-type Coker 130 plants did

not survive herbicide spray and therefore no yield was recorded from Coker 130 plots. As seen in Figure 4.A, yield was nearly equivalent for plants comprising the MON 88701 event with increasing application rates of dicamba herbicide. As seen in Figure 4.B, yield was nearly equivalent for plants comprising the MON 88701 event with increasing application rates of glufosinate herbicide. For injury ratings, Figure 5.A shows increased percentage of injury to plants comprising the MON 88701 event with increasing application rates of dicamba. Figure 5.B shows increased percentage of injury to plants comprising the MON 88701 event with increasing application rates of glufosinate.

In year 3, efficacy field testing of event MON 88701 was conducted to study the rate and timing of application of dicamba and/or glufosinate. The plots were maintained weed- and insect-free using conventional control programs for the duration of the trial. The treatment and application timing are detailed in Table 2. Neither dicamba nor glufosinate were applied with surfactants, fertilizer additive or other adjuvant. The sprayer protocol was as described for year 2 efficacy field testing. Stand rating, visual injury rating (percent epinasty, percent necrosis), plant height and node number, 50-boll sampling, and yield determinations were as described for agronomic and efficacy field testing above.

Table 2

Treatment	Rate (lb ai/A)	Application timing			
		1 to 3 Node	5 to 7 node	10 to 12 node	15 to 18 node
1	0.5	Dicamba	Glufosinate	Dicamba	Glufosinate
2	1	Dicamba	Glufosinate	Dicamba	Glufosinate
3	0.5	Glufosinate	Dicamba	Glufosinate	Dicamba
4	1	Glufosinate	Dicamba	Glufosinate	Dicamba
5	0.25*	Tank Mix	Tank Mix	Tank Mix	Tank Mix
6	0.5*	Tank Mix	Tank Mix	Tank Mix	Tank Mix
7	1*	Tank Mix	Tank Mix	Tank Mix	Tank Mix
8	0.5	Dicamba	Dicamba	Dicamba	Dicamba
9	1	Dicamba	Dicamba	Dicamba	Dicamba
10	0.5	Glufosinate	Glufosinate	Glufosinate	Glufosinate
11	1	Glufosinate	Glufosinate	Glufosinate	Glufosinate

12	-	Control	-	-	-
*With tank mixes, the rate is what was used for the individual herbicides: 0.25 = 0.25 lb/A dicamba + 0.25 lb /A glufosinate					

There was a slight yield drag when dicamba and glufosinate were tank mixed and applied at four times in season at 1 lb/acre each (Figure 6). For all other treatment regimens, there was no yield loss to plants comprising the MON 88701 event when sprayed with dicamba, glufosinate, or dicamba and glufosinate (Figure 6).

5

Example 2: Characterization of MON 88701 DNA sequences

This example describes the molecular characterization of the MON 88701 event. The DNA inserted into the genome of cotton plants comprising MON 88701 and the genomic sequence flanking this insertion were characterized by detailed molecular analyses. These analyses included: the insert sequence, the insert number (number of integration sites within the cotton genome), the copy number (number of copies of transgene DNA within one locus), the integrity of the inserted gene cassette, the flanking sequences, and the association of the insertion with haplotype regions of the cotton genome.

Molecular DNA probes were used that included the intact coding region and its respective regulatory elements, the promoters, introns, and polyadenylation sequences of the plant expression cassettes. The analysis showed that MON 88701 contains a single transgene DNA insertion with one copy of the expression cassette. Inverse PCR and DNA sequence analyses were performed to determine the 5' and 3' insert-to-plant genome junctions, confirm the organization of the elements within the insert (Figure 1), and determine the complete DNA sequence of the insert in cotton plants comprising event MON 88701 (provided herein as SEQ ID NO: 9). A cotton plant that comprises in its genome the linked transgene genetic elements shown in Figure 1 and is resistant to dicamba and glufosinate herbicides is an aspect of the invention.

Sequences flanking the transgene DNA insertion in MON 88701 were determined using inverse PCR as described in Ochman *et al.*, 1990 (PCR Protocols: A guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc.) and/or genome walker techniques. Plant genomic DNA was isolated from both Coker 130 and the transgenic cotton lines from tissue grown under standard greenhouse conditions. Approximately

0.2 gram of young leaf tissue was lyophilized and powdered via the addition of several small steel beads followed by vigorous agitation. Tissue was washed twice with 5 mL of 100% methanol followed by one wash with 5 mL of 50% methanol to remove interfering phenolic compounds. DNA was extracted by the addition of 7 mL of CTAB extraction buffer (100 mM Tris pH 8.0, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2 % w/v hexadecyltrimethylammonium bromide, 1 % w/v polyvinylpyrrolidone, 1% w/v poly(vinylpolypyrrolidone), 0.07% beta-mercaptoethanol, 1 mM DTT). Samples were incubated at 65°C for 45 min to fully lyse cells then, spun for 5 min at 3000g to remove insoluble debris. The supernatant was extracted with 7 mL of chloroform isoamyl alcohol 24:1, spun at 3000 g for 5 min to separate phases, and DNA was extracted from the aqueous phase in a fresh tube by the addition of 6 mL of isopropanol. DNA pellets were washed with 6 mL of 70% ethanol to remove any salts, and pellets were allowed to air dry. The DNA pellets were resuspended in 10 mM Tris pH 8.0 containing 0.5 ug/mL DNase-free RNase and incubated at 37°C 1 hour. Following treatment, DNA was quantified using Quant-iT™ PicoGreen® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). This method can be modified by one skilled in the art to extract DNA from any tissue of cotton. An aliquot of DNA was digested with restriction endonucleases selected based upon restriction analysis of the transgene DNA. After self-ligation of restriction fragments, PCR was performed using primers designed from the transgene DNA sequence that would amplify sequences extending away from the 5' and 3' ends of the transgene DNA. PCR products were separated by agarose gel electrophoresis and purified using a QIAGEN gel purification kit (Qiagen, Valencia, CA). The subsequent DNA products were sequenced directly using standard DNA sequencing protocols. The 5' flanking sequence which extends into the right border sequence of the expression cassette transgene DNA is presented as SEQ ID NO: 7 ([C], see Figure 1). The 3' flanking sequence which extends into the left border sequence of the expression cassette transgene DNA is presented as SEQ ID NO: 8 ([D], see Figure 1). The portion of the expression cassette DNA that was fully integrated into the Coker genomic DNA is presented as SEQ ID NO: 9 ([E], see Figure 1).

Isolated DNA molecule sequences were compared to the transgene DNA sequence to identify the flanking sequence and the co-isolated transgene DNA fragment. Confirmation of the presence of the expression cassette was achieved by

PCR with primers designed based upon the deduced flanking sequence data and the known transgene DNA sequence. The wild-type sequence corresponding to the same region in which the transgene DNA was integrated in the transformed line was isolated using primers designed from the flanking sequences in MON 88701. The

5 PCR reactions were performed using the Phusion® High –Fidelity PCR Master Mix with HF Buffer (New England Biolabs, Ipswich, MA). The flanking DNA sequences in MON 88701 and the Coker wild-type sequence were analyzed against multiple nucleotide and protein databases. This information was used to examine the relationship of the transgene to the plant genome and to look for the insertion site

10 integrity. The flanking sequence and wild-type sequences were used to design primers for TAQMAN® endpoint assays used to identify the events. Zygosity assays were developed using this information.

The dicamba and glufosinate tolerance transgene cassette was mapped in cotton plants comprising event MON 88701 on chromosome A08 at the map position

15 of 19.3 cM and bordered by NG0207927 at the map position of 18.6 cM on left and by NG0207529 at the map position of 20.0 cM on right.

Example 3: Event specific endpoint TAQMAN® assays

This example describes an event specific endpoint TAQMAN® thermal

20 amplification method developed to identify event MON 88701 in a sample. Examples of conditions useful with the event MON 88701 Specific Endpoint TAQMAN® method are as follows: Step 1: 18 megohm water adjusted for final volume of 10 µl. Step 2: 5.0 µl of 2X Universal Master Mix (dNTPs, enzyme, buffer) to a 1X final concentration. Step 3: 0.5 µl Event Primer-1 (SQ21654) and

25 Event Primer-2 (SQ23205). Mix (resuspended in 18 megohm water to a concentration of 20 µM for each primer) to 1.0 µM final concentration (for example in a microcentrifuge tube, the following should be added to achieve 500 µl at a final concentration of 20 µM: 100 µl of Primer SQ21654 at a concentration of 100 µM; 100 µl of Primer SQ23205 at a concentration of 100 µM; 300 µl of 18 megohm

30 water). Step 4: 0.2 µl Event 6-FAM™ MGB Probe PB10280 (resuspended in 18 megohm water to a concentration of 10 µM to 0.2 µM final concentration. Step 5: 0.5 µl Internal Control Primer-1 and Internal Control Primer-2 Mix (resuspended in 18 megohm water to a concentration of 20 µM for each primer) to 1.0 µM final concentration. Step 6: 0.2 µl Internal Control VIC™ Probe to 0.2 µM final

concentration (resuspended in 18 megohm water to a concentration of 10 μ M) Step 7: 3.0 μ l Extracted DNA (template) for each sample with one each of the following comprising 1. Leaf Samples to be analyzed; 2. Negative control (non-transgenic DNA); 3. Negative water control (no template); 4. Positive control MON 88701 DNA. Step 8: Thermocycler Conditions as follows: One Cycle at 50°C for 2 minutes; One Cycle at 95°C for 10 minutes; Ten Cycles of 95°C for 15 seconds then 64°C for 1 minute with -1°C/cycle; Thirty Cycles of 95°C for 15 seconds then 54°C 1 minute, optional additional 10 to 20 cycles (95°C for 15 seconds then 64°C for 1 minute (-1°C/cycle) may provide more distinct population separation during EndPoint TaqMan[®] analysis; final cycle of 10°C.

The DNA primers used in the endpoint assay are primers SQ21654 (SEQ ID NO: 11), SQ23205 (SEQ ID NO: 12), and 6-FAM[™] labeled probe PB10280 (SEQ ID NO: 13). 6-FAM[™] is a fluorescent dye product of Applied Biosystems (Foster City, CA) attached to the DNA probe. For TAQMAN[®] MGB[™] probes, the 5' exonuclease activity of Taq DNA polymerase cleaves the probe from the 5'-end, between the fluorophore and quencher. When hybridized to the target DNA strand, quencher and fluorophore are separated enough to produce a fluorescent signal, thus releasing fluorescence. SQ21654 (SEQ ID NO: 11) and SQ23205 (SEQ ID NO: 12) when used with these reaction methods with PB10280 (SEQ ID NO: 13) produce a DNA amplicon that is diagnostic for event MON 88701 DNA. The controls for this analysis should include a positive control from cotton containing event MON 88701 DNA, a negative control from non-transgenic cotton, and a negative control that contains no template DNA. Additionally, a control for the PCR reaction includes Internal Control Primers and an Internal Control Probe, specific to a single copy gene in the *Gossypium* genome. One of skill in the art will know how to design primers specific to a single copy gene in the *Gossypium* genome. These assays are optimized for use with either an Applied Biosystems GeneAmp[®] PCR System 9700 (run at maximum speed) or MJ Research DNA Engine PTC-225 thermal cycler. Other methods and apparatus known to those skilled in the art that produce amplicons that identify the event MON 88701 DNA is within the skill of the art.

R0 plants demonstrating the presence of the expression cassette were allowed to develop into fully mature plants and seed was harvested from these. Probes based on the sequence of the expression cassette were used to determine copy number of the

transgenic expression cassette in the R1 plants using a combination of Southern analysis and endpoint TAQMAN®.

