

EVENTO DE ÉLITE EE-GM5 Y MÉTODOS Y KITS PARA IDENTIFICAR DICHO EVENTO EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional de los Estados Unidos N.º 62/437.874, presentada el 22 de diciembre de 2016, y la solicitud provisional de los Estados Unidos N.º de serie 62/481.292, presentada el 4 de abril de 2017, cuyos contenidos se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a ácidos nucleicos novedosos y plantas de soja transgénicas, material vegetal y semillas, caracterizados por albergar un evento de transformación específico, particularmente por la presencia de genes que confieren resistencia a nematodos y tolerancia a herbicidas, en una localización específica en el genoma de la soja. Las plantas de soja de la invención combinan el fenotipo de resistencia a nematodos y tolerancia a herbicidas con un rendimiento agrónomo, estabilidad genética y funcionalidad en diferentes acervos genéticos equivalentes al fondo genético de la soja sin transformar en ausencia de herbicida(s) inhibidor(es) de HPPD o infestación por nematodos. La presente invención proporciona además métodos y kits para identificar la presencia de material vegetal que comprende específicamente el evento de transformación EE-GM5 en muestras biológicas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La expresión fenotípica de un transgén en una planta está determinada tanto por la estructura del gen o los genes en sí mismos como por su localización en el genoma de la planta. Al mismo tiempo, la presencia de los transgenes o "ADN-T insertado" en diferentes localizaciones en el genoma influirá en el fenotipo general de la planta de diferentes formas. La introducción exitosa desde el punto de vista agrícola o industrial de un rasgo comercialmente interesante en una planta mediante manipulación genética puede ser un procedimiento largo que depende de diferentes factores. La transformación y regeneración en sí de plantas transformadas genéticamente son solamente las primeras de una serie de etapas de selección, que incluyen caracterización genética exhaustiva, introgresión y evaluación en ensayos de campo, dando lugar con el tiempo a la selección de un evento de élite.

La identificación inequívoca de un evento de élite es cada vez más importante

a la vista de los debates acerca de nuevos alimentos/piensos, segregación entre productos transgénicos y no transgénicos y la identificación de material patentado. Idealmente, dicho método de identificación es rápido y sencillo, sin necesidad de una preparación de laboratorio extensa. Asimismo, el método debería proporcionar resultados que permitan la determinación inequívoca del evento de élite sin interpretación por un experto, pero que resista el escrutinio de un experto si es necesario.

La siembra de variedades EE-GM5 de soja resistentes a nematodos y tolerantes a herbicidas proporciona a los cultivadores nuevas opciones de control de nematodos y malas hierbas, usando herbicidas inhibidores de HPPD tales como los herbicidas isoxaflutol (IFT), topramezona o mesotriona (MST). Los herbicidas inhibidores de HPPD ofrecen una opción de control de malas hierbas alternativa para el cultivador de soja para ayudar a gestionar especies de malas hierbas problemáticas y como una herramienta de modo de acción alternativo para ayudar a ralentizar la propagación de malas hierbas resistentes a herbicidas.

La heterodera de la soja (SCN) *Heterodera glycines* (Ichinohe), un problema global para la producción de soja, es una amenaza continuada para los productores. Desde su detección inicial en los Estados Unidos en 1954 de un único condado en Carolina de Norte, la SCN se ha propagado a casi todos los estados productores de soja en los Estados Unidos y se estima que provoca más de 1200 millones de dólares en pérdidas de rendimiento anuales en los Estados Unidos, lo que la hace el patógeno de la soja más perjudicial allí. La SCN se detectó por primera vez en Brasil a principios de la década de 1990 y desde entonces se ha propagado por toda Sudamérica, y es uno de los patógenos más importantes en Brasil que causa pérdidas en prácticamente todas las regiones de cultivo brasileñas. De forma similar, la SCN continúa propagándose por regiones productoras de soja de China, con detección en 15 provincias y estimaciones de pérdida de rendimiento de más de 120 millones de dólares. Un estudio de varios años en el estado de Iowa, Estados Unidos (de 2001 a 2015) donde casi todas las variedades de soja resistentes a SCN contienen resistencia a SCN de PI 88788, descubrió que la virulencia de las poblaciones de SCN aumentó a lo largo de los años, lo que resultó en mayores densidades de población de SCN a final de temporada y menores rendimientos de variedades de soja resistentes a SCN con la fuente de resistencia PI88788 (Mitchum (2016), *Phytopathology* 106(12):1444-1450, Allen *et al.* (2017) *Plant Health Progr.* 18:19-27, Arias *et al.* (2017) www.researchgate.net/publication/266907703_RESISTANCE_TO_SOYBEAN_CYST_

NEMATODE_GENETICS_AND_BREEDING_IN_BRAZIL; McCarville *et al.* (2017) Plant Health Progress 18 :146-155).

El nematodo de las praderas *Pratylenchus brachyurus* es un patógeno cada vez más importante de la soja. Tiene una gran diversidad de hospedadores y está ampliamente distribuido en regiones tropicales y subtropicales, especialmente en Brasil, África y el sur de los Estados Unidos. *Pratylenchus brachyurus* se ha convertido en un problema entre los cultivadores de algodón y soja en la región brasileña de Cerrado y se considera el principal patógeno nematodo de la soja en la región. En la soja, este nematodo puede reducir los rendimientos de 30 a 50 %, y se observa mayor daño en suelos arenosos. El uso de variedades de soja resistentes sería el mejor modo de controlar este nematodo, sin embargo, no se han identificado hasta la fecha variedades de soja resistentes a *P. brachyurus*. Aunque se han estudiado varios genotipos de soja para determinar resistencia a *Pratylenchus brachyurus*, y se han identificado algunos cultivares con mayor tolerancia, el cultivo de cultivares resistentes contra *P. brachyurus* es difícil debido al hecho de que este nematodo es polífago y carece de una interacción estrecha con sus hospedadores (Machado (2014) Current Agricultural Science and Technology 20:26-35; Antonio *et al.* (2012) Soil productivity losses in area infested by the nematoid of the root lesions in Vera, MT. En: Brazilian Congress of Soy, 6, 2012, Cuiabá. Resúmenes. Londrina: Embrapa Soja, 4pp; Rios *et al.* (2016) Ciência Rural 46:580–584; Lima *et al.*, 2017, Capítulo 6 en el libro: Soybean - The Basis of Yield, Biomass and Productivity; editado por Minobu Kasai, ISBN 978-953-51-3118-2, ISBN de versión impresa 978-953-51-3117-5, InTech; Inomoto *et al.* (2011) Sucessão de culturas sob pivô central para controle de fitonematoides: variação populacional, patogenicidade e estimativa de perdas. Tropical Plant Pathology 36:178-185).

Se sabe que proteger las plantas contra nematodos tales como SCN puede ayudar a las plantas a lidiar mejor con otras tensiones tales como composición/contenido del suelo, condiciones climáticas, tensión por patógenos, aplicaciones de herbicidas, etc. En particular, cuando dichas otras tensiones producen un fenotipo que se ve fácilmente, tal como clorosis/amarilleo de las hojas, el efecto del control de SCN es más fácil de ver, mientras que de otro modo con frecuencia no es "visible". Por ejemplo, cuando las plantas de soja tienen síndrome de muerte súbita (SDS) o clorosis por deficiencia de hierro (IDC), la protección de SCN dará como resultado plantas que son más verdes o tienen síntomas de SDS/IDC menos graves. A pesar de la investigación exhaustiva y las iniciativas de exploración de variedades, la

deficiencia de hierro sigue siendo un reto en áreas de producción de soja grandes en el centro norte de los Estados Unidos. La importancia de este problema ha aumentado debido a la expansión de la producción de soja en suelos susceptibles a deficiencia de hierro y a posibles interacciones con cambios en el sistema de cultivo. Se produce deficiencia de hierro en suelos con alto pH y carbonatos, pero la expresión de la deficiencia de hierro es muy variable en cuanto al espacio debido a interacciones con propiedades del suelo espacialmente variables tales como contenido de humedad, salinidad, disponibilidad de hierro y otras concentraciones de micronutrientes y metales. Además, la expresión de deficiencia de hierro interacciona con factores bióticos tales como fijación de nitrógeno, plagas, enfermedades y con tensiones inducidas por tratamiento tales como aplicación de herbicidas. La selección de la variedad es el medio más importante para gestionar la deficiencia de hierro, pero la selección de variedades es complicada por una gran interacción del genotipo con el ambiente relacionada con tolerancia a la clorosis (Hansen *et al.* (2004) Soil Sci. Plant Nutr. 50(7):983-987).

El síndrome de muerte súbita (SDS) de la soja se descubrió por primera vez en 1971 en Arkansas y desde entonces se ha confirmado en la mayoría de áreas de cultivo de soja de los Estados Unidos. El SDS es una enfermedad fúngica que también aparece en un complejo de enfermedades con la heterodera de la soja (SCN). El SDS está entre las enfermedades de la soja transmitidas por el suelo más devastadoras en los Estados Unidos. Cuando esta enfermedad aparece en presencia de SCN, los síntomas se producen antes y son más graves. El SDS es provocado por hongos del suelo en un grupo del complejo de la especie *Fusarium solani*. En Norteamérica, *Fusarium virguliforme*, anteriormente *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, es el agente causante. En Sudamérica, *F. brasiliense*, *F. cuneirostrum*, *F. tucumaniae* y *F. virguliforme* provocan síntomas de SDS. Aunque se han desarrollado cultivares de soja que son menos susceptibles a SDS, no está disponible ningún cultivar muy resistente. El hongo puede infectar raíces de plántulas de soja poco después de plantar, pero aparecen con poca frecuencia síntomas aéreos de SDS hasta que las plantas de soja han alcanzado estadios reproductivos. El hongo produce toxinas en las raíces que se translocan a las hojas. Los primeros síntomas notables de SDS son amarilleo y desfoliación de las hojas superiores. Si la enfermedad se desarrolla pronto en la temporada, las flores y vainas jóvenes se malograrán. Cuando la enfermedad se desarrolla más tarde, la planta producirá menos semillas por vaina o semillas más pequeñas. Cuanto antes se desarrolle la enfermedad grave, más se reducirá el

rendimiento. Debido a que el hongo de SDS puede persistir en el suelo durante largos periodos, áreas mayores de un campo mostrarán síntomas de la enfermedad en cada temporada de crecimiento hasta que la mayor parte del campo se vea afectada (Westphal *et al.* (2008). Sudden Death Syndrome of Soybean. The Plant Health Instructor. DOI:10.1094/PHI-I-2008-0102-01, www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/Pages/SuddenDeath.aspx).

En la actualidad, no se comercializan plantas de soja modificadas por ingeniería genética para resistencia a nematodos. Se han divulgado en la técnica plantas de soja que comprenden uno o más genes de tolerancia a herbicidas. El documento WO2006/130436 describe un evento de soja tolerante a glifosato que comprende un gen *epsps*, y el documento WO2011/034704 describe un evento de soja tolerante a dicamba. El documento WO2012/082548 describe plantas de soja que comprenden un gen tanto *hppd* como *pat*. El documento WO2011/063411 describe un evento de soja con tolerancia a inhibidores de HPPD y glifosato, mientras que el documento WO2011/063413 describe plantas de soja con tolerancia a inhibidores de HPPD, glufosinato y glifosato. El documento WO2011/066384 describe un evento de soja con tolerancia a 2,4-D y glufosinato, mientras que el documento WO2012/075426 describe un evento de soja con tolerancia a 2,4-D, glufosinato y glifosato y el documento WO2017/059795 describe un evento de soja con tolerancia a glifosato. El documento WO2009/064652 describe un evento de soja con resistencia a insectos lepidópteros y el documento WO2013/016527 describe un evento de soja con resistencia a insectos lepidópteros y tolerancia a glufosinato.

Se han divulgado genes y proteínas de HPPD que confieren tolerancia mejorada a herbicidas inhibidores de HPPD, por ejemplo, en los documentos WO2015138394, WO2015135881, WO2014043435 y se ha descrito la actividad nematocida de proteínas Cry en, por ejemplo, los documentos WO2010027805, WO2010027809, WO2010027804, WO2010027799, WO2010027808 y en el documento WO2007147029.

Ninguna de las divulgaciones de la técnica anterior enseña o sugiere un evento de élite en soja que comprende un gen de Cry activo contra nematodos ni, desde luego, un evento de élite en soja que comprende un gen de Cry activo contra nematodos combinado con un gen que confiere tolerancia a inhibidores de HPPD.

Se sabe en la técnica que obtener un evento de transformación de élite comercial en plantas de soja con rendimiento agrónomo aceptable no es en absoluto

sencillo.

SÍNTESIS DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un ácido nucleico que codifica una proteína Cry14Ab-1, tal como la secuencia codificante de *cry14Ab-1.b* de la SEQ ID NO. 7 o una secuencia que codifica una proteína Cry14Ab nematocida que tiene al menos 95, 96, 97, 98 o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 7. También se proporciona en el presente documento un ácido nucleico que codifica una proteína HPPD-4, tal como la secuencia codificante de *hppdPf-4Pa* de la SEQ ID NO. 9 o una secuencia que tiene al menos 95, 96, 97, 98 o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 9, en donde dicha secuencia codifica una proteína HPPD que proporciona tolerancia a herbicidas inhibidores de HPPD cuando se expresa en una planta. También se proporcionan en el presente documento un gen *cry14Ab-1.b* quimérico que comprende la secuencia de la SEQ ID NO. 11 de la posición de nucleótido 131 a la posición de nucleótido 5276, o su complemento, o un gen *cry14Ab-1.b* quimérico que comprende la secuencia de la SEQ ID NO. 11 de la posición de nucleótido 412 a la posición de nucleótido 3969 unida operativamente a un promotor expresable en plantas, o una secuencia que codifica una proteína Cry14Ab nematocida que tiene al menos 95, 96, 97, 98 o al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO. 11 de la posición de nucleótido 131 a la posición de nucleótido 5276, o su complemento, o con la secuencia de la SEQ ID NO. 11 de la posición de nucleótido 412 a la posición de nucleótido 3969 (cuando se une operativamente a un promotor expresable en plantas). Se proporciona además en el presente documento un gen *hppdPf-4Pa* quimérico que comprende la secuencia de la SEQ ID NO. 11 de la posición de nucleótido 5382 a la posición de nucleótido 7459, o su complemento, o que comprende la secuencia de la SEQ ID NO. 11 de la posición de nucleótido 5589 a la posición de nucleótido 6665 unida operativamente a un promotor expresable en plantas, o una secuencia que tiene al menos 95, 96, 97, 98 o al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO. 11 de la posición de nucleótido 5382 a la posición de nucleótido 7459 o su complemento, o con la secuencia de la SEQ ID NO. 11 de la posición de nucleótido 5589 a la posición de nucleótido 6665 (cuando se une operativamente a un promotor expresable en plantas); en donde dicha secuencia codifica una proteína HPPD que proporciona tolerancia a herbicidas inhibidores de HPPD cuando se expresan en una planta, así como un ácido nucleico que comprende dicho gen *cry14Ab-1.b* quimérico y dicho gen *hppdPf-4Pa* quimérico. Estos ácidos nucleicos o genes son útiles para transformar plantas tales

como soja, algodón, maíz, arroz, colza y trigo, de modo que controlan los nematodos y/o tienen tolerancia a herbicidas inhibidores de HPPD.

También se proporciona en el presente documento una molécula de ADN quimérica que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 11 de la posición de nucleótido 131 a la posición de nucleótido 7941, o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la misma. En una realización, esta molécula de ADN codifica una proteína tolerante a un inhibidor de HPPD y una proteína que afecta de forma negativa a plagas vegetales de nematodos, tales como nematodos SCN, RKN o *Pratylenchus* spp. En una realización, esta molécula de ADN quimérica codifica la proteína de la SEQ ID NO. 8 o una proteína de control de nematodos al menos 99 % idéntica a la misma y la proteína de la SEQ ID NO. 10 o una proteína tolerante a inhibidor de HPPD al menos 99 % idéntica a la misma. También se proporcionan plantas, semillas o células, tales como plantas, semillas o células de soja, transformadas para contener dicha molécula de ADN y el uso de dicha molécula de ADN para hacer a las plantas o semillas, tales como plantas o semillas de soja, resistentes a nematodos y tolerantes a herbicidas inhibidores de HPPD.

La presente invención se refiere a una planta de soja transgénica, parte de planta, semilla, célula o tejido de la misma, que comprende, integrado de forma estable en su genoma, un casete de expresión que comprende un gen de resistencia a nematodos que comprende la secuencia codificante del gen *cry14Ab-1.b* y un gen de tolerancia a herbicida que comprende la secuencia codificante del gen *hppdPf-4Pa* (como se ha descrito en el Ejemplo 1.1 en el presente documento y como se representa en las SEQ ID NO. 7 y 9, respectivamente), que proporcionan resistencia a nematodos parasitarios de plantas tales como heterodera de la soja y tolerancia a un herbicida inhibidor de HPPD tal como isoxaflutol, topramezona o mesotriona. En ausencia de herbicida inhibidor de HPPD y presión por nematodos, dicha planta de soja tiene un rendimiento agrónomo que es sustancialmente equivalente a la línea isogénica no transgénica. Cuando se encuentran con presión por heterodera de la soja (SCN) que afecta al rendimiento de la planta en el campo, las plantas de la invención tendrán un fenotipo agronómico superior en comparación con una planta no transgénica. Además, en presencia de malas hierbas, después de la aplicación de un herbicida inhibidor de HPPD para el que se proporciona tolerancia, las plantas de la invención tendrán un fenotipo agronómico superior en comparación con plantas que no se trataron con herbicidas.

Según la presente invención, la planta de soja o semilla, células o tejidos de la misma comprenden el evento de élite EE-GM5. En una realización, el evento de élite EE-GM5 comprende la secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NO. 1, 3, 5 o 24, o la secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NO. 2, 4, 6 o 25, o cualquier secuencia esencialmente similar a las mismas. En una realización, EE-GM5 comprende la secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NO. 1, 3, 5 o 24 y la secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NO. 2, 4, 6 o 25, o cualquier secuencia esencialmente similar a las mismas, y la secuencia codificante de *cry14Ab-1.b* de la SEQ ID NO. 7 y la secuencia codificante de *hppdPf-4Pa* de la SEQ ID NO. 9, o secuencias esencialmente similares a las mismas. En una realización, el evento de élite EE-GM5 es un ADN-T insertado en una posición específica en el genoma de soja, como está contenida en la semilla de referencia depositada en la ATCC con el número de depósito PTA-123625. En una realización, dicho ADN-T en EE-GM5 comprende un gen quimérico que codifica Cry14Ab-1 y un gen que codifica HPPD-4. En otra realización, dicho evento está caracterizado por la secuencia de unión 5' de las SEQ ID NO. 1 o 3, o por la secuencia de unión 3' de las SEQ ID NO. 2 o 4; o por la secuencia de unión 5' de las SEQ ID NO. 1 o 3, y por la secuencia de unión 3' de las SEQ ID NO. 2 o 4. En una realización, el ADN genómico que contiene EE-GM5, cuando se analiza usando una reacción en cadena de la polimerasa ("PCR" en el presente documento) con dos cebadores que comprenden la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO. 12 y SEQ ID NO. 13 respectivamente, produce un fragmento de ADN de 85 pb. En una realización, el ADN genómico que contiene EE-GM5, cuando se analiza usando PCR con dos cebadores que comprenden la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO. 18 y SEQ ID NO. 19 respectivamente, produce un fragmento de ADN de 84 pb.

En una realización en el presente documento, se proporciona una planta de soja, célula, parte de planta, semilla o descendencia de la misma, donde cada una comprende el evento de élite EE-GM5 en su genoma, habiéndose depositado semillas de referencia que comprenden dicho evento en la ATCC con el número de depósito PTA-123625. En una realización, una planta o semilla que comprende EE-GM5 puede obtenerse mediante propagación de y/o cultivo con una planta de soja que ha crecido a partir de la semilla depositada en la ATCC con el número de depósito PTA-123625.

Más específicamente, la presente invención se refiere a una planta de soja transgénica, parte de planta, polen, semilla, célula o tejido de la misma, cuyo ADN genómico se caracteriza por el hecho de que, cuando se analiza en PCR como se

describe en el presente documento, usando al menos dos cebadores dirigidos a la región formada por una parte de la región flanqueante de ADN-T 5' o 3' de EE-GM5 y parte del ADN-T insertado, se amplifica un fragmento que es específico para el evento EE-GM5. Los cebadores pueden dirigirse contra la región flanqueante de ADN-T 3' en la SEQ ID NO. 6 o la SEQ ID NO. 25 o ADN genómico de planta de soja cadena abajo de la misma y contigua con la misma y el ADN-T insertado cadena arriba de la misma y contigua con la misma. Los cebadores también pueden dirigirse contra la región flanqueante de ADN-T 5' en la SEQ ID NO. 5 o la SEQ ID NO. 24 o ADN genómico de planta de soja cadena arriba de la misma y contigua con la misma y el ADN-T insertado cadena abajo de y contigua con la misma. En una realización, dichos cebadores comprenden o consisten (esencialmente) en la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO. 12 y SEQ ID NO. 13, o de las SEQ ID NO. 18 y SEQ ID NO. 19, o de las SEQ ID NO. 26 y SEQ ID NO. 28, o de las SEQ ID NO. 27 y SEQ ID NO. 29, respectivamente (por ejemplo, un par de cebadores que comprenden un cebador que contiene en su extremo 3' la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 12 y un cebador que contiene en su extremo 3' la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 13, o un par de cebadores que comprende un cebador que contiene en su extremo 3' la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 18 y un cebador que contiene en su extremo 3' la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 19, o un par de cebadores que comprenden un cebador que contiene en su extremo 3' la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 26 y un cebador que contiene en su extremo 3' la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 28, o un par de cebadores que comprenden un cebador que contiene en su extremo 3' la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 27 y un cebador que contiene en su extremo 3' la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 29) y producen un fragmento de ADN de entre 50 y 1000 pb, tal como un fragmento de 85 pb o de 84 pb.