A zygosity assay is useful for determining if a plant comprising an event is homozygous for the event DNA; that is comprising the exogenous DNA in the same
5 location on each chromosome of a chromosomal pair; or heterozygous for an event DNA, that is comprising the exogenous DNA on only one chromosome of a chromosomal pair; or is null for the event DNA, that is wildtype. The endpoint TAQMAN® thermal amplification method was also used to develop zygosity assays for event MON 88701. This example describes an event-specific endpoint
10 TAQMAN® thermal amplification method developed to determine the zygosity of event MON 88701 in a sample. For this assay, a three primer assay was employed wherein primer SQ21654 hybridizes and extends specifically from the 3' junction of the inserted exogenous DNA and genomic DNA, primer SQ23205 hybridizes and extends specifically from the DNA flanking the 3' side of the inserted exogenous
15 DNA, and primer SQ23901 hybridizes and extends specifically from genomic DNA into which was integrated the inserted exogenous DNA. The three primers are diagnostic for the event. In this example, primer SQ21654 and primer SQ23205 and the 6-FAM™-labeled oligonucleotide probe PB10280 are diagnostic when there is a copy of the inserted exogenous DNA. In this example, SQ23205 and primer
20 SQ23901 and the VIC™-labeled oligonucleotide probe PB10631 are diagnostic when there is no copy of the inserted exogenous DNA present in the genomic DNA, *i.e.* wild-type. When the three primers and two probes are mixed together in a PCR reaction with DNA extracted from a plant homozygous for event MON 88701, there is a fluorescent signal only from 6-FAM™-labeled oligonucleotide probe PB10280
25 which is indicative of and diagnostic for a plant homozygous for event MON 88701. When the three primers and two probes are mixed together in a PCR reaction with DNA extracted from a plant heterozygous for event MON 88701, there is a fluorescent signal from both the 6-FAM™-labeled oligonucleotide probe PB10280 and the VIC™-labeled oligonucleotide probe PB10631 which is indicative of and
30 diagnostic for a plant heterozygous for event MON 88701. When the three primers and two probes are mixed together in a PCR reaction with DNA extracted from a plant which is null for event MON 88701 (*i.e.* wildtype), there is a fluorescent signal from only the VIC™-labeled oligonucleotide probe PB10631 which is indicative of and diagnostic for a plant null for event MON 88701, *i.e.* wild-type. Examples of

conditions useful with this method are as follows. Step 1: 18 megohm water adjusted for final volume of 10 µl. Step 2: 5.0 µl of 2X Universal Master Mix (Applied Biosystems cat # 4304437; dNTPs, enzyme, buffer) to a 1X final concentration. Step 3: 0.5 µl of Zygotity Primers SQ21654; SQ23205 and SQ23901(resuspended in 18 megohm water to a concentration of 20 µM for each primer) to a final concentration of 1.0 µM. Step 4: 0.2 µl 6-FAM™ Probe PB10280 (resuspended in 18 megohm water to a concentration of 10 µM) to 0.2 µM final concentration. Step 5: 0.2 µl VIC™ Probe PB10631 (resuspended in 18 megohm water to a concentration of 10 µM) to 0.2 µM final concentration. Step 6: 3.0 µl Extracted DNA (template) for each sample with one each of the following comprising 1. Leaf Samples to be analyzed (4-5 ng/ul of genomic DNA diluted in water); 2. Negative control (non-transgenic cotton DNA; 5 ng/ul diluted in water); 3. Negative water control (no template; solution in which DNA was resuspended); 4. Positive control MON 88701 genomic DNA from known heterozygous sample (5 ng/ul diluted in water); 5. 4. Positive control MON 88701 genomic DNA from known homozygous sample (5 ng/ul diluted in water). Step 7: Gently mix. Step 8: Thermocycler Conditions when using Applied Biosystems GeneAmp® PCR System 9700 (run at maximum speed) or MJ Research DNA Engine PTC-225 thermal cycler are as follows: One Cycle at 50°C for 2 minutes; one cycle at 95°C for 10 minutes; Ten Cycles of (95°C for 15 seconds then 64°C for 1 minute (-1°C/cycle); Thirty Cycles of (95°C for 15 seconds then 54°C for 1 minute); Optional additional 10 to 20 cycles (95°C for 15 seconds then 64°C for 1 minute (-1°C/cycle) may provide more distinct population separation during EndPoint TaqMan® analysis; One cycle at 10°C hold.

25 **Example 4: Identification of event MON 88701 in any cotton breeding activity**

This example describes how one may identify the MON 88701 event within progeny of any cotton breeding activity. DNA event primer pairs are used to produce an amplicon diagnostic for cotton event MON 88701. An amplicon diagnostic for MON 88701 comprises at least one of the sequences provided as SEQ ID NO: 1-10. Event primer pairs that will produce a diagnostic amplicon for MON 88701 include primer pairs based upon the flanking sequences and the inserted expression cassette. For example, to produce a diagnostic amplicon in which SEQ ID NO: 1 is found, one would design a forward primer based upon the genomic flanking sequence portion of SEQ ID NO: 7 and a reverse primer based upon the inserted expression cassette DNA

sequence with the primers of sufficient length of contiguous nucleotides to specifically hybridize to the event DNA. To produce a diagnostic amplicon in which SEQ ID NO: 2 is found, one would design a forward primer based upon the inserted expression cassette DNA sequence and a reverse primer based upon the genomic flanking sequence portion of SEQ ID NO: 8 with the primers of sufficient length of contiguous nucleotides to specifically hybridize to the event DNA. For practical purposes, one should design primers which produce amplicons of a limited size range, for example, between 100 to 1000 bases. Smaller (shorter polynucleotide length) sized amplicons in general are more reliably produced in PCR reactions, allow for shorter cycle times, and can be easily separated and visualized on agarose gels or adapted for use in endpoint TAQMAN®-like assays. Smaller amplicons can be produced and detected by methods known in the art of DNA amplicon detection. In addition, amplicons produced using the primer pairs can be cloned into vectors, propagated, isolated, and sequenced or can be sequenced directly with methods well established in the art. Any primer pair that is useful in a DNA amplification method to produce an amplicon diagnostic for MON 88701 or plants comprising MONS 88701 or progeny thereof is an aspect of the invention. An example of the amplification conditions for this analysis is illustrated in Example 3.

An analysis for event MON 88701 containing plant tissue sample should include a positive tissue control from a plant comprising event MON 88701, a negative control from a cotton plant that does not contain event MON 88701 (for example, but not limited to Coker), and a negative control that contains no cotton genomic DNA. A primer pair that will amplify an endogenous cotton DNA molecule will serve as an internal control for the DNA amplification conditions. Additional primer sequences can be selected from SEQ ID NO: 10 by those skilled in the art of DNA amplification methods, and conditions selected for the production of an amplicon by the methods shown in Example 3 may differ, but result in an amplicon diagnostic for event MON 88701 DNA. DNA detection kits contain at least one DNA primer of sufficient length of contiguous nucleotides derived from SEQ ID NO: 10, that when used in a DNA amplification method produces a diagnostic amplicon for MON 88701 is an aspect of the invention.

A deposit of a representative sample of cotton seed comprising event MON 88701 has been made according to the Budapest Treaty with the American Type Culture Collection (ATCC) having an address at 10801 University Boulevard,

Manassas, Virginia USA, Zip Code 20110. The ATCC Patent Deposit Designation (accession number) for seeds comprising event MON 88701 is PTA-11754 and the date of deposit was March 17, 2011. Access to the deposits will be available during the pendency of the application to the Commissioner of Patents and Trademarks and
5 persons determined by the Commissioner to be entitled thereto upon request. The deposit will be maintained in the depository for a period of 30 years, or 5 years after the last request, or for the effective life of the patent, whichever is longer, and will be replaced as necessary during that period.

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

CLAIMS

Claim 1. A recombinant DNA molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 1-10, and complements thereof.

Claim 2. The recombinant DNA molecule of claim 1 formed by the insertion of a heterologous nucleic acid molecule into the genomic DNA of a cotton plant or cell.

Claim 3. The recombinant DNA molecule of claim 1, wherein said DNA molecule is derived from a transgenic cotton plant comprising event MON 88701, a representative sample of seed comprising cotton event MON 88701 having been deposited under ATCC Accession No. PTA-11754.

Claim 4. The recombinant DNA molecule of claim 1, wherein said DNA molecule is in a cotton plant, plant cell, seed, plant part, or commodity product.

Claim 5. The recombinant DNA molecule of claim 1, wherein said DNA molecule is an amplicon diagnostic for the presence of DNA derived from event MON 88701.

Claim 6. A DNA probe comprising a nucleotide sequence of sufficient length of contiguous nucleotides of SEQ ID NO: 10, or a complement thereof, to function as a DNA probe that hybridizes under stringent hybridization conditions with a DNA molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 1-10 and does not hybridize under the stringent hybridization conditions with a DNA molecule not comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 1-10.

Claim 7. A pair of DNA molecules comprising a first DNA molecule and a second DNA molecule different from the first DNA molecule, wherein said first and second DNA molecules each comprise a nucleotide sequence of sufficient length of contiguous nucleotides of SEQ ID NO: 10, or a complement thereof, to function as DNA primers when used together in an amplification reaction with DNA derived from event MON 88701 to produce an amplicon diagnostic for cotton event MON 88701 DNA in a sample.

Claim 8. A method of detecting the presence of a DNA molecule derived from a cotton plant comprising event MON 88701 in a sample, said method comprising:

- a) contacting said sample with the DNA probe of claim 6;
- b) subjecting said sample and said DNA probe to stringent hybridization conditions; and

- c) detecting hybridization of said DNA probe to a DNA molecule in said sample, wherein the hybridization of said DNA probe to said DNA molecule indicates the presence of a DNA molecule derived from cotton event MON 88701 in said sample.

Claim 9. A method of detecting the presence of a DNA molecule derived from a cotton plant comprising event MON 88701 in a sample, said method comprising:

- a) contacting said sample with the pair of DNA molecules of claim 7;
- b) performing an amplification reaction sufficient to produce a DNA amplicon comprising a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 1-10, and complements thereof; and
- c) detecting the presence of said DNA amplicon in said reaction, wherein the presence of said DNA amplicon in said reaction indicates the presence of a DNA molecule derived from a cotton plant comprising event MON 88701 in said sample.

Claim 10. A DNA detection kit comprising at least one DNA molecule comprising a nucleotide sequence of sufficient length of contiguous nucleotides of SEQ ID NO: 10, and complements thereof, to function as a DNA primer or probe specific for detecting the presence of DNA derived from a cotton plant comprising event MON 88701, wherein detection of said DNA is diagnostic for the presence of event MON 88701 DNA in a sample.

Claim 11. A recombinant cotton plant, seed, cell, or plant part thereof comprising the recombinant DNA molecule of claim 1.

Claim 12. The recombinant cotton plant, seed, cell, or plant part thereof of claim 11, wherein said plant, seed, cell, or plant part thereof is tolerant to treatment with dicamba and glufosinate herbicides.

Claim 13. The recombinant cotton plant, seed, cell, or plant part thereof of claim 11, the genome of which produces an amplicon comprising a DNA molecule selected from the group consisting of SEQ ID NO: 1-10, and complements thereof, when tested in a DNA amplification method.

Claim 14. A cotton plant, seed, cell or part thereof comprising event MON 88701, a representative sample of seed comprising event MON 88701 having been deposited under ATCC Accession No. PTA-11754.

Claim 15. The cotton plant, seed, cell or part thereof of claim 14, wherein said cotton plant or seed is a hybrid having at least one parent comprising cotton event MON 88701.

Claim 16. A nonliving plant material comprising the recombinant DNA molecule of claim 1.

Claim 17. A microorganism comprising the recombinant DNA molecule of claim 1.

Claim 18. The microorganism of claim 17, wherein said microorganism is a plant cell.

Claim 19. A commodity product comprising the recombinant DNA molecule of claim 1.

Claim 20. A method for controlling weeds in a field comprising planting cotton plants comprising event MON 88701 in a field and applying an effective dose of dicamba or glufosinate or dicamba and glufosinate herbicide to control weeds in said field without injuring said cotton plants comprising event MON 88701.

Claim 21. The method of claim 20, wherein said effective dose of dicamba herbicide is a total of about 0.005 pounds per acre to about 16 pounds per acre of dicamba herbicide over a growing season.

Claim 22. The method of claim 20, wherein said effective dose of dicamba herbicide is a total of about 0.5 pounds per acre to about 2 pounds per acre of dicamba herbicide over a growing season.

Claim 23. The method of claim 20, wherein said effective dose of glufosinate herbicide is a total of about 0.005 pounds per acre to about 16 pounds per acre of glufosinate herbicide over a growing season.

Claim 24. The method of claim 20, wherein said effective dose of glufosinate herbicide is a total of about 0.5 pounds per acre to about 1.59 pounds per acre of glufosinate herbicide over a growing season.

Claim 25. A method for controlling weeds in a field comprising applying an effective dose of dicamba or glufosinate or dicamba and glufosinate herbicide to control weeds in a field and then planting cotton plants comprising event MON 88701 in said field.

Claim 26. The method of claim 25, wherein said effective dose of dicamba herbicide is from about 0.005 pounds to about 16 pounds per acre and said planting

cotton plants comprising event MON 88701 is within 14 days of said applying the effective dose of dicamba herbicide.

Claim 27. A method for producing cotton seed or lint essentially free of weed seeds, said method comprising:

- a) planting seeds comprising cotton event MON 88701 in a field;
- b) applying an effective dose of a dicamba or glufosinate or dicamba and glufosinate herbicide to said field to kill weeds in said field without injuring cotton plants comprising event MON 88701; and
- c) harvesting cotton seed or lint from said field.