La semilla de referencia que comprende el evento de élite de la invención se ha depositado en la ATCC con el número de referencia PTA-123625. Una realización de la invención es el evento de élite EE-GM5 contenido en la semilla depositada con el número de referencia PTA-123625, que, cuando se introduzca en una planta de soja, proporcionará resistencia a nematodos y tolerancia a herbicidas, en particular resistencia a heterodera de la soja (*Heterodera glycines*, "SCN" en el presente documento) y/o nematodo de las praderas (nematodo de las praderas como se usa en el presente documento se refiere a nematodos que son plagas de soja *Pratylenchus* spp., incluido, pero sin limitación, *Pratylenchus brachyurus*) y tolerancia a inhibidores

de HPPD tales como isoxaflutol, topramezona o mesotriona. Las plantas con EE-GM5 de la presente invención también controlan nematodo de los nudos de la raíz (nematodo de los nudos de la raíz como se usa en el presente documento se refiere a nematodos que son plagas de soja *Meloidogyne* spp., incluido, pero sin limitación, *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne arenaria*, *Meloidogyne hapla* o *Meloidogyne javanica*, o cualquier combinación de los mismos), nematodo reniforme (*Rotylenchulus reniformis*) y nematodo lanza (*Hoplolaimus* spp. tales como *H. columbus*, *H. galeatus* y *H. magnistylus*). Se incluyen en la presente invención variantes menores de este evento tales como un evento de soja con tolerancia a inhibidores de HPPD y resistencia a nematodo SCN que tiene una secuencia de nucleótidos con al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o al menos 99,9 % de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de EE-GM5 contenida en la semilla depositada en la ATCC con el número de depósito PTA-123625, o un evento de soja con tolerancia a inhibidores de HPPD y resistencia a nematodo SCN que tiene una secuencia de nucleótidos que difiere en 1 a 200, 1 a 150, 1 a 100, 1 a 75, 1 a 50, 1 a 30, 1 a 20, 1 a 10 o 1 a 5 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de EE-GM5 contenida en la semilla depositada del depósito de ATCC PTA-123625, o que tiene una secuencia de nucleótidos que difiere en 1 a 200, 1 a 150, 1 a 100, 1 a 75, 1 a 50, 1 a 30, 1 a 20, 1 a 10 o 1 a 5 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos formada por las siguientes secuencias de nucleótidos consecutivas (5' a 3'): SEQ ID NO. 5 o SEQ ID NO. 24, SEQ ID NO. 11 de la posición de nucleótido 188 a la posición de nucleótido 7101, y la SEQ ID NO. 6 o la SEQ ID NO. 25. En una realización, EE-GM5 comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o al menos 99,9 % de identidad de secuencia con la secuencia formada por las siguientes secuencias de nucleótidos consecutivas (5' a 3'): SEQ ID NO. 5 o 24, SEQ ID NO. 11 de la posición de nucleótido 188 a la posición de nucleótido 7101, y las SEQ ID NO. 6 o 25. Debido a la variación genética natural, se encuentran habitualmente diferencias de una única base de ADN y pequeñas inserciones y supresiones en secuencias de ADN homólogas (por ejemplo, polimorfismos de un único nucleótido (SNP)) en plantas de la misma especie (Zhu *et al.* (2003) Genetics 163:1123-1134).

La semilla del número de depósito de ATCC PTA-123625 es un lote de semillas puro de semillas transgénicas homocigotas para el evento de élite EE-GM5 de la invención, que crecerán hasta convertirse en plantas resistentes a nematodos, por lo que las plantas también son tolerantes a un inhibidor de HPPD tal como

isoxaflutol, topamezona o mesotriona. La semilla o semilla descendiente que puede obtenerse de la semilla depositada (por ejemplo, después del cruce con otras plantas de soja con un fondo genético diferente) puede sembrarse y las plantas en crecimiento pueden tratarse con un inhibidor de HPPD tal como isoxaflutol, topamezona o mesotriona como se describe en el presente documento o puede ensayarse para determinar la presencia de EE-GM5 como se describe en el presente documento para obtener plantas que comprenden el evento de élite de la invención. La invención se refiere además a células, semillas, tejidos, descendencia y descendientes de una planta que comprende el evento de élite de la invención que ha crecido a partir de la semilla depositada en la ATCC que tiene el número de referencia PTA-123625. La invención se refiere además a plantas que pueden obtenerse de (tal como por propagación de y/o cultivo con) una planta de soja que comprende el evento de élite de la invención (tal como una planta que ha crecido a partir de la semilla depositada en la ATCC que tiene el número de referencia PTA-123625 o una planta que comprende la secuencia codificante de HPPD-4 de la SEQ ID NO. 9 y la secuencia codificante de *cry14Ab-1.b* de la SEQ ID NO. 7 localizada entre la secuencia de las SEQ ID NO. 1, 3 o 5 y la secuencia de las SEQ ID NO. 2, 4 o 6, o una planta que comprende la secuencia codificante de *hppdPf-4Pa* de la SEQ ID NO. 9 y la secuencia codificante de *cry14Ab-1.b* de la SEQ ID NO. 7 localizada entre una cualquiera de las secuencias de las SEQ ID NO. 1, 3, 5 o 24 y la secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NO. 2, 4, 6 o 25). La invención también se refiere a plantas descendientes y semillas obtenidas de las plantas o semillas anteriores y que comprenden la secuencia de la SEQ ID NO. 1 y la secuencia de la SEQ ID NO. 2, o la secuencia de la SEQ ID NO. 3 y la secuencia de la SEQ ID NO. 4, o la secuencia de la SEQ ID NO. 5 y la secuencia de la SEQ ID NO. 6, o la secuencia de la SEQ ID NO. 24 y la secuencia de la SEQ ID NO. 25.

La invención se refiere además a un método para identificar una planta transgénica, o células o tejidos de la misma, que comprende el evento de élite EE-GM5, donde dicho método se basa en la identificación de la presencia de secuencias de ADN características o aminoácidos codificados por dichas secuencias de ADN en la planta, células o tejidos transgénicos. Según una realización preferida de la invención, dichas secuencias de ADN características son secuencias de 15 pb o al menos 15 pb, con preferencia 20 pb o al menos 20 pb, con mayor preferencia 30 pb o más que comprenden el sitio de inserción del evento, es decir, una secuencia que contiene tanto una parte del ADN-T insertado que contiene un inhibidor de HPPD y transgén de

resistencia a nematodos como una parte de la región flanqueante de ADN-T 5' o 3' contigua con la misma que se extiende al genoma de la planta de soja, lo que permite identificación específica del evento de élite. La invención también se refiere a plantas, semillas y células que comprenden el evento EE-GM5 como se identifica en el presente documento.

La presente invención se refiere además a métodos para identificar el evento de élite EE-GM5 en muestras biológicas, donde dichos métodos se basan en pares de cebadores o sondas que reconocen específicamente la secuencia flanqueante de ADN-T 5' y/o 3' y la secuencia de ADN-T insertada contigua con la misma en EE-GM5. También se incluye en el presente documento cualquier otro método para identificar EE-GM5, por ejemplo, para identificar sus secuencias características específicas, tales como secuenciación del genoma completa o parcial (dirigida).

De forma más específica, la invención se refiere a un método para identificar el evento de élite EE-GM5 en muestras biológicas que comprende amplificar una secuencia de un ácido nucleico presente en dichas muestras biológicas, usando una reacción en cadena de la polimerasa con al menos dos cebadores o una reacción en cadena de la polimerasa con al menos dos cebadores y una sonda, en donde uno de estos cebadores reconoce la región flanqueante de ADN-T 5' o 3' en EE-GM5, el otro cebador reconoce una secuencia en el ADN-T que comprende los genes de tolerancia a herbicidas y resistencia a nematodos que es contigua con dicha región flanqueante de ADN-T 5' o 3', con preferencia para obtener un fragmento de ADN de 50 a 1000 pb de tamaño. En una realización, un primer cebador reconoce la región flanqueante de ADN-T 5' en EE-GM5 y un segundo cebador reconoce una secuencia en el ADN-T que comprende los genes de tolerancia a herbicidas y resistencia a nematodos que es contigua con y cadena abajo de dicha región flanqueante de ADN-T 5' o un primer cebador reconoce la región flanqueante de ADN-T 3' en EE-GM5 y un segundo cebador reconoce una secuencia en el ADN-T que comprende los genes de tolerancia a herbicidas y resistencia a nematodos que es contigua con y cadena arriba de dicha región flanqueante de ADN-T 3', para obtener un fragmento de ADN característico para el evento de élite EE-GM5. En una realización, dicho método de reacción en cadena de la polimerasa comprende además el uso de una sonda que reconoce el ADN amplificado por dichos cebadores, por ejemplo, el ADN de unión que comprende parte del ADN-T insertado y parte del ADN que flanquea dicho ADN-T en EE-GM5 (en el lado 5' o 3' del evento, según sea aplicable, tal como una sonda que comprende la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO. 14 o 20 en el presente documento, o su

complemento), para detectar el producto de amplificación producido por dichos cebadores. Los cebadores pueden reconocer una secuencia en la región flanqueante de ADN-T 5' de EE-GM5 (SEQ ID NO. 5, de la posición de nucleótido 1 a la posición de nucleótido 166, o SEQ ID NO. 24 de la posición de nucleótido 1 a la posición de nucleótido 1113) o en la región flanqueante de ADN-T 3' de EE-GM5 (complemento de la SEQ ID NO. 6 de la posición de nucleótido 359 a la posición de nucleótido 691 o la SEQ ID NO. 25 de la posición de nucleótido 359 a la posición de nucleótido 1449) y una secuencia en el ADN-T insertado (SEQ ID NO. 5 de la posición de nucleótido 167 a 353, o SEQ ID NO. 6 de la posición de nucleótido 1 a la posición de nucleótido 358 o SEQ ID NO. 23 de la posición de nucleótido 1114 a 8572, o su complemento), respectivamente. El cebador que reconoce la región flanqueante de ADN-T 5' o 3' puede comprender la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO. 13, SEQ ID NO. 19, SEQ ID NO. 26 o SEQ ID NO. 27, y el cebador que reconoce una secuencia en el ADN-T insertado que comprende genes de resistencia a nematodos y tolerancia a herbicidas puede comprender la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 18, SEQ ID NO. 28 o SEQ ID NO. 29 descritas en el presente documento. La presente invención también se refiere a cualquier par de cebadores específico para el evento y el ADN específico amplificado usando dicho par de cebadores, como puede ser obtenido por una persona del oficio de nivel medio o como puede obtenerse de fuentes comerciales de las secuencias de eventos EE-GM5 proporcionadas en el presente documento o contenidas en la semilla depositada en la ATCC con el número de referencia PTA-123625.

La presente invención se refiere de forma más específica a un método para identificar el evento de élite EE-GM5 en muestras biológicas, donde dicho método comprende amplificar una secuencia de un ácido nucleico presente en una muestra biológica, usar una reacción en cadena de la polimerasa con dos cebadores que comprenden o consisten (esencialmente) en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 12 y la SEQ ID NO. 13 respectivamente, para obtener un fragmento de ADN de 85 pb o con dos cebadores que comprenden o consisten (esencialmente) en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 18 y la SEQ ID NO. 19 respectivamente, para obtener un fragmento de ADN de 84 pb. También se incluyen en la presente invención plantas que comprenden el evento de élite identificado de este modo EE-GM5.

La presente invención se refiere además a las secuencias flanqueantes de ADN-T específicas de EE-GM5 descritas en el presente documento, que pueden

usarse para desarrollar métodos específicos de identificación para EE-GM5 en muestras biológicas. Dichas secuencias flanqueantes de ADN-T específicas también pueden usarse como material de control de referencia en ensayos de identificación. De forma más particular, la invención se refiere a las regiones flanqueantes de ADN-T 5' y/o 3' de EE-GM5 que pueden usarse para el desarrollo de cebadores y sondas específicos como se describe adicionalmente en el presente documento. También son adecuadas como material de referencia moléculas de ácido nucleico, con preferencia de aproximadamente 150-850 pb, que comprenden la secuencia que puede amplificarse mediante cebadores que comprenden o consisten (esencialmente) en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 12 y la SEQ ID NO. 13 o de la SEQ ID NO. 18 y la SEQ ID NO. 19.

La invención se refiere además a métodos de identificación para determinar la presencia de EE-GM5 en muestras biológicas basados en el uso de dichos cebadores o sondas específicos. Los cebadores pueden comprender, consistir o consistir esencialmente en una secuencia de nucleótidos de 17 a aproximadamente 200 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 5 del nucleótido 1 al nucleótido 166 o la SEQ ID NO. 24 del nucleótido 1 al nucleótido 1113, o el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 6 del nucleótido 359 al nucleótido 691, o el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 25 del nucleótido 359 al nucleótido 1449, combinado con cebadores que comprenden, que consisten o que consisten esencialmente en una secuencia de nucleótidos de 17 a aproximadamente 200 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 11 del nucleótido 1 al nucleótido 7459 o la SEQ ID NO. 23 de la posición de nucleótido 1114 a la posición de nucleótido 8572, tal como una secuencia de nucleótidos de 17 a aproximadamente 200 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 5 del nucleótido 167 al nucleótido 353 o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 6 del nucleótido 1 al nucleótido 358, o su complemento. Los cebadores también pueden comprender estas secuencias de nucleótidos localizadas en su extremo 3' y comprenden además secuencias no relacionadas o secuencias procedentes de las secuencias de nucleótidos mencionadas, pero que comprenden desapareamientos. En una realización, los cebadores, como se usan en el presente documento, también pueden ser idénticos al ADN diana o su complemento, en donde dicho ADN diana es un híbrido que contiene secuencias de nucleótidos de diferentes orígenes, que no aparecen en dicha combinación en la naturaleza.

La invención se refiere además a kits para identificar el evento de élite EE-GM5 en muestras biológicas, donde dichos kits comprenden al menos un par de cebadores o una sonda que reconoce específicamente la región flanqueante de ADN-T 5' o 3' y el ADN-T insertado que comprende un gen de tolerancia a herbicidas y resistencia a nematodos contiguo con la misma en EE-GM5.

El kit de la invención puede comprender, además de un cebador que reconoce específicamente la región flanqueante de ADN-T 5' o 3' de EE-GM5, un segundo cebador que reconoce específicamente una secuencia en el ADN-T insertado que comprende un gen de tolerancia a herbicidas inhibidores de HPPD y resistencia a nematodos de EE-GM5, para su uso en un protocolo de identificación de PCR. Los kits de la invención pueden comprender al menos dos cebadores específicos, uno de los cuales reconoce una secuencia en la región flanqueante de ADN-T 5' de EE-GM5 o una secuencia en la región flanqueante de ADN-T 3' de EE-GM5 y el otro que reconoce una secuencia en el ADN-T insertado que comprende un gen de tolerancia a herbicidas inhibidores de HPPD y resistencia a nematodos. El cebador que reconoce la región flanqueante de ADN-T 5' puede comprender la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 19 y el cebador que reconoce el ADN-T insertado contiguo con dicha región flanqueante de ADN-T 5' puede comprender la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 18 o el cebador que reconoce la región flanqueante de ADN-T 3' puede comprender la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 13 y el cebador que reconoce el ADN-T insertado contiguo con dicha región flanqueante 3' puede comprender la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 12, o cualquier otro cebador o combinación de cebadores como se describe en el presente documento o que puede obtenerse de la descripción o el depósito de semillas. El kit puede comprender además una sonda que reconoce una secuencia localizada entre el cebador que reconoce la región flanqueante de ADN-T 5' y el cebador que reconoce la secuencia en el ADN-T insertado o que reconoce una secuencia entre el cebador que reconoce la región flanqueante de ADN-T 3' y el cebador que reconoce la secuencia en el ADN-T insertado, tal como una sonda que comprende la secuencia de la SEQ ID NO. 14 o una sonda que comprende la secuencia de la SEQ ID NO. 20.

La invención se refiere además a un kit para identificar el evento de élite EE-GM5 en muestras biológicas, donde dicho kit comprende los cebadores de PCR que comprenden o consisten (esencialmente) en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 12 y la SEQ ID NO. 13 o de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 18 y la SEQ ID NO. 19 para su uso en el protocolo de PCR de EE-GM5 descrito en el

presente documento. Dicho kit, que comprende los cebadores que comprenden o consisten (esencialmente) en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 12 y la SEQ ID NO. 13, puede comprender además una sonda que comprende o consiste (esencialmente) en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 14 y dicho kit que comprende los cebadores que comprenden o consisten (esencialmente) en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 18 y la SEQ ID NO. 19 puede comprender además una sonda que comprende o consiste (esencialmente) en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 20. Dicho kit puede comprender además tampón y reactivos tales como uno cualquiera o cada uno de los siguientes compuestos: dNTP, (Taq) ADN polimerasa, MgCl₂, estabilizadores y, opcionalmente, un colorante.

La invención también se refiere a un kit para identificar el evento de élite EE-GM5 en muestras biológicas, donde dicho kit comprende una sonda específica que comprende o consiste (esencialmente) en una secuencia que corresponde a (o es complementaria de) una secuencia que tiene de 80 % a 100 % de identidad de secuencia con una región específica de EE-GM5, en donde dicha región específica comprende parte de la región flanqueante de ADN-T 5' o 3' de EE-GM5 y parte del ADN-T insertado contiguo con la misma. En una realización, la secuencia de la sonda corresponde a una región específica que comprende parte de la región flanqueante de ADN-T 5' o 3' de EE-GM5 y parte del ADN-T insertado contiguo con la misma. Con más preferencia, la sonda específica comprende o consiste (esencialmente) en (o es complementaria de) una secuencia que tiene de 80 % a 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NO. 1, 3 o 5 o una secuencia que tiene de 80 % a 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NO. 2, 4 o 6, o la sonda específica comprende o consiste (esencialmente) en (o es complementaria de) una secuencia que tiene de 80 % a 100 % de identidad de secuencia con una parte de al menos 50 nucleótidos contiguos de la secuencia de la SEQ ID NO. 5 o una secuencia que tiene de 80 % a 100 % de identidad de secuencia con una parte de al menos 50 nucleótidos contiguos de la secuencia de la SEQ ID NO. 6, en donde cada una dichas partes de las SEQ ID NO. 5 o 6 comprende secuencias de ADN-T insertado y secuencias flanqueantes de ADN-T de longitud aproximadamente igual.

Según otro aspecto de la invención, se divulgan moléculas de ADN que comprenden suficiente longitud de polinucleótidos tanto de las secuencias flanqueantes de ADN-T como del ADN-T insertado de EE-GM5, para ser útiles como cebador o sonda para la detección de EE-GM5 o para caracterizar plantas que

comprenden el evento EE-GM5. Dichas secuencias pueden comprender uno cualquiera de al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20 o al menos 30 nucleótidos, o pueden comprender uno cualquiera de 9, 10, 15, 20 o 30 nucleótidos de la secuencia flanqueante de ADN-T y un número similar de nucleótidos del ADN-T insertado de EE-GM5, en cada lado del sitio de unión, respectivamente, y este en uno o ambos del sitio de unión 5' y 3' del evento de EE-GM5. Con mayor preferencia, dichas moléculas de ADN comprenden la secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NO. 1, 3 o 5 o la secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NO. 2, 4 o 6. En una realización, dichas moléculas de ADN comprenden la secuencia de las SEQ ID NO. 23, 24 o 25. En un aspecto de la invención, se proporcionan plantas y semillas de soja que comprenden dichas moléculas de ADN específicas.

Los métodos y kits abarcados por la presente invención pueden usarse para diferentes fines tales como, pero sin limitación, los siguientes: identificar la presencia o determinar el umbral (menor) de EE-GM5 en plantas, material vegetal o en productos tales como, pero sin limitación, productos alimentarios o de piensos (frescos o procesados) que comprenden o proceden de material vegetal; adicionalmente o como alternativa, los métodos y kits de la presente invención pueden usarse para identificar material de plantas transgénicas para fines de segregación entre material transgénico y no transgénico; adicionalmente o como alternativa, los métodos y kits de la presente invención pueden usarse para determinar la calidad (es decir, porcentaje de material puro) de material vegetal que comprende EE-GM5.

La invención se refiere además a las regiones flanqueantes de ADN-T 5' y/o 3' de EE-GM5, así como a los cebadores y sondas específicos desarrollados a partir de las secuencias flanqueantes de ADN-T 5' y/o 3' de EE-GM5.