Claim 28. A method of producing a cotton plant that tolerates application of dicamba and glufosinate herbicide comprising:

- a) sexually crossing a transgenic cotton plant comprising event MON 88701 comprising a nucleotide molecule having a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 1-8, and complements thereof, with a second cotton plant;
- b) collecting the seed produced from said cross;
- c) growing said seed to produce a plurality of progeny plants;
- d) treating said plurality of progeny plants with dicamba or glufosinate or dicamba and glufosinate; and
- e) selecting a progeny plant that is tolerant to dicamba and glufosinate.

Claim 29. A method of producing a cotton plant that tolerates application of dicamba and glufosinate herbicide comprising:

- a) selfing a transgenic cotton plant comprising event MON 88701 comprising a nucleotide molecule having a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 1-8, and complements thereof;
- b) collecting the seed produced from said selfing;
- c) growing said seed to produce a plurality of progeny plants;
- d) treating said plurality of progeny plants with dicamba or glufosinate or dicamba and glufosinate; and
- e) selecting a progeny plant that is tolerant to dicamba and glufosinate.

Claim 30. A method of determining the zygosity of a cotton plant or seed comprising event MON 88701 comprising:

- a) contacting a sample comprising cotton DNA with a primer set and a probe set that

- i) when used together in a nucleic acid amplification reaction with event MON 88701 DNA, produces a first amplicon that is diagnostic for event MON 88701; and
- ii) when used together in a nucleic acid amplification reaction with cotton genomic DNA other than event MON 88701 DNA, produces a second amplicon that is diagnostic native cotton genomic DNA other than event MON 88701;
- b) performing a nucleic acid amplification reaction with said sample, primer set, and probe set;
- c) detecting in said nucleic acid amplification reaction a first fluorescent signal that is diagnostic for event MON 88701 and a second fluorescent signal different from said first fluorescent signal and diagnostic for native cotton genomic DNA corresponding to the location of insertion of the event MON 88701 transgene; and
- d) analyzing the presence or absence of said first fluorescent signal and said second fluorescent signal in said nucleic acid amplification reaction, wherein the presence of both fluorescent signals indicates said sample is heterozygous for event MON 88701 and the presence of only said first fluorescent signal indicates said sample is homozygous for event MON 88701.

Claim 31. The method of claim 30, wherein the primer set comprises SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 and SEQ ID NO: 14.

Claim 32. The method of claim 30, wherein the probe set comprises SEQ ID NO: 13 and SEQ ID NO: 15.

Claim 33. A cotton haplotype region comprising event MON 88701 and mapped on chromosome A08 at the map position of 19.3 cM and bordered by NG0207927 at the map position of 18.6 cM on left and by NG0207529 at the map position of 20.0 cM on right.