La invención también se refiere a ADN genómico obtenido de plantas que comprenden el evento de élite EE-GM5, en particular ADN genómico que comprende secuencias específicas del evento EE-GM5, tales como una o ambas de las secuencias de unión de EE-GM5 (que contienen una parte del ADN flanqueante de ADN-T y ADN-T insertado contiguo con la misma, característica de EE-GM5), por ejemplo, una cualquiera de las secuencias de las SEQ ID NO. 1, 3, 5 o 24 y/o una cualquiera de las secuencias de las SEQ ID NO. 2, 4, 6 o 25. Dicho ADN genómico puede usarse como material de control de referencia en los ensayos de identificación descritos en el presente documento.

También se proporciona en el presente documento una planta de soja transgénica resistente a nematodos y tolerante a herbicidas, o células, partes, semillas

o descendencia de la misma, que comprenden cada uno al menos un evento de élite, donde dicho evento de élite comprende un ADN-T insertado que comprende:

i) un primer gen quimérico que comprende un gen *cry14Ab-1.b* procedente de *Bacillus thuringiensis* que codifica una proteína Cry14Ab-1 bajo el control de un promotor expresable en plantas, tal como un gen quimérico que comprende un promotor expresable en plantas y la secuencia codificante de la SEQ ID NO. 7 y

ii) un segundo gen quimérico que comprende un gen *hppdPf-4Pa* modificado de *Pseudomonas* que codifica una enzima HPPD más tolerante bajo el control de un promotor expresable en plantas, tal como un gen quimérico que comprende un promotor expresable en plantas y la secuencia codificante de la SEQ ID NO. 9.

En una realización, dicho evento de élite comprende los nucleótidos 1 a 166 de la SEQ ID NO. 5 o de 1 a 1113 de la SEQ ID NO. 24 inmediatamente cadena arriba de y contiguos con dicho ADN-T insertado y nucleótidos de 359 a 691 de la SEQ ID NO. 6 o nucleótidos 359 a 1449 de la SEQ ID NO. 25 inmediatamente cadena abajo de y contiguos con dicho ADN-T insertado.

En una realización adicional, dicho evento de élite puede obtenerse cultivando con una planta de soja que ha crecido a partir de la semilla de referencia que comprende dicho evento que se ha depositado en la ATCC con el número de depósito PTA-123625.

En otra realización, el ADN genómico de dicha planta de soja, o células, partes, semillas o descendencia de la misma cuando se analiza usando PCR con dos cebadores que comprenden la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 12 y la SEQ ID NO. 13 respectivamente, produce un fragmento de ADN de 85 pb, o cuando se analiza usando PCR con dos cebadores que comprenden la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 18 y la SEQ ID NO. 19 respectivamente, produce un fragmento de ADN de 84 pb.

También se proporciona en el presente documento un método para identificar una planta de soja transgénica, o células, partes, semillas o descendencia de la misma con resistencia a nematodos, tal como resistencia a nematodos SCN y/o *Pratylenchus* y/o de nudos de las raíces y/o reniformes, y tolerancia a un herbicida inhibidor de HPPD, tal como isoxaflutol, topramezona o mesotriona, en muestras biológicas, donde dicho método comprende amplificar un fragmento de entre 50 y 150 pb de un ácido nucleico presente en muestras biológicas usando una reacción en cadena de la polimerasa con al menos dos cebadores, donde uno de dichos cebadores reconoce la región flanqueante de ADN-T 5' del evento de élite EE-GM5, donde dicha región

flanqueante de ADN-T 5' comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 5 del nucleótido 1 al nucleótido 166 o de la SEQ ID NO. 24 del nucleótido 1 al nucleótido 1113, o reconoce la región flanqueante de ADN-T 3' de dicho evento de élite, en donde dicha región flanqueante de ADN-T 3' comprende la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO. 6 del nucleótido 359 al nucleótido 691, o la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO. 25 del nucleótido 359 al nucleótido 1449, el otro cebador de dichos cebadores reconoce una secuencia en el ADN-T insertado que comprende la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO. 5 del nucleótido 167 al nucleótido 353 o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 6 del nucleótido 1 al nucleótido 358, o donde dicho ADN-T insertado comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 11 de la posición de nucleótido 1 a la posición de nucleótido 7459, o su complemento.

También se proporciona en el presente documento un kit para identificar una planta de soja transgénica, o células, partes, semillas o descendencia de la misma con resistencia a nematodos y tolerancia a un herbicida inhibidor de HPPD, en muestras biológicas, donde dicho kit comprende un cebador que reconoce la región flanqueante de ADN-T 5' del evento de élite EE-GM5, donde dicha región flanqueante de ADN-T 5' comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 5 del nucleótido 1 al nucleótido 166, o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 24 del nucleótido 1 al nucleótido 1113, o un cebador que reconoce la región flanqueante de ADN-T 3' de dicho evento de élite, donde dicha región flanqueante de ADN-T 3' comprende la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO. 6 del nucleótido 359 al nucleótido 691, o la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO. 25 del nucleótido 359 al nucleótido 1449, y que reconoce un cebador una secuencia en el ADN-T insertado, donde dicho ADN-T insertado comprende la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO. 5 del nucleótido 167 al nucleótido 353 o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 6 del nucleótido 1 al nucleótido 358, o dicho ADN-T insertado que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 11 de la posición de nucleótido 1 a la posición de nucleótido 7459, o su complemento.

En una realización de la invención, el ADN-T insertado del evento de élite EE-GM5, como se usa en el presente documento, comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 5 del nucleótido 167 al nucleótido 353 o su complemento, y la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 6 del nucleótido 359 al nucleótido 691 o su complemento, o comprende una secuencia con al menos 95, 98, 99, 99,5 o 99,9 % de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 11 de la

posición de nucleótido 7 a la posición de nucleótido 7459, o su complemento.

También se proporciona en el presente documento una planta, célula de planta, tejido o semilla de soja que comprende en su genoma una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de las SEQ ID NO. 1, 3, 5 o 24 o una secuencia de nucleótidos de 80 a 100 % de identidad de secuencia con la misma y/o las SEQ ID NO. 2, 4, 6 o 25, o una secuencia de nucleótidos de 80 a 100 % de identidad de secuencia con la misma, y una secuencia de nucleótidos con al menos 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99, 99,5 o al menos 99,9 % de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 11 de la posición de nucleótido 188 a la posición de nucleótido 7101 o su complemento.

Una realización de la presente invención proporciona una planta, célula de planta, tejido o semilla de soja que comprende en su genoma una molécula de ácido nucleico que hibrida en condiciones de rigurosidad convencionales con la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de las SEQ ID NO. 1, 3 o 5 o su complemento, o que hibrida con la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de las SEQ ID No. 2, 4 o 6 o su complemento.

También se proporciona en el presente documento una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de las SEQ ID NO. 1, 3, 5 o 24, o su complemento, o con al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de las SEQ ID NO. 2, 4, 6 o 25, o su complemento, o una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones de rigurosidad convencionales con la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de las SEQ ID NO. 1, 3, 5 o 24, o su complemento, o con la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de las SEQ ID NO. 2, 4, 6 o 25, o su complemento.

También se proporciona en el presente documento una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 7, o su complemento, o una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones de rigurosidad convencionales con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 7, o su complemento, en donde dicha molécula de ácido nucleico codifica una toxina nematocida activa frente a heterodermas y/o nematodos de las praderas y/o

nematodos de los nudos de la raíz y/o nematodo reniforme, tales como *Heterodera glycines* y/o *Pratylenchus brachyurus* y/o *Meloidogyne incognita* y/o *Rotylenchulus reniformis*. En una realización, dicha molécula de ácido nucleico está unida operativamente a una molécula de ácido nucleico que comprende un promotor expresable en plantas (heterólogo) para formar un gen quimérico. También se proporciona en el presente documento el uso de dicha molécula de ácido nucleico en plantas o semillas transformadas para controlar nematodos patógenos para plantas de control. Se proporciona además en el presente documento un método para controlar nematodos de los nudos de la raíz tales como *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne arenaria*, *Meloidogyne hapla* o *Meloidogyne javanica*, en particular *Meloidogyne incognita*, que comprende usar una proteína Cry14Ab o un ADN que codifica una proteína Cry14Ab o una planta o semilla que contiene dicho ADN bajo el control de un promotor expresable en plantas, en donde dicha proteína Cry14Ab es la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 8 o una proteína con al menos 96 % o al menos 98 o al menos 99 % de identidad de secuencia con la misma, o una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 8 de la posición de aminoácido 1 a la posición de aminoácido 706, o una proteína con al menos 96 % o al menos 98 o al menos 99 % de identidad de secuencia con la misma. Se proporciona además en el presente documento un método para controlar nematodos reniformes (*Rotylenchulus reniformis*), que comprende usar una proteína Cry14Ab o un ADN que codifica una proteína Cry14Ab, o una planta o semilla que contiene dicho ADN, bajo el control de un promotor expresable en plantas, en donde dicha proteína Cry14Ab es la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 8 o una proteína con al menos 96 % o al menos 98 o al menos 99 % de identidad de secuencia con la misma, o una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 8 de la posición de aminoácido 1 a la posición de aminoácido 706, o una proteína con al menos 96 % o al menos 98 o al menos 99 % de identidad de secuencia con la misma.

También se proporciona en el presente documento una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 11 de la posición de nucleótido 131 a la posición de nucleótido 7941, o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la misma, en donde dicha molécula de ácido nucleico codifica una proteína Cry14Ab nematocida y una proteína HPPD tolerante a inhibidores de HPPD. En una realización, esa molécula de ácido nucleico

codifica la proteína de la SEQ ID NO. 8 o una proteína al menos 99 % idéntica a la misma y la proteína de la SEQ ID NO. 10 o una proteína al menos 99 % idéntica a la misma.

También se proporciona en el presente documento una célula de planta de soja que comprende en su genoma el evento de élite EE-GM5 que es un ADN extraño o un ADN-T insertado en un locus definido, en donde el evento de élite EE-GM5 es como el contenido en la semilla de referencia depositada en la ATCC con el número de depósito PTA-123625, en donde dicho ADN-T insertado comprende un gen quimérico que codifica Cry14Ab-1 y un gen quimérico que codifica HPPD-4, y en donde dicho evento de élite se caracteriza por la secuencia de unión 5' de la SEQ ID NO. 1 o 3 y por la secuencia de unión 3' de la SEQ ID NO. 2 o 4; o célula de este tipo que es una célula de semilla, o célula de este tipo, en donde el ADN genómico de dicha célula, cuando se analiza usando PCR con dos cebadores que comprenden la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID 12 y la SEQ ID 13 respectivamente, produce un fragmento de ADN de 85 pb.

La invención proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos del evento de élite EE-GM5 como está contenido en la semilla de referencia depositada en la ATCC con el número de depósito PTA-123625, en donde dicho evento de élite comprende un gen que codifica Cry14Ab-1 y un gen que codifica HPPD-4 y comprende la secuencia de las SEQ ID NO. 1 o 3 y la secuencia de las SEQ ID NO. 2 o 4.