Dicamba-Glufosinate Tolerant Cotton Event MON 88701

[F] SEQ ID NO: 10



[C] SEQ ID NO: 7

[A] SEQ ID NO: 1
[A'] SEQ ID NO: 3
[A''] SEQ ID NO: 5

[E] SEQ ID NO: 9

[D] SEQ ID NO: 8

[B] SEQ ID NO: 2
[B'] SEQ ID NO: 4
[B''] SEQ ID NO: 6

SQ21654

SQ23205

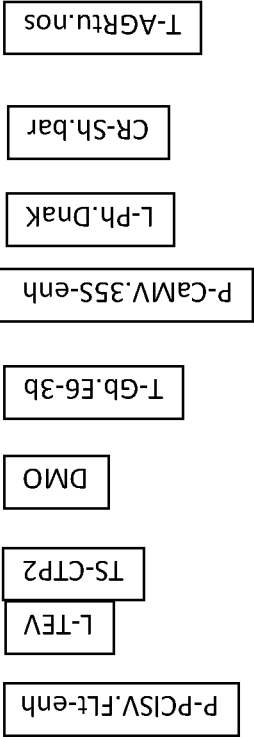


Figure 1

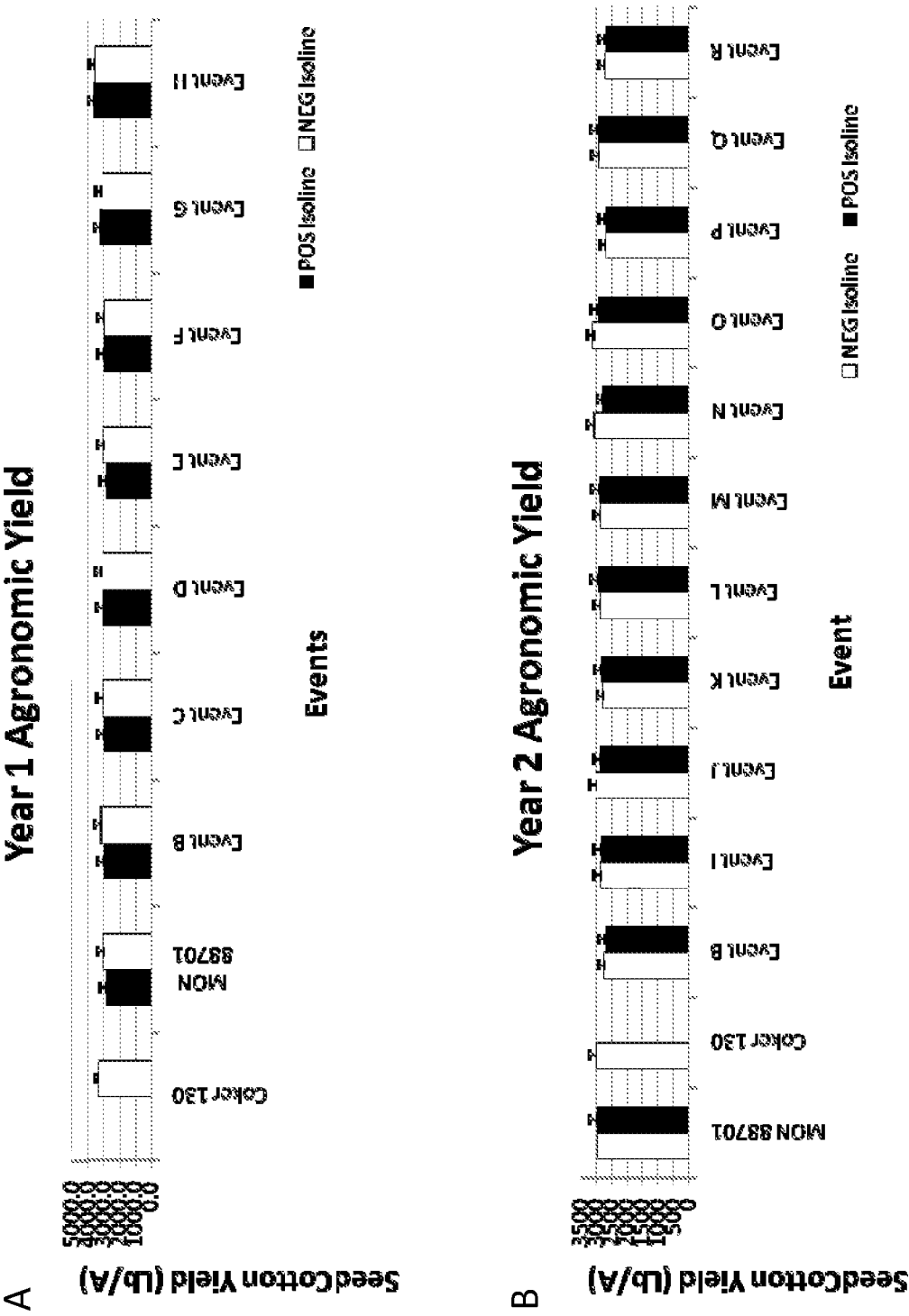


Figure 2

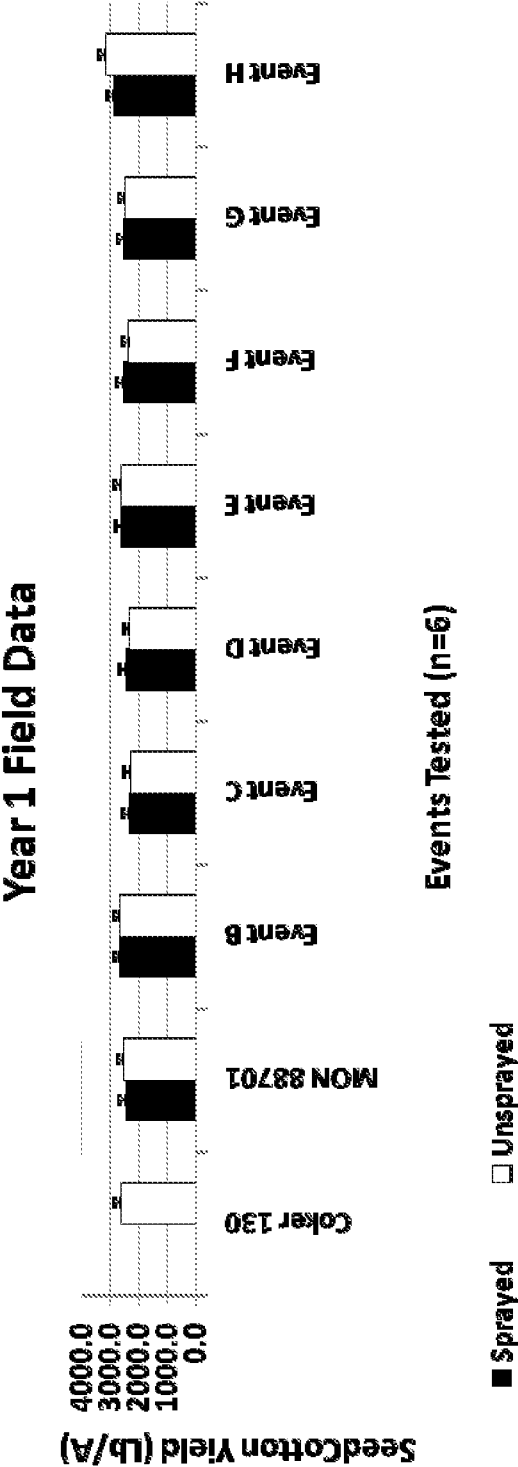


Figure 3

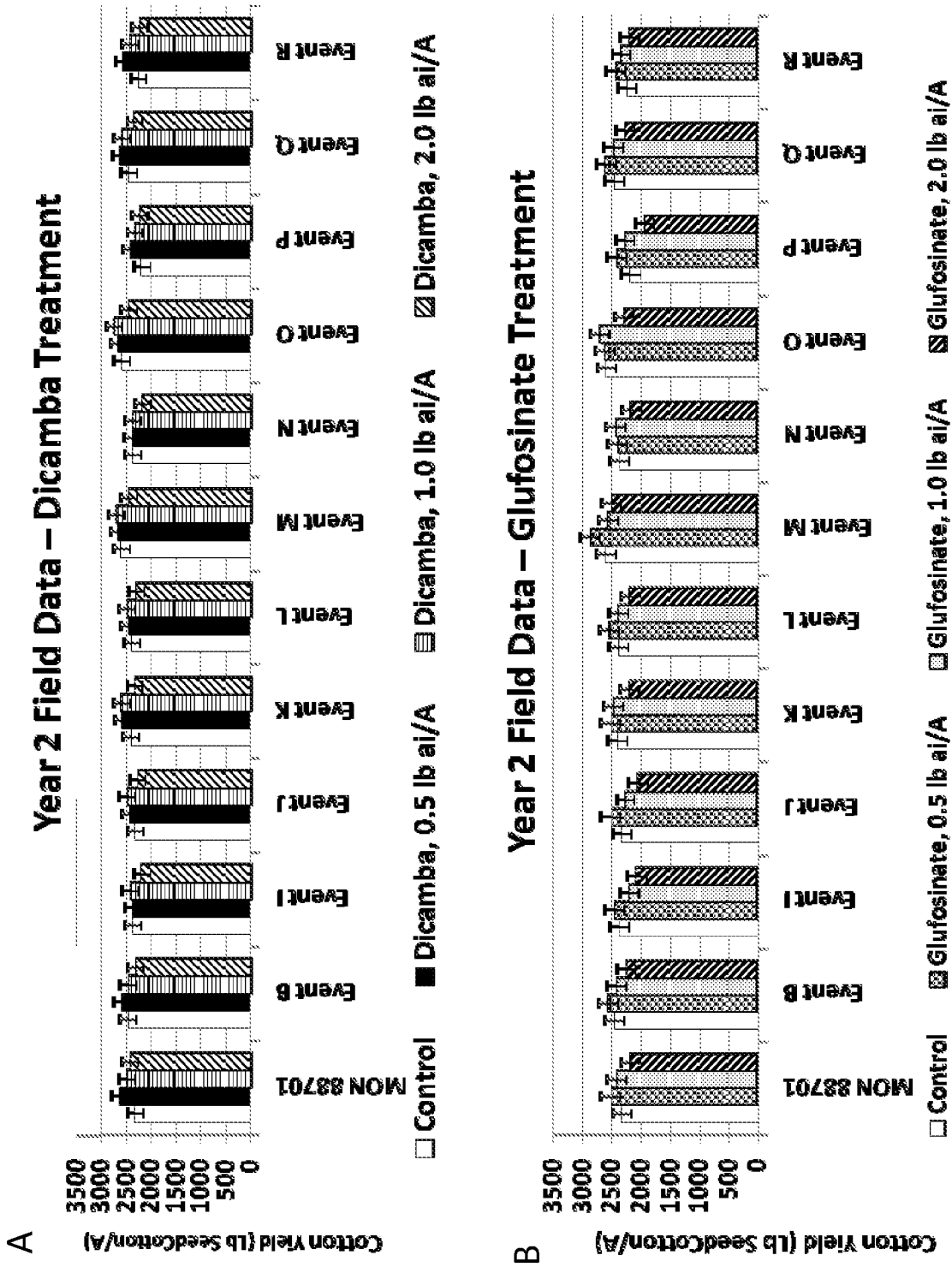


Figure 4

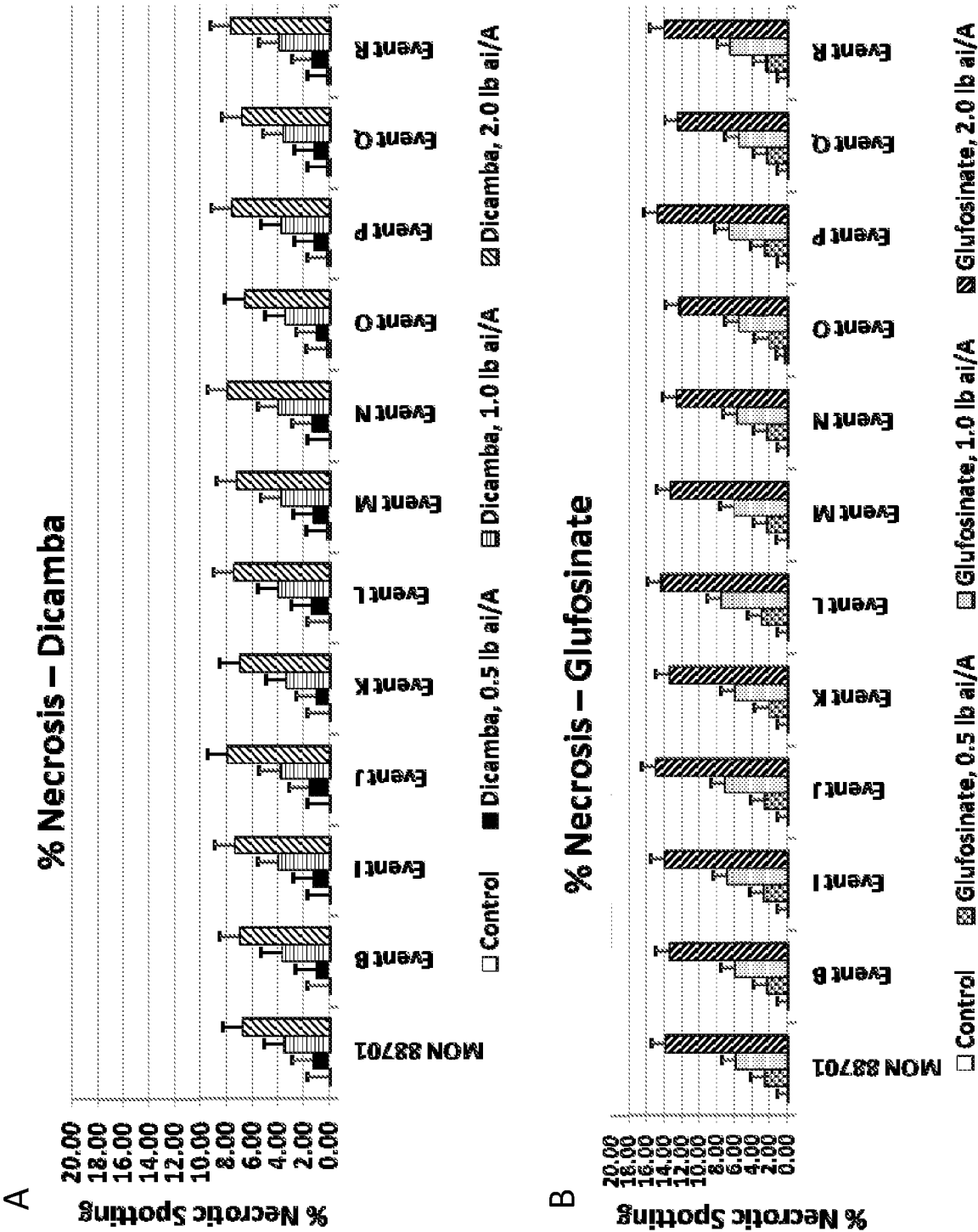


Figure 5

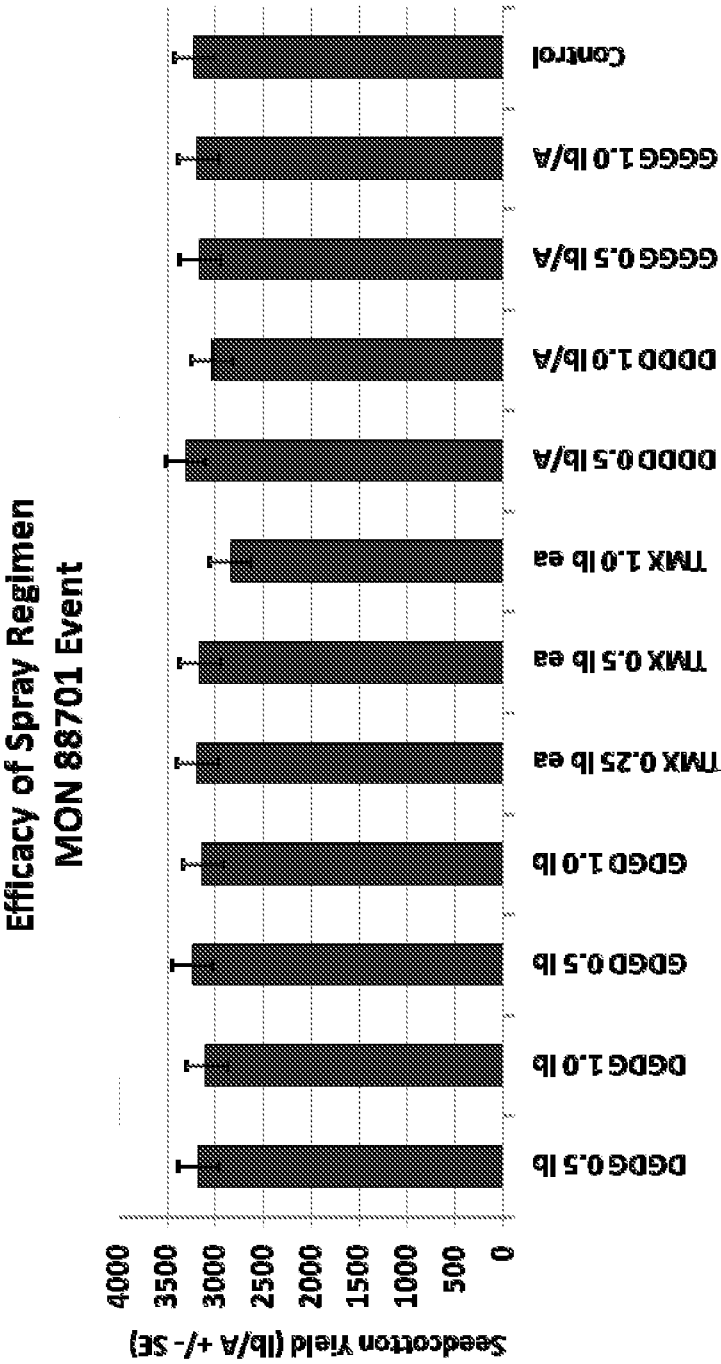


Figure 6

MON 88701 Cotton

Nontransgenic Coker 130 Cotton



Figure 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/028949

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. C12N15/82
 ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 C12N

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

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

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	R.C.DOHERTY, K.L.SMITH, J.A.BULLINGTON AND J.R.MEIER: "Palmer Amaranth Control with Dicamba and Glufosinate as Influenced by Weed Size and Herbicide Rate", SUMMARIES OF ARKANSAS COTTON REASEARCH 2009, vol. 582, 30 September 2009 (2009-09-30), pages 105-107, XP002675438, University of Arkansas page 105	1-33
Y	WO 2009/085982 A1 (MONSANTO TECHNOLOGY LLC [US]; FENG PAUL C C [US]; HEREDIA OSCAR [US];) 9 July 2009 (2009-07-09) claim 67; example 5; table 7 ----- -/--	1-33



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 May 2012

Date of mailing of the international search report

04/06/2012

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Krüger, Julia

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/028949

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 03/013224 A2 (BAYER BIOSCIENCE NV [BE]) 20 February 2003 (2003-02-20) page 4, paragraph 1; examples 1, 2, 5 -----	1-33
Y	US 2010/323893 A1 (IKEDA HAJIME [JP]) 23 December 2010 (2010-12-23) paragraph [0047]; claims 1,7 -----	1-33
Y	BEHRENS MARK R ET AL: "Dicamba resistance: Enlarging and preserving biotechnology-based weed management strategies", SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, WASHINGTON, DC; US, vol. 316, no. 5828, 1 May 2007 (2007-05-01), pages 1185-1188, XP002468682, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/SCIENCE.1141596 page 1185 -----	1-33
A	WO 2004/072235 A2 (MONSANTO TECHNOLOGY LLC [US]; CERNY R ERIC [US]; DUONG CAN [US]; HART) 26 August 2004 (2004-08-26) -----	1-33

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2012/028949

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009085982 A1	09-07-2009	AR 070678 A1	28-04-2010
		US 2009165166 A1	25-06-2009
		WO 2009085982 A1	09-07-2009
WO 03013224 A2	20-02-2003	AR 036209 A1	18-08-2004
		AT 524550 T	15-09-2011
		BR 0211726 A	21-09-2004
		CN 1551920 A	01-12-2004
		EP 1417312 A2	12-05-2004
		ES 2373434 T3	03-02-2012
		MX PA04001108 A	17-02-2005
		US 2003097687 A1	22-05-2003
		US 2005005334 A1	06-01-2005
		US 2009087853 A1	02-04-2009
		WO 03013224 A2	20-02-2003
		ZA 200400644 A	27-01-2005
US 2010323893 A1	23-12-2010	AR 077117 A1	03-08-2011
		BR PI1001944 A2	06-03-2012
		JP 2011001290 A	06-01-2011
		US 2010323893 A1	23-12-2010
WO 2004072235 A2	26-08-2004	AR 043162 A1	20-07-2005
		AR 072743 A2	15-09-2010
		AT 553203 T	15-04-2012
		AU 2004211592 A1	26-08-2004
		AU 2008202623 A1	03-07-2008
		BR PI0407397 A	07-02-2006
		CN 1753998 A	29-03-2006
		CO 5601048 A2	31-01-2006
		EG 24816 A	21-09-2010
		EP 1592798 A2	09-11-2005
		EP 2298921 A2	23-03-2011
		IL 170161 A	30-11-2010
		MX PA05008519 A	20-10-2005
		WO 2004072235 A2	26-08-2004
		ZA 200505226 A	27-09-2006