La invención también proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende en orden las siguientes secuencias de nucleótidos: a) la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 5 del nucleótido 1 al 166 o una secuencia al menos 99 % idéntica a la misma, b) la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 11 del nucleótido 188 al nucleótido 7101 o una secuencia al menos 99 % idéntica a la misma, y c) la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 6 del nucleótido 359 al nucleótido 691 o una secuencia al menos 99 % idéntica a la misma, tal como una molécula de ácido nucleico de este tipo que comprende la secuencia b) que es al menos 99,5 % o al menos 99,9 % idéntica a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 11 del nucleótido 188 al nucleótido 7101.

La invención también proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende en orden las siguientes secuencias de nucleótidos: a) la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 24 del nucleótido 1 al 1113 o una secuencia al menos 99 % idéntica a la misma, b) la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 23 del

nucleótido 1114 al nucleótido 8572 o una secuencia al menos 99 % idéntica a la misma, y c) la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 25 del nucleótido 359 al nucleótido 1449 o una secuencia al menos 99 % idéntica a la misma, tal como una molécula de ácido nucleico de este tipo que comprende una secuencia b) que es al menos 99,5 % o al menos 99,9 % idéntica a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 23. De acuerdo con la invención también se proporciona un método para producir un producto de soja, que comprende obtener semilla de soja que comprende el evento de élite EE-GM5 como se ha descrito anteriormente y producir el producto de soja a partir de la misma. En una realización, el producto de soja en dicho método es o comprende harina de soja, semillas molidas, harina fina o copos, o aceite de soja, proteína de soja, lecitina, leche de soja, tofu, margarina, biodiésel, biocompuesto, adhesivo, disolvente, lubricante, limpiador, espuma, pintura, tinta, vela o un producto alimentario o de pienso que contiene aceite de soja o proteína de soja. En otra realización, dicho producto de soja comprende un ácido nucleico específico para el evento de élite EE-GM5. En una realización, dicho ácido nucleico específico para el evento de élite EE-GM5 comprende la secuencia de las SEQ ID NO. 1 o 3 o la secuencia de las SEQ ID NO. 2 o 4.

También se proporciona en el presente documento un producto de soja producido a partir de la semilla que comprende el evento de élite EE-GM5 como se ha descrito anteriormente, en donde dicho producto de soja es o comprende harina de soja, semillas molidas, harina fina o copos, y comprende ácidos nucleicos específicos para el evento de élite EE-GM5, en donde dichos ácidos nucleicos son detectables usando los métodos descritos en el presente documento. En una realización, dicho ácido nucleico específico para el evento de élite EE-GM5 comprende la secuencia de las SEQ ID NO. 1 o 3 o la secuencia de las SEQ ID NO. 2 o 4. En otra realización, dicho ácido nucleico específico para el evento de élite EE-GM5 comprende la secuencia de las SEQ ID NO. 5 o 24 o la secuencia de las SEQ ID NO. 6 o 25. En una realización, dicho ácido nucleico específico para el evento de élite EE-GM5 comprende la secuencia de las SEQ ID NO. 5 o 24 y la secuencia de las SEQ ID NO. 6 o 25.

También se proporciona en el presente documento el uso de semilla de soja que comprende el evento de élite EE-GM5 para obtener un producto de soja, en donde dicho evento de élite comprende la secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NO. 1, 3, 5 o 24 y/o la secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NO. 2, 4, 6 o 25. En una realización, en dicho uso, el producto de soja es uno cualquiera de harina de soja, semillas de soja molidas, harina fina de soja o copos de soja.

Además, se proporciona en el presente documento un método para producir una planta o semilla de soja que comprende el evento de élite EE-GM5 combinado con otro locus/gen de resistencia a SCN, tal como combinando el evento de élite EE-GM5 con otro locus/gen de resistencia a SCN que aparece en la misma planta/semilla de soja y plantar la semilla que comprende EE-GM5 y dicho otro locus/gen de resistencia a SCN. En una realización, las plantas, células o semillas de la invención contienen uno o más loci/genes de resistencia a SCN que aparecen en soja, para obtener una combinación de fuentes de resistencia a SCN diferentes en las plantas, células o semillas de soja de la invención. Se conocen varios loci o genes de resistencia a SCN de soja y uno o más de ellos puede combinarse con EE-GM5 en la misma planta, célula o semilla, tal como uno cualquiera de los genes/loci de resistencia a SCN de las fuentes de resistencia PI 88788, PI 548402 (Peking), PI 437654 (Hartwig o CystX®), o cualquier combinación de los mismos, o uno o más de los loci/genes de resistencia SCN nativos *rhg1*, *rhg1-b*, *rhg2*, *rhg3*, *Rhg4*, *Rhg5*, qSCN11, cqSCN-003, cqSCN-005, cqSCN-006, cqSCN-007, o cualquiera de los loci de resistencia a SCN identificados en uno cualquiera de los cromosomas de soja 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 de cualquier combinación de los mismos (Kim *et al.* 2016, Theor. Appl. Genet. 129(12):2295-2311; Kim y Diers 2013, Crop Science 53:775-785; Kazi *et al.* 2010, Theor. Appl. Gen. 120(3):633-644; Glover *et al.* 2004, Crop Science 44(3):936-941; www.soybase.org; Concibido *et al.* 2004, Crop Science 44:1121-1131; Webb *et al.* 1995, Theor. Appl. Genet. 91:574-581). Además, en una realización, las plantas o semillas de la invención contienen EE-GM5 cuando se combinan con uno o más loci de resistencia a SCN en soja obtenida de una cualquiera de las fuentes de resistencia a SCN PI 548316, PI 567305, PI 437654, PI 90763, PI 404198B, PI 88788, PI 468916, PI 567516C, PI 209332, PI 438489B, PI 89772, Peking, PI 548402, PI 404198A, PI 561389B, PI 629013, PI 507471, PI 633736, PI 507354, PI 404166, PI 437655, PI 467312, PI 567328, PI 22897 o PI 494182. La Tabla 3 incluida en la presente proporciona una lista exhaustiva de referencias de soja indicadas como resistentes a SCN, de las que los genes/loci de resistencia a SCN (uno o varios) pueden combinarse con EE-GM5 de la invención en la misma planta, célula o semilla de soja.

Tabla 3.

FC 21340	PI 404192C	PI 438498	PI 507451	PI 548974	PI 567771C	PI 68465
FC 31685	PI 404198A	PI 438503A	PI 507470	PI 548975	PI 567773	PI 68622
PI 101404A	PI 404198B	PI 458506	PI 507471	PI 548981	PI 603587A	PI 70027
PI 153229	PI 407022	PI 458510	PI 507475	PI 548982	PI 605743B	PI 70213
PI 153297	PI 407221	PI 458519A	PI 507476	PI 548988	PI 606416A	PI 70229

PI 153303	PI 407729	PI 458520	PI 507686C	PI 549031	PI 606420	PI 70251
PI 157430	PI 416762	PI 461509	PI 509095	PI 553040	PI 606424	PI 70519
PI 157444	PI 417091	PI 464888A	PI 509100	PI 553047	PI 606430	PI 71161
PI 16790	PI 423927	PI 464910	PI 511813	PI 559370	PI 606435	PI 79620
PI 17852-B	PI 424387	PI 464912	PI 518772	PI 561389B	PI 606436	PI 79712
PI 181558	PI 424595	PI 464925B	PI 522186	PI 56563	PI 606437	PI 80834-2
PI 200495	PI 437654	PI 467312	PI 522236	PI 567305	PI 606439	PI 82308
PI 209332	PI 437655	PI 467327	PI 533605	PI 567325B	PI 606441	PI 84664
PI 22897	PI 437679	PI 467332	PI 540556	PI 567328	PI 606443	PI 84751
PI 232993	PI 437690	PI 468903	PI 543855	PI 567333A	PI 612610	PI 84807
PI 303652	PI 437725	PI 468915	PI 54620-2	PI 567354	PI 612611	PI 84896
PI 339868B	PI 437770	PI 468916	PI 548316	PI 567360	PI 612612A	PI 87631-1
PI 339871A	PI 437793	PI 468916	PI 548349	PI 567387	PI 612614	PI 88788
PI 346298	PI 437844A	PI 494182	PI 548376	PI 567488B	PI 612615	PI 89008
PI 347544A	PI 437904	PI 495017C	PI 548402	PI 567491A	PI 612616	PI 89772
PI 371610	PI 438342	PI 506862	PI 548402S	PI 567516C	PI 612617A	PI 89783
PI 378690	PI 438489B	PI 507354	PI 548456	PI 567676A	PI 62202	PI 90763
PI 398682	PI 438491	PI 507422	PI 548655	PI 567726	PI 629013	PI 91102
PI 399061	PI 438496B	PI 507423	PI 548665	PI 567737	PI 633736	PI 92576
PI 404166	PI 438497	PI 507443	PI 548970	PI 567741	PI 63468	PI 92595
						PI 96549

También se proporciona en el presente documento un método para proteger plantas de soja emergentes de la competencia por malas hierbas, que comprende tratar un campo en el que se sembraron semillas que contenían el evento de élite EE-GM5 como se ha descrito anteriormente, con un herbicida inhibidor de HPPD, en donde las plantas son tolerantes al herbicida inhibidor de HPPD. En una realización, en dicho método, el herbicida inhibidor de HPPD es isoxaflutol, topramezona o mesotriona.

También se proporciona en el presente documento un método para proteger plantas de soja emergentes de la competencia por malas hierbas, que comprende tratar un campo para plantar con plantas de soja que comprenden el evento de élite EE-GM5, como se ha descrito anteriormente, con un herbicida inhibidor de HPPD, antes de plantar las plantas de soja o sembrar las semillas, seguido de plantar o sembrar dichas plantas o semillas de soja en dicho campo pretratado, en donde las plantas son tolerantes al herbicida inhibidor de HPPD.

También se proporciona en el presente documento un método para controlar malas hierbas en un campo de plantas de soja que comprenden el evento de élite EE-GM5 como se ha descrito anteriormente, que comprende tratar dicho campo con una cantidad eficaz de un herbicida inhibidor de HPPD, en donde las plantas son tolerantes a dicho herbicida.

También se proporciona adicionalmente en el presente documento el uso de una planta de soja transgénica, semilla o descendencia de la misma, para controlar

malas hierbas en un campo de soja, en donde cada una de dicha planta, semilla o descendencia comprende el evento de élite EE-GM5 en su genoma, en donde EE-GM5 que es un ADN-T en un locus definido, como está contenido en la semilla de referencia depositada en la ATCC con el número de depósito PTA-123625, en donde dicho ADN-T comprende un gen quimérico que codifica Cry14Ab-1 y un gen quimérico que codifica HPPD-4, y en donde dicho evento de élite se caracteriza por la secuencia de unión 5' de la SEQ ID NO. 1 o 3 y por la secuencia de unión 3' de las SEQ ID NO. 2 o 4. En una realización, en dicho uso, la planta de soja transgénica, semilla o descendencia de la misma es resistente a nematodos y/o tolerante a un herbicida inhibidor de HPPD. En una realización, dicho ADN-T comprende un gen quimérico que codifica Cry14Ab-1 y un gen quimérico que codifica HPPD-4, y dicho evento de élite se caracteriza por la secuencia de unión 5' de las SEQ ID NO. 5 o 24 y por la secuencia de unión 3' de las SEQ ID NO. 6 o 25.