Algodón No transgénico Coker 130

Algodón MON 88701



FIGURA 7

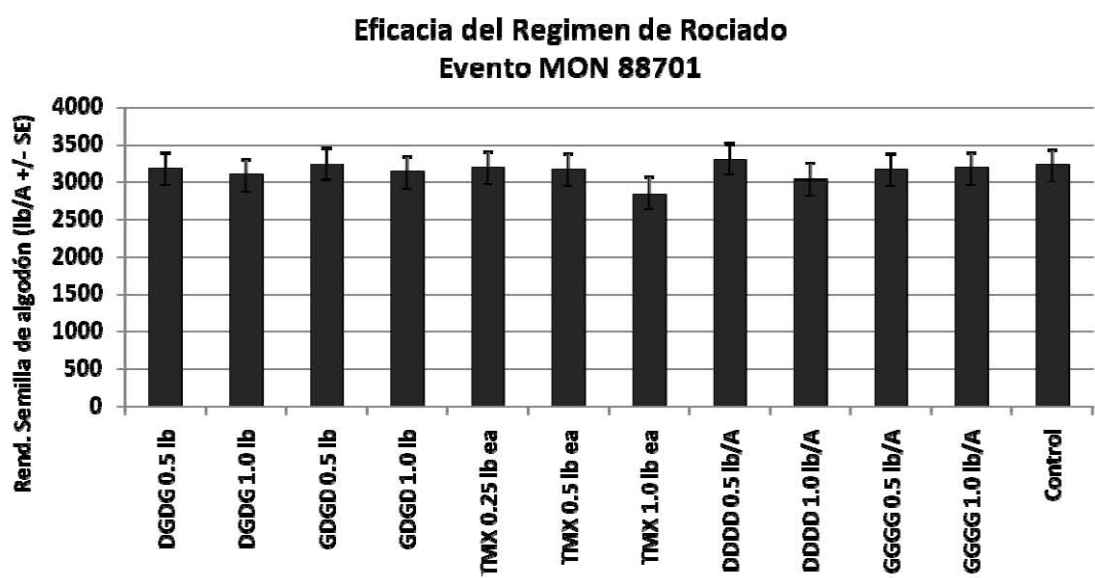


FIGURA 6

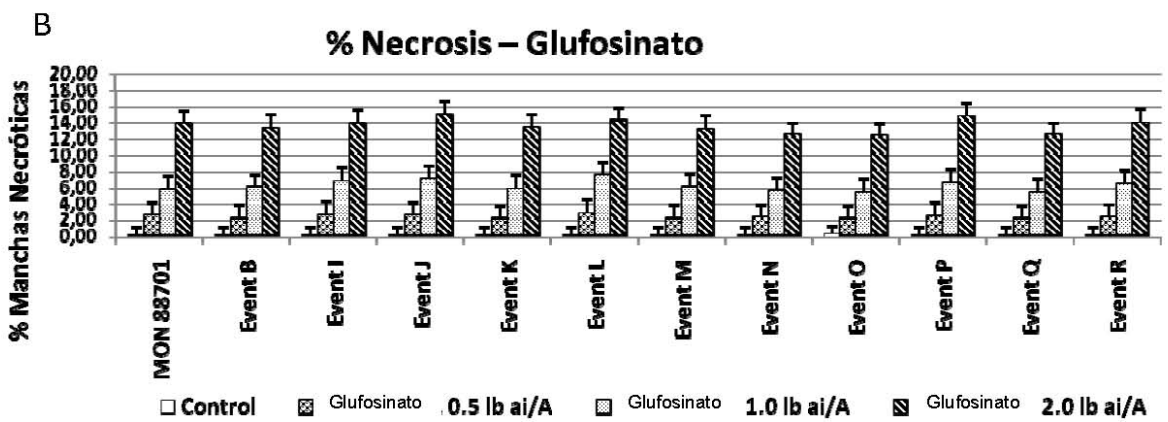
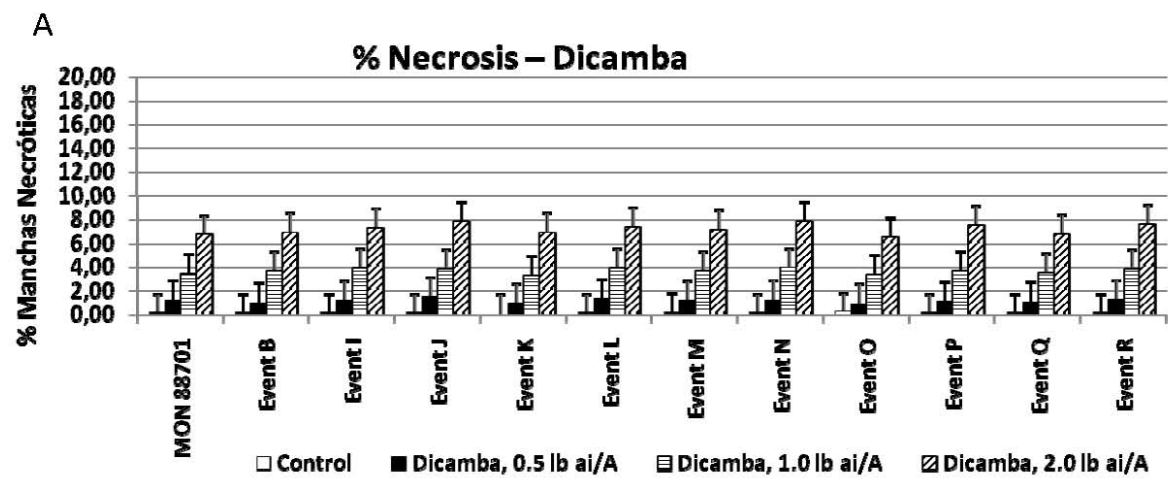


FIGURA 5

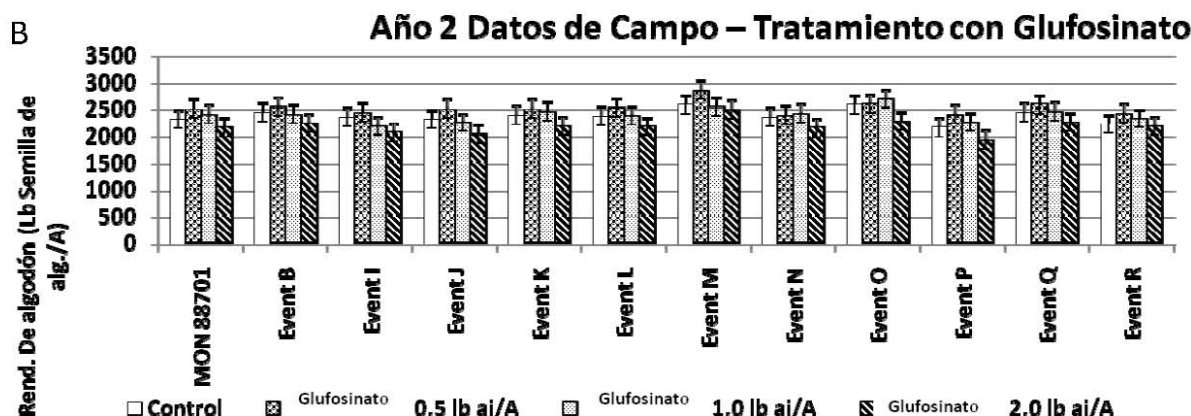
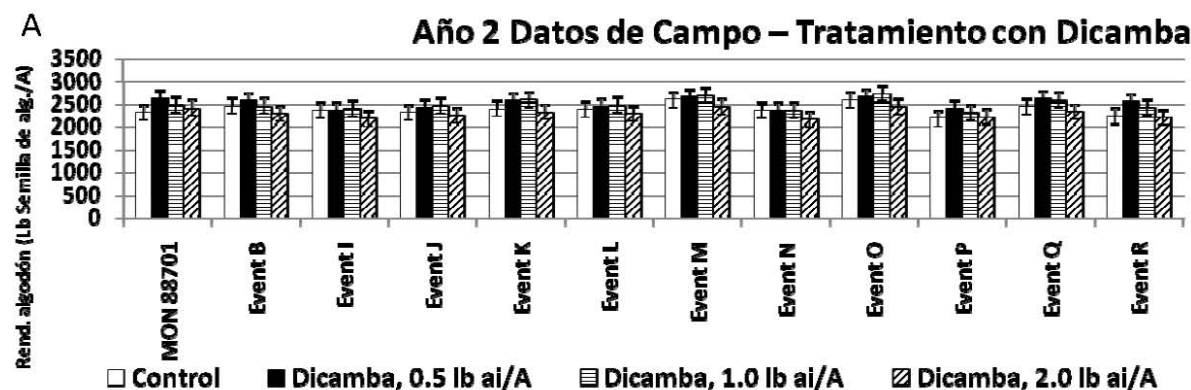


FIGURA 4

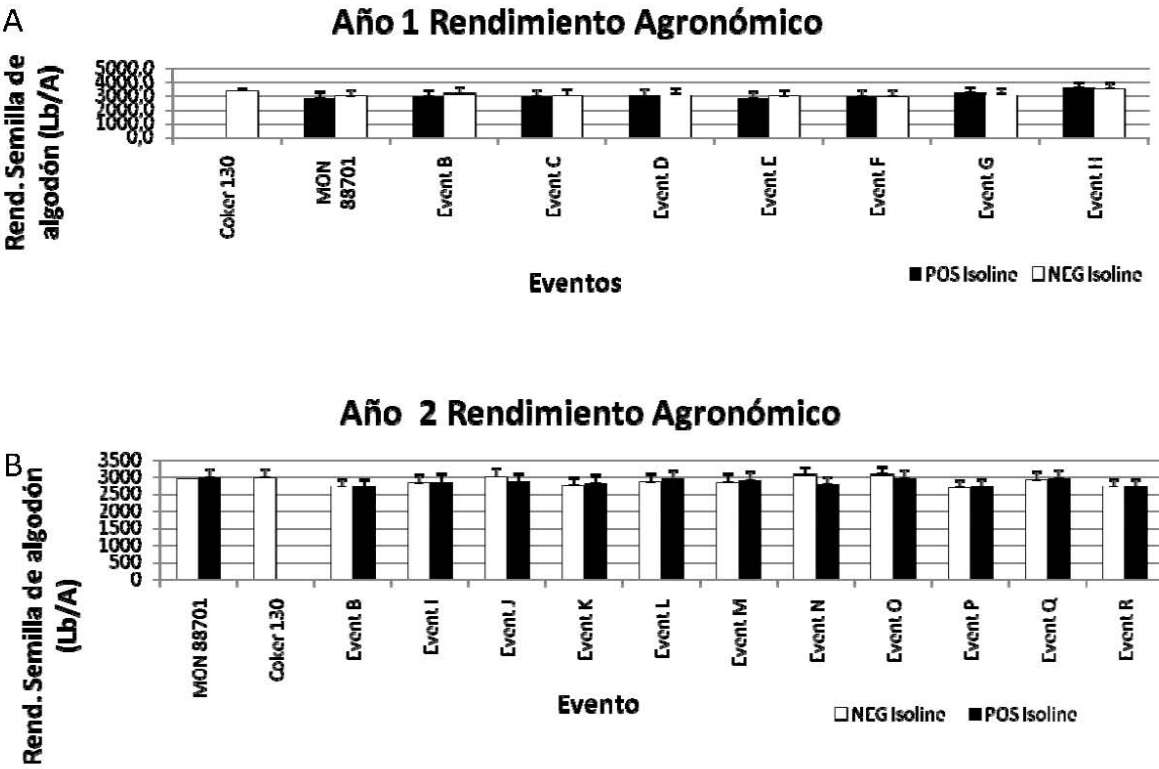


FIGURA 2

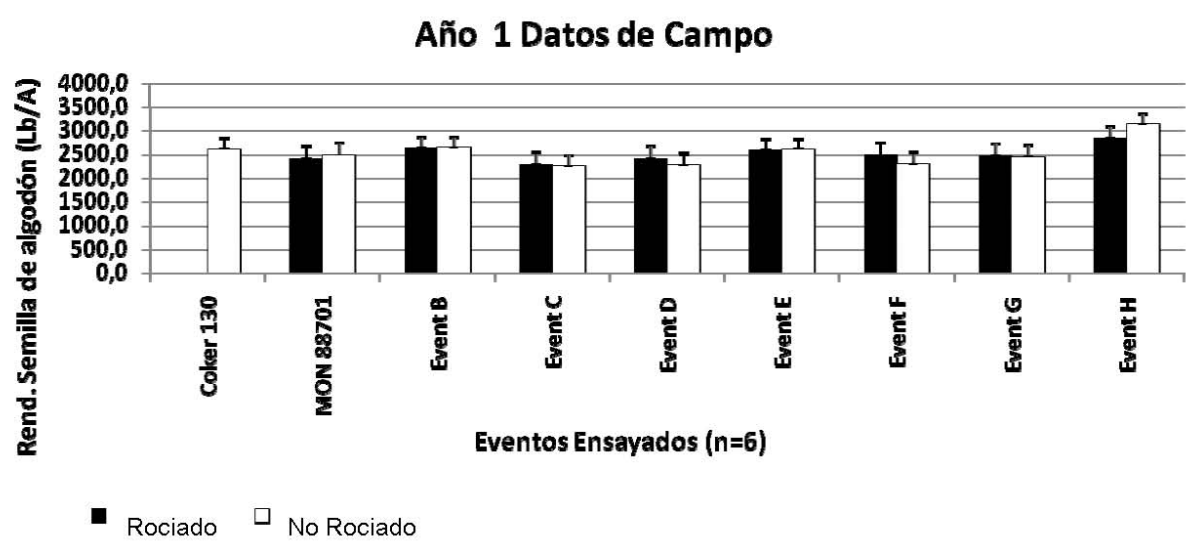


FIGURA 3

PODER

El (los) **MONSANTO TECHNOLOGY LLC**

Domiciliados en **800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, Missouri 63167, EEUU**

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

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

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

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

Dado y firmado hoy **19 de Diciembre de 2005**

en **St. Louis, Missouri, USA**

por **MONSANTO TECHNOLOGY LLC**

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

(Se requiere legalización consular o mediante apostilla)

POWER OF ATTORNEY

I (we) the undersigned **MONSANTO TECHNOLOGY LLC**

Of **800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, Missouri 63167, EEUU**

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

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

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

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

Given and signed this **19th December, 2005**

in **St. Louis, Missouri**

by 
Dennis R. Hoerner
(Notary shall execute on the next page)

(Consular legalization or apostille is required)

CERTIFICADO NOTARIAL (Sociedad)

NOTARIAL CERTIFICATION (Corporation)

ALVARO CASTELLANOS M. & CIA

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

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

Certifico :

a) Que MONSANTO TECHNOLOGY LLC

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

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

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

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

(Ciudad) St. Louis

(Estado) Missouri

Hoy 19 del Diciembre de 2005

(Notario Público)

*Los documentos debe identificarse con fecha y origen.

On this 19 day of Dec. of 2005
personally appeared

Dennis R. Hoerner

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

I certify:

a) That

Monsanto Technology LLC

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

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

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

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

(City) St. Louis

(State) Missouri

this 19 day of Dec of the year 2005

(Notary Public)

Michelle Ludwig

*Documents must be identified with date and origin



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

Apostille

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

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

Certified

5. at Jefferson City, Missouri
6. the 21ST day of DECEMBER, 2005
7. by Robin Carnahan, Secretary of State, State of Missouri
8. No. 142500
9. Seal/Stamp
10. Signature:

Robin Carnahan

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

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

Sello Notarial:

MICHELLE LUDWIG

Mi comisión vence Julio 13, 2009

Condado de St. Louis – Comisión #05550747

APOSTILLA

(Convención de La Haya de octubre 5, 1961)

1. País: Estados Unidos de América

Este documento público

2. ha sido firmado por Michelle Ludwig

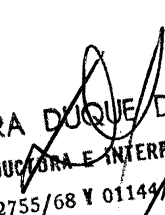
3. actuando en su carácter de Notario Público

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

CERTIFICADO

5. En Jefferson City, Missouri

6. El día 21 de Diciembre de 2005


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

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

8. No. 142500

9. Sello (en dorado)

10. Firma:

(fdo) Robin Carnahan

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

Bogotá, D. C., Febrero 9, 2006.



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

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2006 FEB 13 A 11: 55

Jefe de LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

613662
Dora Duque
Cuya firma aparece en el
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Monsanto Technology LLc

Brinker, Ronald J

Burns, Wen C

Feng, Paul C.C.

Kendig, John A

LeClere, Sherry

Lutke, Jennifer Lynn

Malven, Marianne

<120> EVENTO DE ALGODÓN TRANSGÉNICO MON 88701 Y SUS MÉTODOS DE USO

<130> MONS:302US

<140> Desconocido

<141> 2011-03-09

<150> 61/469,118

<151> 2011-03-30

<160> 15

<170> Versión PatentIn 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de ADN artificial que comprende la secuencia de algodón genómica y la secuencia transgénica

<400> 1

taggacatat tctcttaagg

20

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ADN artificial que comprende la secuencia de algodón

genómica y la secuencia transgénica

<400> 2

acatgaagcc ttaattcaat

20

<210> 3

<211> 60

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ADN artificial que comprende la secuencia de algodón
genómica y la secuencia transgénica

<400> 3

aaccttattt atataaaaat taggacatat tctcttaagg tagccaaagc ccgggcttaa 60

<210> 4

<211> 60

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ADN artificial que comprende la secuencia de algodón
genómica y la secuencia transgénica

<400> 4

gatccatgta gatttcccg acatgaagcc ttaattcaat attggctcta gaacataact 60

<210> 5

<211> 100

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ADN artificial que comprende la secuencia de algodón
genómica y la secuencia transgénica

<400> 5

gttacaagaa catccttgat aaccttattt atataaaaat taggacatat tctcttaagg 60

tagccaaagc ccgggcttaa ttaaggcgcg ccggccaagt 100

<210> 6
<211> 100
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de ADN artificial que comprende la secuencia de algodón
genómica y la secuencia transgénica

<400> 6
tgaccatcat actcattgct gatccatgta gatttcccg acatgaagcc ttaattcaat 60
attggctcta gaacataact tgtttaacac taaatataag 100

<210> 7
<211> 1176
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de ADN artificial que comprende la secuencia de algodón
genómica y la secuencia transgénica

<400> 7
cattatataa aaagaaaaat tttaaatata aaaaaaatat attaaaacag tgaatcaaca 60
atcatgtctc ttaaaatgaa aaaaattatc atttaaaatt tttaattaat aaaagtaaaa 120
tgaaattaaa acattttacc tgactttaac agtatagata attcaaaagt aaatatgatt 180
tcttctgatt ttcaaaaaca aatttagaga ttataaatgc cattcgtcga tcatttgac 240
acgaaagatt taagaaaagc aaatgtaacc ttgacatga tgagcataat cacttcaaat 300
agtattttt ttattttcca acgtcaatat attgaaatat tttttatag aataaactat 360
agcaattttt gccatgatgg tcaacttat accactatcc ttaaccaata tattttgtt 420
tagacattag gagttaagtc tgatgtcgga tgtttgttc cttatttatt caggtgtttt 480
ataattttac ttatgaaaga ggttggtttt tctcaatgca ttctaatat catatataca 540
cattgattga gcaaaaaaaaa aaaaaactat cctcaaccaa tgtagaagtg agttggttgc 600

atgatctttt attgaattt tcaatattga aaaaactaaa accacatgtc ttaatccatc 660
 gtaataatac tgctattatt tgaaaagttg atagcaaata ttacaataga aaatgtagat 720
 ctataagaag aaagtatagc tatgtgaaat ctcatataac taatggtatg attaatgttg 780
 attatattca aagtgttgat aatctcacat attcttgac aaaagcttta gttagagaaa 840
 aaaatatgga tagtaataat gaggataaga ctaaagcctg aacaataata aaaatcaata 900
 ataaggatac ttacataat gattagagat cccaaaaatt agattcaaaa ggaaaaatga 960
 atacatattt aaaaaatctc tcttttcggt ataatgaatg tatgtataac aataatagaa 1020
 gttgagtata actatactct taatgaggtc cataactagt ttgagtgaaa tgcagagtta 1080
 caagaacatc ctgataacc ttatttatat aaaaattagg acatattctc ttaaggtagc 1140
 caaagcccg gcttaattaa ggcgcgccgg ccaagt 1176

<210> 8

<211> 1188

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ADN artificial que comprende la secuencia de algodón genómica y la secuencia transgénica

<400> 8

tgaccatcat actcattgct gatccatgta gatttccgg acatgaagcc ttaattcaat 60
 attggctcta gaacataact tgtttaacac taaatataag ttatgccat tgacatatgt 120
 ataatgcata actttctatc ttacttgaa aagagagatt tactttctc aaaatgtttg 180
 tgtattaatt tagaagattt aaaccacgag acttgaagat ttaagatat cgatagattc 240
 aagtacactt tcgcatatat ttatgttct taatgatttg acatgataaa actcggttta 300
 tttagtttta tattataatt ttatgattgt aacacttaat tgataatgac atgatcaact 360
 attaatttga caaaatcaaa agaaatagaa accgactttt cattttatgt ttagaatgaa 420
 aaattcagtg tctaatttag atgagtcaaa tatttattca taattaggtc aggaatatac 480

ttaattactt gggtaaccaa aattggagtt tgattttcaa taattagatc aagttagtgt 540
 ttaattact tataagaaaa tttaataacc caaattacta atcaaatact ttagaataaa 600
 attagatgaa gatagaaaaa ttagctaata tatttaatga aaatttaatt ctaggtattt 660
 actattgatt gattattctt ttgttagag ttatgtgacc tgaatcccgt ttgatctgat 720
 ctgaaaagtt cgacgtacaa ttcattgtc aaataaataa aataaagagg caaatagga 780
 gatctgtata ggactatatt tctcaatta aacattgatt ctaaaagggg tgtttaatcc 840
 ttaaaatgcg ttagtcgaa aacctctgt attgtgattt tttaatatta gtgaatttct 900
 cctcttctgt ccgtgatatt tcccgaataa gggttttcaa ataaaacttg tgtattctta 960
 ttttcttc ttattgtttt acgatcctc ctattgccat tatcgaagta tagtataaca 1020
 ctttaaatc tttaaaaat tatattatca attatttta taagttaaaa gaatataagt 1080
 tacaaataat aattttata ccatttatca cgaaatatat acttgccggg acgatattg 1140
 tccacaaacc ctaacctcg tttgagttg tgaactcag ctatataa 1188

<210> 9

<211> 4105

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ADN artificial que comprende la secuencia transgénica

<400> 9

tctcttaagg tagccaaagc ccgggcttaa ttaaggcgcg ccggccaagt cggccgcggc 60
 cgcgtaaca agcttctgca gaattcgtca acgagatctt gagccaatca aagaggagtg 120
 atgtagacct aaagcaataa tggagccatg acgtaagggc ttacgcccac acgaaataat 180
 taaaggctga tgtgacctgt cggctctca gaacctttac ttttatgtt tggcgtgtat 240
 ttttaaattt ccacggcaat gacgatgtga cccaacgaga tcttgagcca atcaaagagg 300
 agtgatgtag acctaaagca ataatggagc catgacgtaa gggcttacgc ccatacgaaa 360
 taattaaagg ctgatgtgac ctgtcgggtc ctacgaacct ttactttta tattggcgt 420

gtatttttaa atttccacgg caatgacgat gtgacctgtg catccgctt gcctataaat 480
 aagttttagt ttgtattgat cgacacggtc gagaagacac ggccattcta gttctcaaca 540
 caacatatac aaaacaaacg aatctcaagc aatcaagcat tctacttcta ttgcagcaat 600
 ttaaatacatt tcttttaaag caaaagcaat ttctgaaaa ttctaccat ttacgaacga 660
 tagccatggc gcaagttagc agaatctgca atgggtgtgca gaacccatct cttatctcca 720
 atctctcgaa atccagtcaa cgaaaatctc cttatcgggt ttctctgaag acgcagcagc 780
 atccacgagc ttatccgatt tcgtcgtcgt ggggattgaa gaagagtggg atgacgttaa 840
 ttggctctga gcttcgtcct ctttaaggta tgtcttctgt ttccacggcg tgcattgctca 900
 ctttcgttag aaacgcttgg tacgttgctg cacttcctga ggagttgagc gagaagcctc 960
 taggaagaac tatcctcgat actccactag ctctctatcg tcaacctgac ggagttgtcg 1020
 ctgccctgct tgatatttgt ccgcatcgct tcgctccgtt gagtgacggg attctagtca 1080
 acggacatct ccagtgcca taccacggtc tggaattga cggaggtggc cagtgtgtcc 1140
 acaaccgcga cggcaacgga gcccgccctg ctctctgaa cgtgcgatca ttccctgtcg 1200
 tggaaagaga cgcattgatc tggatctggc ctggagatcc agcactcgca gatcccgggtg 1260
 ctatccctga ctttgggtgt cgtgttgatc cagcttaccg tactgtcgga ggttacggtc 1320
 acgtggactg caactacaag ctcttctgtg ataacctcat ggatcttga cacgctcagt 1380
 acgtgcaccg cgctaacgcc caaacagacg cttcgatag acttgagcgt gagtgatcg 1440
 ttggcgacgg cgagatccag gcgctcatga agatccctgg tggcacaccc tcagttctca 1500
 tggctaagtt cttgcgtggt gctaacacac cagttgacgc ctggaacgac atccggtgga 1560
 ataagggtgc ggctatgctg aacttcatcg cggtcgcgcc ggaagggacg ccgaaggagc 1620
 agtcaatcca ctcccgagga acccatatcc ttactctga gaccgaggca agctgccatt 1680
 acttctcgg tagtccccgc aacttcggtg tagacgatcc agagatggac ggtgttctca 1740
 ggagctggca agctcaagcc ctggtgaagg aggacaaagt ggtcgttgaa gctatcgaaa 1800