También se proporciona en el presente documento el uso de una planta o semilla de soja que comprende el evento de élite EE-GM5 en su genoma para cultivar una planta resistente a nematodos y/o tolerante a herbicidas, en donde dicho evento de élite EE-GM5 es un ADN-T insertado en un locus definido, como está contenido en la ATCC con el número de depósito PTA-123625, en donde dicho ADN-T insertado comprende un gen quimérico que codifica Cry14Ab-1 y un gen quimérico que codifica HPPD-4, y en donde dicho evento de élite se caracteriza por la secuencia de unión 5' de las SEQ ID NO. 1 o 3 y por la secuencia de unión 3' de las SEQ ID NO. 2 o 4. En una realización, en dicho uso, la planta o semilla de soja transgénica es resistente a nematodos SCN y/o tolerante a un herbicida inhibidor de HPPD. En una realización, dicho ADN-T comprende un gen quimérico que codifica Cry14Ab-1 y un gen quimérico que codifica HPPD-4, y dicho evento de élite se caracteriza por la secuencia de unión 5' de las SEQ ID NO. 5 o 24 y por la secuencia de unión 3' de las SEQ ID NO. 6 o 25.

También se proporciona en el presente documento el uso de una semilla de soja que comprende el evento de élite EE-GM5 para obtener un producto de soja, en donde EE-GM5 es como se ha descrito anteriormente.

También se proporciona en el presente documento un método para producir una planta o semilla de soja que comprende el evento de élite EE-GM5, que comprende cruzar una planta que comprende EE-GM5 con otra planta de soja y plantar la semilla que comprende EE-GM5 obtenida de dicho cruce. En una realización, dicho método incluye la etapa de aplicación de un herbicida inhibidor de HPPD en dicha semilla o planta.

De acuerdo con la presente invención, también se proporciona el uso de una semilla de soja que comprende el evento de élite EE-GM5 como se ha descrito anteriormente, y un herbicida inhibidor de HPPD, para controlar malas hierbas en un campo de soja, y el uso de una semilla de soja que comprende el evento de élite EE-GM5 en un método de cultivo de sojas tolerantes a herbicidas inhibidores de HPPD, en donde dicha semilla es como se ha descrito anteriormente.

Se proporciona además en el presente documento el uso del evento de élite EE-GM5 como se ha descrito anteriormente para conferir resistencia a nematodos y/o tolerancia a un herbicida inhibidor de HPPD a una planta o semilla de soja, o el uso de una planta o semilla de soja que comprende el evento de élite EE-GM5, en combinación con un herbicida inhibidor de HPPD, para sojas en crecimiento.

También se proporciona en el presente documento un par de cebadores específico para EE-GM5, así como kits o métodos que usan dicho par de cebadores, en donde al menos un cebador de dicho par está marcado (tal como con un resto detectable o explorable) o en donde el extremo 5' de al menos uno de dichos cebadores comprende uno o más desapareamientos o una secuencia de nucleótidos no relacionada con las secuencias flanqueantes 5' o 3' de EE-GM5 o no relacionada con la secuencia de ADN-T de EE-GM5; o en donde al menos uno de dichos cebadores comprende una secuencia de nucleótidos en su extremo 3' que abarca la región de unión entre las secuencias flanqueantes de ADN-T y las secuencias de ADN-T, donde dicha región de unión está en los nucleótidos 166-167 en la SEQ ID NO. 5, nucleótidos 1113-1114 en la SEQ ID NO. 24 o en los nucleótidos 358-359 en las SEQ ID NO. 6 o 25, siempre que los 17 nucleótidos consecutivos en el extremo 3' no procedan exclusivamente del ADN-T o secuencias flanqueantes de ADN-T en las SEQ ID NO. 5 o 24, o 6 o 25; o en donde al menos uno de dichos cebadores comprende una secuencia que es entre 80 y 100 % idéntica a una secuencia en la región flanqueante 5' o 3' de EE-GM5 o en el ADN-T insertado de EE-GM5, respectivamente, y dicha secuencia de cebadores comprende al menos un desapareamiento con dicha región flanqueante 5' o 3' o dicho ADN-T, siempre que el al menos un desapareamiento aún permita la identificación específica del evento de élite EE-GM5 con estos cebadores en condiciones de detección optimizadas (por ejemplo, condiciones de PCR optimizadas); o en donde la secuencia de nucleótidos de al menos uno de dichos cebadores comprende la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico fusionado con un ácido nucleico de otro origen, o su complemento.

Otras realizaciones según la invención se resumen en los siguientes párrafos:

1. Un método para identificar el evento de élite EE-GM5 en muestras biológicas, donde dicho método comprende la detección de una región específica de EE-GM5 con un par de cebadores específicos o sonda que reconoce(n) (al menos una parte de) la región flanqueante de ADN-T 5' o 3' y (al menos una parte de) el ADN-T insertado contiguo con la misma en EE-GM5.
2. El método del párrafo 1, donde dicho método comprende amplificar un fragmento de ADN de entre 50 y 1000 pb de un ácido nucleico presente en dichas muestras biológicas usando una reacción en cadena de la polimerasa con al menos dos cebadores, donde uno de dichos cebadores reconoce la región flanqueante de ADN-T 5' en EE-GM5, donde dicha región flanqueante de ADN-T 5' comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 5 del nucleótido 1 al nucleótido 166 o de la SEQ ID NO. 24 del nucleótido 1 al nucleótido 1113, o reconoce la región flanqueante de ADN-T 3' en EE-GM5, donde dicha región flanqueante de ADN-T 3' comprende la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO. 6 del nucleótido 359 al nucleótido 691 o la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO. 25 del nucleótido 359 al nucleótido 1449, donde el otro cebador de dichos cebadores reconoce una secuencia en el ADN-T insertado que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 5 del nucleótido 167 al nucleótido 353, o su complemento, o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 6 del nucleótido 1 al nucleótido 358, o su complemento, o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 23 del nucleótido 1114 al nucleótido 8572, o su complemento.
3. El método del párrafo 2, en donde dicho cebador que reconoce la región flanqueante de ADN-T 5' comprende una secuencia de nucleótidos de 17 a 200 nucleótidos consecutivos seleccionada de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 5 del nucleótido 1 al nucleótido 166 o de la SEQ ID NO. 24 del nucleótido 1 al nucleótido 1113, o dicho cebador que reconoce la región flanqueante de ADN-T 3' de EE-GM5 comprende una secuencia de nucleótidos de 17 a 200 nucleótidos consecutivos seleccionada de la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO. 6 del nucleótido 359 al nucleótido 691 o la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO. 25 del nucleótido 359 al nucleótido 1449 y dicho cebador que reconoce una secuencia en el ADN-T insertado comprende de 17 a 200 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 5

del nucleótido 167 al nucleótido 353, o su complemento, o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 6 del nucleótido 1 al nucleótido 358, o su complemento, o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 11 del nucleótido 1 al nucleótido 7459, o su complemento, o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 23 del nucleótido 1114 al nucleótido 8572, o su complemento.

4. El método del párrafo 2, en donde dicho cebador que reconoce la región flanqueante de ADN-T 5' comprende en su extremo 3' una secuencia de nucleótidos de al menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionada de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 5 del nucleótido 1 al nucleótido 166 o de la SEQ ID NO. 24 del nucleótido 1 al nucleótido 1113, o dicho cebador que reconoce la región flanqueante de ADN-T 3' de EE-GM5 comprende en su extremo 3' una secuencia de nucleótidos de al menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionada de la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO. 6 del nucleótido 359 al nucleótido 691 o la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO. 25 del nucleótido 359 al nucleótido 1449 y dicho cebador que reconoce una secuencia en el ADN-T insertado comprende en su extremo 3' al menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionados del complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 5 del nucleótido 167 al nucleótido 353, o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 6 del nucleótido 1 al nucleótido 358, o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 11 del nucleótido 1 al nucleótido 7459, o su complemento, o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 23 del nucleótido 1114 al nucleótido 8572, o su complemento.
5. El método del párrafo 4, en donde dichos cebadores comprenden la secuencia de la SEQ ID NO. 12 y la SEQ ID NO. 13, respectivamente, o a secuencia de la SEQ ID NO. 18 y la SEQ ID NO. 19, respectivamente.
6. El método del párrafo 5, dicho método comprende amplificar un fragmento específico de EE-GM5 de 85 u 84 pb usando PCR.
7. El método de uno cualquiera de los párrafos 2 a 6, que comprende además la etapa de hibridar una sonda específica para el fragmento de ADN amplificado con dichos al menos dos cebadores.
8. El método del párrafo 7, en donde dicha sonda reconoce parte de dicha región flanqueante de ADN-T 5' y parte del ADN-T insertado contiguo con la misma o en donde dicha sonda reconoce parte de dicha región flanqueante de ADN-T 3'

y parte del ADN-T insertado contiguo con la misma o reconoce parte de dicha región flanqueante de ADN-T 5' y parte del ADN-T insertado contiguo con la misma, tal como en donde dicha sonda comprende la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO. 1 o 3 o las SEQ ID NO. 2 o 4.