ggcggagggc ttacgtcgaa gcgaacggga tcagacccgc catgttgcc tgcgacgagg 1860
cagccgtcag ggtatccagg gagattgaga agctcgaaca actagaagcg gcgtgaggat 1920
ccactagtaa cggccgccag tgtgctggaa ttcgcccttg aattcaggcc tgatcacctg 1980
tcgtacagta ttctacatt tgatgtgtga ttgtgaaga acatcaaaca aaacaagcac 2040
tggctttaat atgatgataa gtattatggt aattaattaa ttggcaaaaa caacaatgaa 2100
gctaaaattt tatttattga gccttgcggt taatttcttg tgatgatctt ttttttatt 2160
ttctaattat atatagtttc ctttgcttg aaatgctaaa ggtttgagag agttatgctc 2220
tttttctt cctcttctt tttaacttt atcatacaaa ttgtgaataa aaatgtgagt 2280
acattgagct ctctgcaggc cggattgaga ctttcaaca aagggttaata tccggaaacc 2340
tcctcggatt ccattgccca gctatctgtc actttattgt gaagatagtg gaaaaggaag 2400
gtggctccta caaatgccat cattgcgata aaggaaaggc catcgttgaa gatgcctctg 2460
ccgacagtgg tcccaaagat ggacccccac ccacgaggag catcgttgaa aaagaagacg 2520
ttccaaccac gtcttcaaag caagtggatt gatgtgatgg tccgattgag acttttcaac 2580
aaagggtaat atccggaaac ctctcggat tcattgccc agctatctgt cactttattg 2640
tgaagatagt ggaaaaggaa ggtggctcct acaaatgcca tcattgcat aaaggaaagg 2700
ccatcgttga agatgcctct gccgacagtg gtcccaaaga tggacccccca cccacgagga 2760
gcatcgttga aaaagaagac gttccaacca cgtcttcaaa gcaagtggat tgatgtgata 2820
tctccactga cgtaagggat gacgcacaat ccactatcc ttcgcaagac cttcctcta 2880
tataaggaag ttcatatcat ttggagaggc ctcaaaaaa ttgctacat tgttcacaa 2940
actcaaata ttattcattt attgtcagc ttcaaactc ttgtttctt gttgttgat 3000
tgagaatagg atccatgagc ccagaacgac gcccggccga catccgccgt gccaccgagg 3060
cggacatgcc ggcggtctgc accatcgtca accactacat cgagacaagc acggtcaact 3120
tccgtaccga gccgcaggaa ccgcaggagt ggacggacga cctcgtccgt ctgcgggagc 3180
gctatccctg gctcgtcgcc gaggtggacg gcgaggtcgc cgcatcgcc tacgcggggc 3240

cctggaaggc acgcaacgcc tacgactgga cggccgagtc gaccgtgtac gtctcccccc 3300
 gccaccagcg gacgggactg ggctccacgc tctacacca cctgctgaag tccctggagg 3360
 cacagggcct caagagcggtg gtcgctgtca tcgggctgcc caacgacccg agcgtgcgca 3420
 tgcacgaggc gtcggtatat gcccccgcg gcatgctgcg ggcgggccggc ttcaagcacg 3480
 ggaactggca tgacgtgggt ttctggcagc tggacttcag cctgccggtc ccgccccgtc 3540
 cggctctgcc cgtcaccgag atctgagaat tgatcgttca aacattggc aataaagttt 3600
 ctaagattg aatcctgttg ccggtcttgc gatgattatc atataattc tgttgaatta 3660
 cgtaagcat gtaataatta acatgtaatg catgacgtta ttatgagat gggttttat 3720
 gattagagtc ccgcaattat acatttaata cgcgatagaa aacaaaatat agcgcgcaaa 3780
 ctaggataaa ttatcgcgcg cgggtgtcatc tatgttacta gatcctcgag tggaggcctc 3840
 atcctcatct aagcccccat ttggacgtga atgtagacac gtcgaaataa agatttccga 3900
 attagaataa ttgtttatt gcttcgcct ataaatacga cggatcgtaa ttgtcgttt 3960
 tatcaaatg tactttcatt ttataataac gctgcggaca tctacattt tgaattgaaa 4020
 aaaaattggt aattactctt tcttttctc catattgacc atcactca ttgctgatcc 4080
 atgtagattt cccggacatg aagcc 4105

<210> 10

<211> 6369

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ADN artificial que comprende la secuencia de algodón genómica y la secuencia transgénica

<400> 10

cattatataa aaagaaaaat tttaaataa aaaaaaatat attaaaacag tgaatcaaca 60

atcatgtctc ttaaatgaa aaaaattatc attaaaatt tttaattaat aaaagtaaaa 120

tgaaattaaa acattttacc tgactttaac agtatagata attcaaaagt aaatatgatt 180

tcttctgatt ttcaaaaaca aatttagaga ttataaatgc cattcgtcga tcattttgac 240
acgaaagatt taagaaaagc aatgtaacc ttgacatga tgagcataat cacttcaa 300
agtattttt ttatttcca acgtcaatat attgaaatat tttttatag aataaactat 360
agcaatttt gccatgatgg ttcaacttat accactatcc ttaaccaata tattttgtt 420
tagacattag gagttaagtc tgatgtcgga tgtttgttc cttatttatt caggtgttt 480
ataattttac ttatgaaaga ggttggtttt tctcaatgca ttctaatat catatataca 540
cattgattga gcaaaaaaaaa aaaaaactat cctcaaccaa tgtagaagtg agttggtgc 600
atgatcttt atttgaattt tcaatattga aaaaactaaa accacatgac ttaatccatc 660
gtaataatac tgctattatt tgaaaagttg atagcaaata ttacaataga aatgtagat 720
ctataagaag aaagtatagc tatgtgaaat ctcatataac taatggtatg attaattgtg 780
attatattca aagtgttgat aatctcacat attcttgac aaaagcttta gttagagaaa 840
aaaatatgga tagtaataat gaggataaga ctaaagcctg aacaataata aaaatcaata 900
ataaggatac ttacataat gattagagat ccaaaaaatt agattcaaaa ggaaaaatga 960
atacatattt aaaaaatctc tctttcggg ataatgaatg tatgtataac aataatagaa 1020
gttgagtata actatactct taatgaggtc cataactagt ttgagtgaat tgcagagtta 1080
caagaacatc ctgataacc ttatttatat aaaaattagg acatattctc ttaaggtagc 1140
caaagcccgg gcttaattaa ggcgcgccgg ccaagtcggc cgcggccgcg ttaacaagct 1200
tctgcagaat tcgtcaacga gatcttgagc caatcaaaga ggagtgatgt agacctaaag 1260
caataatgga gccatgacgt aagggcttac gccatacga aataattaaa ggctgatgtg 1320
acctgtcggg ctctcagaac cttactttt tatgtttggc gtgtatttt aaatttcac 1380
ggcaatgacg atgtgacca acgagatctt gagccaatca aagaggagtg atgtagacct 1440
aaagcaataa tggagccatg acgtaagggc ttacgcccac acgaaataat taaaggctga 1500
tgtagacctg cggctctca gaacctttac ttttatatt tggcgtgtat ttttaaatt 1560

ccacggcaat gacgatgtga cctgtgcatc cgctttgcct ataaataagt ttagtttgt 1620
attgatcgac acggtcgaga agacacggcc attctagttc tcaacacaac atatacaaaa 1680
caaacgaatc tcaagcaatc aagcattcta ctctattgc agcaatttaa atcatttctt 1740
ttaaagcaaa agcaattttc tgaaaatttt caccatttac gaacgatagc catggcgcaa 1800
gttagcagaa tctgcaatgg tgtgcagaac ccatctctta tctccaatct ctcgaaatcc 1860
agtcaacgca aatctccctt atcggtttct ctgaagacgc agcagcatcc acgagcttat 1920
ccgatttcgt cgtcgtgggg attgaagaag agtgggatga cgtaattgg ctctgagctt 1980
cgtcctctta aggtcatgtc ttctgtttcc acggcgtgca tgctcacttt cgtagaaaac 2040
gcttggtacg ttgctgact tctgaggag ttgagcgaga agcctctagg aagaactatc 2100
ctcgatactc cactagctct ctatcgtaa cctgacggag ttgtcgctgc cctgcttgat 2160
attgtccgc atcgcttcgc tccgttgagt gacggtattc tagtcaacgg acatctccag 2220
tgtccatatc acggtctgga atttgacgga ggtggccagt gtgtccacaa cccgcacggc 2280
aacggagccc gccctgcttc tctgaacgtg cgatcattcc ctgtcgtgga aagagacgca 2340
ttgatctgga tctggcctgg agatccagca ctcgcagatc ccggtgctat ccctgacttt 2400
gggtgtcgtg ttgatccagc ttaccgtact gtcggagggt acggtcacgt ggactgcaac 2460
tacaagctcc ttgtggataa cctcatggat cttggacacg ctcatgacgt gcaccgcgct 2520
aacgccc aaa cagacgcctt cgatagactt gagcgtgagg tgatcgttgg cgacggcgag 2580
atccaggcgc tcatgaagat ccctggtggc acaccctcag ttctcatggc taagttcttg 2640
cgtggtgcta acacaccagt tgacgcctgg aacgacatcc ggtggaataa ggtgtcggct 2700
atgtgaact tcatcgcggt cgcgccggaa gggacgccga aggagcagtc aatccactcc 2760
cgaggaaccc atatccttac tctgagacc gaggcaagct gccattactt cttcggtagt 2820
tcccgaact tcggtataga cgatccagag atggacggtg ttctcaggag ctggcaagct 2880
caagccctgg tgaaggagga caaagtggc gttgaagcta tcgaaaggcg gagggcttac 2940
gtcgaagcga acgggatcag acccgccatg ttgtcctgcg acgaggcagc cgtcagggta 3000

tccagggaga ttgagaagct cgaacaacta gaagcggcgt gaggatccac tagtaacggc 3060
cgccagtgtg ctggaattcg cccttgaatt caggcctgat cacctgtcgt acagtatttc 3120
tacatttgat gtgtgatttg tgaagaacat caaacaaaac aagcactggc ttaatatga 3180
tgataagtat tatggtaatt aattaattgg caaaaacaac aatgaagcta aaattttatt 3240
tattgagcct tgcggttaat ttctgtgat gatctttttt tttatttct aattatata 3300
agtttccttt gcttgaaat gctaaagggt tgagagaggt atgctctttt tttcttcctc 3360
tttcttttt aactttatca tacaaatttt gaataaaaat gtgagtacat tgagctctct 3420
gcagggccga ttgagacttt tcaacaaagg gtaatatccg gaaacctcct cggattccat 3480
tgcccagcta tctgtcactt tattgtgaag atagtggaaa aggaagggtg ctcctacaaa 3540
tgccatcatt gcgataaagg aaaggccatc gttgaagatg cctctgccga cagtgggtccc 3600
aaagatggac cccacccac gaggagcatc gtggaaaaag aagacgttcc aaccacgtct 3660
tcaaagcaag tggattgatg tgatggtccg attgagactt ttcaacaaag ggtaatatcc 3720
ggaaacctcc tcggattcca ttgccagct atctgtcact ttatttgtaa gatagtggaa 3780
aaggaagggtg gctcctacaa atgccatcat tgcgataaag gaaaggccat cgttgaagat 3840
gcctctgccg acagtgggtcc caaagatgga cccccacca cgaggagcat cgtggaaaaa 3900
gaagacgttc caaccacgtc ttcaaagcaa gtggattgat gtgatatctc cactgacgta 3960
agggatgacg cacaatccca ctatccttcg caagaccctt cctctatata aggaagtca 4020
tttcatttgg agaggcctca gaaaaatttg ctacattgtt tcacaaactt caaatattat 4080
tcatttattt gtcagctttc aaactctttg ttcttggtt gttgattgag aataggatcc 4140
atgagcccag aacgacgccc ggccgacatc cgccgtgccca ccgaggcgga catgccggcg 4200
gtctgcacca tcgtcaacca ctacatcgag acaagcacgg tcaacttccg taccgagccg 4260
caggaaccgc aggagtggac ggacgacctc gtccgtctgc gggagcgcta tccctggctc 4320
gtcgccgagg tggacggcga ggtcgccggc atgcctacg cgggcccctg gaaggcacgc 4380

aacgcctacg actggacggc cgagtcgacc gtgtacgtct ccccccgcca ccagcggacg 4440
ggactgggct ccacgctcta caccacctg ctgaagtccc tggaggcaca gggcttcaag 4500
agcgtggctg ctgtcatcgg gctgccaac gacccgagcg tgcgcatgca cgaggcgctc 4560
ggatatgccc cccgcggcat gctgcgggcg gccggcttca agcacgggaa ctggcatgac 4620
gtgggtttct ggcagctgga cttcagcctg ccggtaccgc cccgtccggt cctgcccgtc 4680
accgagatct gagaattgat cgttcaaaca tttggcaata aagtttctta agattgaatc 4740
ctgttgccgg tcttgcatg attatcatat aatttctgt gaattacgtt aagcatgtaa 4800
taattaacat gtaatgcatg acgttattha tgagatgggt tttatgatt agagtccgc 4860
aattatacat ttaatacgcg atagaaaaca aaatatagcg cgcaaactag gataaattat 4920
cgcgcgcggt gtcatctatg ttactagatc ctcgagtgga ggcctcatcc tcatctaagc 4980
ccccattgg acgtgaatgt agacacgtcg aaataaagat ttccgaatta gaataattg 5040
ttattgctt tcgcctataa atacgacgga tcgtaattg tcgtttatc aaaatgtact 5100
ttcattttat aataacgctg cggacatcta catttttgaa ttgaaaaaaa attggttaatt 5160
actctttctt ttctccata ttgaccatca tactcattgc tgatccatgt agatttccc 5220
gacatgaagc ctaattcaa tattggctct agaacataac ttgttaaca ctaaataata 5280
gtttatgcca ttgacatag tataatgcat aactttctat cttcactga aaagagagat 5340
ttactttctt caaatgttt gtgtattaat ttagaagatt taaaccacga gacttgaaga 5400
tttaagata tcgatagatt caagtacact ttgcatata tttatgttc ttaatgattt 5460
gacatgataa aactcggttt atttagttt atattataat ttatgattg taacacttaa 5520
ttgataatga catgatcaac tattaattg acaaaatcaa aagaaataga aaccgacttt 5580
tcattttatg ttagaatga aaaattcagt gtctaattta gatgagtaa atatttattc 5640
ataattaggt caggaatata ctaattact tgggtaacca aaattggagt ttgattttca 5700
ataattagat caagttagtg tttaattac ttataagaaa attttaatac ccaaattact 5760
aatcaaactt attagaataa aattagatga agatagaaaa attagctaata atatttaattg 5820

aaaatttaat tctaggtatt tactattgat tgattattct tttgttaga gttatgtgac 5880
 ctgaatcccg ttgatctga tctgaaaagt tcgacgtaca attcattgt caaataaata 5940
 aaataaagag gcaaaatagg agatctgtat aggactatat ttctcaatt aaacattgat 6000
 tctaaaaggg ttgttaatc cttaaatgc gtgtagtga aaacctctg tattgtgatt 6060
 ttttaatt agtgaattc tcctctctg tccgtgatat ttcccgataa gggttttca 6120
 aataaaactt gtgtattctt attttctt cttattgtt tacgacctt cctattgcca 6180
 ttatcgaagt atagtataac acttttaaat ctttaaaaa ttatattatc aattatttt 6240
 ataagttaaa agaataaag ttacaaataa taattttat accatttatc acgaaatata 6300
 tactgcggg tacgatatt gtccacaaac cctaacctc gtgttgagtt gtgaactca 6360
 gctatataa 6369

<210> 11
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador PCR de oligonucleótidos químicamente sintetizados

<400> 11
 gaccatcata ctcattgctg atcc 24

<210> 12
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador PCR de oligonucleótidos químicamente sintetizados

<400> 12
 gtgttaaaca agttatgtc tagagccaat a 31

<210> 13

<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sonda PCR de oligonucleótidos químicamente sintetizados

<400> 13
tagatttccc ggacatgaa 19

<210> 14
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador PCR de oligonucleótidos químicamente sintetizados
<400> 14
gaaatctatg tgttgacac aatacacag 29

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

<220>
<223> Sonda PCR de oligonucleótidos químicamente sintetizados

<400> 15
ttccccaag aagcct 16



**BUDAPEST RESTRICTED CERTIFICATE OF DEPOSIT
BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF
THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE
INTERNATIONAL FORM
RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT ISSUED PURSUANT TO RULE 7.3
AND VIABILITY STATEMENT ISSUED PURSUANT TO RULE 10.2**

The American Type Culture Collection (ATCC®) has received your deposit of seeds/strain(s)/strain(s) in connection with the filing of an application for patent. The following information is provided to fulfill Patent Office requirements.

Andy Kendig
Monsanto
700 Chesterfield fairway West
Chesterfield, MO 63017

Deposited on Behalf of: Monsanto

Date of Receipt of seeds/strain(s) by the ATCC®: March 17, 2011

Identification Reference by Depositor: ATCC ®Patent Deposit Designation: Quantity Received:

DGT Cotton seeds with transgenic event:
MON88701

PTA-11754

100packets/24 seeds in each packet

The ATCC® understands that:

1. The deposit of these seeds/strain(s) does not grant ATCC® a license, either express or implied, to infringe the patent, and our release of these seeds/strain(s) to others does not grant them a license, either express or implied, to infringe the patent.
2. If the deposit should die or be destroyed during the effective term of the patent, it shall be your responsibility to replace it with viable material. It is also your responsibility to supply a sufficient quantity for distribution for the deposit term. ATCC® will distribute and maintain the material for 30 years or 5 years following the most recent request for the deposit, whichever is longer. The United States and many other countries are signatory to the Budapest Treaty.

Prior to the issuance of a U.S. Patent, the ATCC® agrees in consideration for a one-time service charge, not to distribute these seeds/strain(s) or any information relating thereto or to their deposit except as instructed by the depositor or relevant patent office. After relevant patent issues we are responsible to release the seeds/strain(s) and they will be made available for distribution to the public without any restrictions. We will inform you of requests for the seeds/strain(s) for 30 years from date of deposit.



The deposit was tested **March 28, 2011** and on that date, the seeds/strain(s) were viable
International Depository Authority: American Type Culture Collection (ATCC®), Manassas, VA, USA

Signature of person having authority to represent ATCC®:

Rochelle
Harrington

Digitally signed by Rochelle
Harrington
DN: cn=Rochelle Harrington,
ou=ATCC, ou=US,
email=harrington@atcc.org, c=US
Location: Manassas, VA 20110
Date: 2011.03.29 07:37:54 -0400

ATCC® Patent Depository

cc: Pamela Sisson

Ref: Docket or Case No: 57447

March 29, 2011

Date

Traducción

ATCC

CERTIFICADO DE DEPÓSITO RESTRINGIDO AL TRATADO DE
BUDAPEST

5 TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO
INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS A LOS
FINES DE LA TRAMITACIÓN DE PATENTES
FORMULARIO INTERNACIONAL

RECEPCIÓN EN EL CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL EXPEDIDO
10 DE CONFORMIDAD CON LA NORMA 7.3 Y DECLARACIÓN DE
VIABILIDAD EXPEDIDO DE CONFORMIDAD CON LA NORMA 10.2

La Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC®) ha recibido su
depósito de semilla/ cepa(s)/ cepas(s) en relación con la presentación de
una solicitud de patente. La siguiente información se suministra para
15 cumplir con los requisitos de la Oficina de Patentes.

Andy Kending**Monsanto****700 Chesterfield fairway West****Chesterfield, MO 63017**

20 Depositado en nombre de: **Monsanto**

Fecha de la recepción de las semillas/cepa(s) por la ATCC®: **17 de
marzo de 2011**

<u>Referencia de Identificación del Depositante</u>	<u>Designación de depósito de patente ATCC®:</u>	<u>Cantidad recibida</u>

Semillas de algodón DGT con evento transgénico: MON88701	PTA-11754	100 paquetes/24 semillas en cada paquete
---	------------------	---

La ATCC entiende que:

1. El depósito de estas semillas/cepa(s) no le concede a ATCC® una licencia, ya sea expresa o implícita, para infringir la patente, y nuestra liberación de estas semillas/cepa(s) a otros no les concede una licencia, ya sea expresa o implícita, para infringir la patente.

2. Si el depósito muere o se destruye durante el plazo efectivo de la patente, será su responsabilidad sustituirlo con material viable. También es su responsabilidad suministrar una cantidad suficiente para la distribución durante el plazo del depósito. La ATCC® distribuirá y mantendrá el material por 30 años o por 5 años luego de la solicitud de depósito más reciente, lo que sea más largo. Los Estados Unidos y muchos otros países son signatarios del Tratado de Budapest.

Antes de la emisión de una patente estadounidense, la ATCC® acuerda, en consideración de un costo de servicio por única vez, no distribuir estas semillas/cepa(s) ni cualquier información relacionada con las mismas o con su depósito salvo instrucción del depositante u oficina de patentes correspondiente. Luego de la emisión de la patente correspondiente, somos responsables de liberar las semillas/cepa(s) quedando las mismas disponibles para su distribución al público sin restricción alguna. Les

informaremos respecto de solicitudes de las semillas/cepa(s) durante 30 años a partir de la fecha de depósito.

Id. del documento: 20127

Revisión: 2

5 Fecha efectiva: 13-10-2009

Página 1 de 2

Este depósito fue evaluado el **28 de marzo de 2011** y en esa fecha las semillas/cepa(s) eran viables.

10 Autoridad Internacional de Depósito: Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC®), Manassas, VA, EUA.

Firma de la persona autorizada para representar a la ATCC®:

Rochelle Harrington

Depositario de Patentes ATCC®.

15 cc: Pamela Sisson

Ref.: Caso No. 57447

Fecha: **29 de marzo de 2011**

Id. del documento: 20127

Revisión: 2

20 Fecha efectiva: 13-10-2009

Página 2 de 2

RESUMEN

La invención proporciona el evento de algodón MON 88701, y plantas, células de plantas, semillas, partes de plantas, y productos de consumo que comprenden el evento MON 88701. La invención también proporciona polinucleótidos específicos para el evento MON 88701 y plantas, células de plantas, semillas, partes de planta, y productos de consumo que comprenden polinucleótidos específicos para el evento MON 88701. La invención también proporciona métodos relacionados con el evento MON 88701.

Evento de algodón MON 88701 tolerante al Dicamba-
Glufosinato

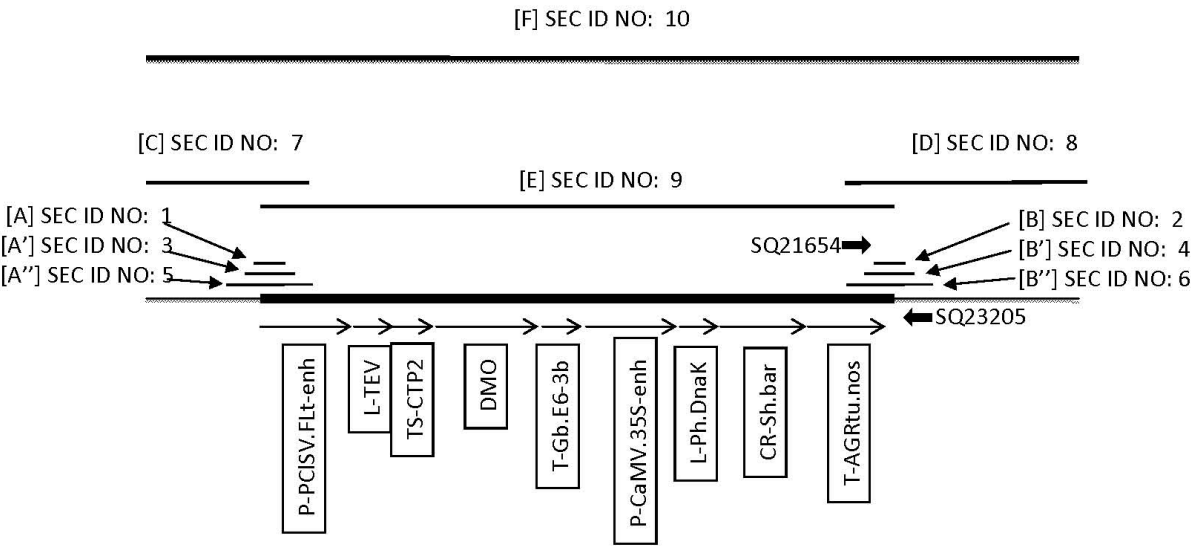


FIGURA 1