9. El método del párrafo 8, en donde dichos cebadores comprenden la secuencia de la SEQ ID NO. 12 y la SEQ ID NO. 13, respectivamente, y en donde dicha sonda comprende la secuencia de la SEQ ID NO. 14 o en donde dichos cebadores comprenden la secuencia de la SEQ ID NO. 18 y la SEQ ID NO. 19, respectivamente, y en donde dicha sonda comprende la secuencia de la SEQ ID NO. 20.
10. Un kit que comprende un cebador que reconoce la región flanqueante de ADN-T 5' de EE-GM5, donde dicha región flanqueante de ADN-T 5' comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 5 del nucleótido 1 al nucleótido 166 o de la SEQ ID NO. 24 del nucleótido 1 al nucleótido 1113, o un cebador que reconoce la región flanqueante de ADN-T 3' de EE-GM5, donde dicha región flanqueante de ADN-T 3' comprende la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO. 6 del nucleótido 359 al nucleótido 691 o la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO. 25 del nucleótido 359 al nucleótido 1449 y un cebador que reconoce una secuencia en el ADN-T insertado, donde dicho ADN-T insertado comprende el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 5 del nucleótido 167 al nucleótido 353 o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 6 del nucleótido 1 al nucleótido 358, o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 11 del nucleótido 1 al nucleótido 7459, o su complemento, o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 23 del nucleótido 1114 al nucleótido 8572, o su complemento.
11. El kit del párrafo 10, en donde dicho cebador que reconoce la región flanqueante de ADN-T 5' comprende una secuencia de nucleótidos de 17 a 200 nucleótidos consecutivos seleccionada de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 5 del nucleótido 1 al nucleótido 166 o de la SEQ ID NO. 24 del nucleótido 1 al nucleótido 1113, o dicho cebador que reconoce la región flanqueante de ADN-T 3' de EE-GM5 comprende una secuencia de nucleótidos de 17 a 200 nucleótidos consecutivos seleccionada de la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO. 6 del nucleótido 359 al nucleótido 691 o la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID

NO. 25 del nucleótido 359 al nucleótido 1449 y dicho cebador que reconoce una secuencia en el ADN-T insertado comprende de 17 a 200 nucleótidos consecutivos seleccionados del complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 5 del nucleótido 167 al nucleótido 353 o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 6 del nucleótido 1 al nucleótido 358, o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 11 del nucleótido 1 al nucleótido 7459, o su complemento, o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 23 del nucleótido 1114 al nucleótido 8572, o su complemento.

12. El kit del párrafo 10, en donde dicho cebador que reconoce la región flanqueante de ADN-T 5' comprende en su extremo 3' una secuencia de nucleótidos de al menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionada de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 5 del nucleótido 1 al nucleótido 166 o de la SEQ ID NO. 24 del nucleótido 1 al nucleótido 1113, o dicho cebador que reconoce la región flanqueante de ADN-T 3' de EE-GM5 comprende en su extremo 3' una secuencia de nucleótidos de al menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionada de la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO. 6 del nucleótido 359 al nucleótido 691 o la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO. 25 del nucleótido 359 al nucleótido 1449 y dicho cebador que reconoce una secuencia en el ADN-T insertado comprende en su extremo 3' al menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionados del complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 5 del nucleótido 167 al nucleótido 353, o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 6 del nucleótido 1 al nucleótido 358, o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 11 del nucleótido 1 al nucleótido 7459, o su complemento, o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 23 del nucleótido 1114 al nucleótido 8572, o su complemento.
13. El kit del párrafo 10, que comprende un cebador que comprende la secuencia de la SEQ ID NO. 12 y un cebador que comprende la secuencia de la SEQ ID NO. 13 o que comprende un cebador que comprende la secuencia de la SEQ ID NO. 18 y un cebador que comprende la secuencia de la SEQ ID NO. 19.
14. El kit del párrafo 10, que comprende además una sonda que reconoce una secuencia entre el cebador que reconoce la región flanqueante de ADN-T 5' y el cebador que reconoce la secuencia en el ADN-T insertado o que reconoce una secuencia entre el cebador que reconoce la región flanqueante de ADN-T 3' y el cebador que reconoce la secuencia en el ADN-T insertado.

15. El kit del párrafo 14, en donde dicha sonda reconoce parte de dicha región flanqueante de ADN-T 5' y parte del ADN-T insertado contiguo con la misma o en donde dicha sonda reconoce parte de dicha región flanqueante de ADN-T 3' y parte del ADN-T insertado contiguo con la misma.
16. El kit del párrafo 15, en donde dichos cebadores comprenden la secuencia de la SEQ ID NO. 12 y la SEQ ID NO. 13 y en donde dicha sonda comprende la secuencia de la SEQ ID NO. 14 o en donde dichos cebadores comprenden la secuencia de la SEQ ID NO. 18 y la SEQ ID NO. 19 y en donde dicha sonda comprende la secuencia de la SEQ ID NO. 20.
17. Un par de cebadores adecuado para su uso en una detección específica de EE-GM5, que comprende un primer cebador que comprende una secuencia que, en condiciones de detección optimizadas reconoce específicamente una secuencia en la región flanqueante de ADN-T 5' o 3' del ADN-T insertado en EE-GM5 y un segundo cebador que comprende una secuencia que, en condiciones de detección optimizadas reconoce específicamente una secuencia en el ADN-T insertado en EE-GM5 contigua con dicha región flanqueante 5' o 3', donde dicha región flanqueante de ADN-T 5' comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 5 del nucleótido 1 al nucleótido 166 o de la SEQ ID NO. 24 del nucleótido 1 al nucleótido 1113, donde dicha región flanqueante de ADN-T 3' comprende la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO. 6 del nucleótido 359 al nucleótido 691 o la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO. 25 del nucleótido 359 al nucleótido 1449, donde dicho ADN-T insertado comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 5 del nucleótido 167 al nucleótido 353, o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 6 del nucleótido 1 al nucleótido 358, o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 11 del nucleótido 1 al nucleótido 7459, o su complemento, o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 23 del nucleótido 1114 al nucleótido 8572, o su complemento.
18. Un cebador que comprende en su extremo 3' la secuencia de la SEQ ID NO. 12, o la secuencia de la SEQ ID NO. 13, o la secuencia de la SEQ ID NO. 18 o la secuencia de la SEQ ID NO. 19.
19. Un par de cebadores que comprende un primer cebador que comprende en su extremo 3' la secuencia de la SEQ ID NO. 12 y un segundo cebador que comprende en su extremo 3' la secuencia de la SEQ ID NO. 13, o que comprende un primer cebador que comprende en su extremo 3' la secuencia

de la SEQ ID NO. 18 y un segundo cebador que comprende en su extremo 3' la secuencia de la SEQ ID NO. 19.

20. El método del párrafo 1, donde dicho método comprende hibridar un ácido nucleico de muestras biológicas con una sonda específica para EE-GM5.
21. El método del párrafo 20, en donde la secuencia de dicha sonda específica tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con una secuencia que comprende parte de la secuencia flanqueante de ADN-T 5' o la secuencia flanqueante de ADN-T 3' de EE-GM5 y la secuencia del ADN-T insertado contiguo con la misma.
22. El método del párrafo 21, en donde la secuencia de dicha sonda específica comprende una secuencia con al menos 80 % de identidad de secuencia con la secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NO. 1, 3 o 5 o la secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NO. 2, 4 o 6, o el complemento de dichas secuencias.
23. El método del párrafo 22, en donde dicha sonda comprende la secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NO. 1 o 3 o la secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NO. 2 o 4.
24. Un kit para identificar el evento de élite EE-GM5 en muestras biológicas, donde dicho kit comprende una sonda específica, capaz de hibridar específicamente con una región específica de EE-GM5.
25. El kit del párrafo 24, en donde la secuencia de dicha sonda específica tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con una secuencia que comprende parte de la secuencia flanqueante de ADN-T 5' o parte de la secuencia flanqueante de ADN-T 3' de EE-GM5 y parte de la secuencia del ADN-T insertado contiguo con la misma.
26. El kit del párrafo 25, en donde la secuencia de dicha sonda específica comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con una cualquiera de las SEQ ID NO. 1, 3 o 5 o una cualquiera de las SEQ ID NO. 2, 4 o 6, o el complemento de dichas secuencias.
27. Una sonda específica para la identificación del evento de élite EE-GM5 en muestras biológicas.
28. La sonda del párrafo 27, que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con una secuencia que comprende parte de la secuencia flanqueante de ADN-T 5' o parte de la

secuencia flanqueante de ADN-T 3' de EE-GM5 y parte de la secuencia del ADN-T insertado contiguo con la misma, o su complemento.

29. La sonda del párrafo 28 que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con la secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NO. 1, 3 o 5 o la secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NO. 2, 4 o 6, o el complemento de dichas secuencias.
30. Una sonda específica que comprende una secuencia de nucleótidos que es esencialmente similar a una cualquiera de las SEQ ID NO. 1, 3 o 5 o una cualquiera de las SEQ ID NO. 2, 4 o 6, o el complemento de dichas secuencias.
31. Una sonda específica que comprende la secuencia de las SEQ ID NO. 1 o 3 o la secuencia de las SEQ ID NO. 2 o 4.
32. Un método para confirmar la pureza de las semillas, donde dicho método comprende la detección de una región específica de EE-GM5 con un par de cebadores específico o sonda que reconoce(n) específicamente la región flanqueante de ADN-T 5' o 3' y el ADN-T insertado contiguo con la misma en EE-GM5, en muestras de semillas.
33. El método del párrafo 32, que comprende amplificar un fragmento de ADN de entre 50 y 1000 pb de un ácido nucleico presente en dichas muestras biológicas usando una reacción en cadena de la polimerasa con al menos dos cebadores, donde uno de dichos cebadores reconoce la región flanqueante de ADN-T 5' de EE-GM5, donde dicha región flanqueante de ADN-T 5' comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 5 del nucleótido 1 al nucleótido 166 o de la SEQ ID NO. 24 del nucleótido 1 al nucleótido 1113, o la región flanqueante de ADN-T 3' de EE-GM5, donde dicha región flanqueante de ADN-T 3' comprende la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO. 6 del nucleótido 359 al nucleótido 691 o la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO. 25 del nucleótido 359 al nucleótido 1449, donde el otro cebador de dichos cebadores comprende una secuencia en el ADN-T insertado que comprende el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 5 del nucleótido 167 al nucleótido 353 o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 6 del nucleótido 1 al nucleótido 358 o en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 11 del nucleótido 1 al nucleótido 7459, o su complemento, o en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 23 del nucleótido 1114 al nucleótido 8572, o su complemento, e

hibridar una sonda específica para el fragmento de ADN amplificado con dichos al menos dos cebadores.

34. El método del párrafo 33, que comprende amplificar un fragmento de ADN de 85 pb y en donde dichos cebadores comprenden la secuencia de la SEQ ID NO. 12 y la SEQ ID NO. 13, respectivamente, y en donde dicha sonda comprende la secuencia de la SEQ ID NO. 14 o amplificar un fragmento de ADN de 84 pb y en donde dichos cebadores comprenden la secuencia de la SEQ ID NO. 18 y la SEQ ID NO. 19, respectivamente, y en donde dicha sonda comprende la secuencia de la SEQ ID NO. 20.
35. Un método para explorar semillas para determinar la presencia de EE-GM5, donde dicho método comprende la detección de una región específica de EE-GM5 con un par de cebadores específico o sonda que reconoce(n) específicamente la región flanqueante de ADN-T 5' o 3' y el ADN-T insertado contiguo con la misma en EE-GM5, en muestras de lotes de semillas.
36. El método del párrafo 35, que comprende amplificar un fragmento de ADN de entre 50 y 1000 pb de un ácido nucleico presente en dichas muestras biológicas usando una reacción en cadena de la polimerasa con al menos dos cebadores, donde uno de dichos cebadores comprende la región flanqueante de ADN-T 5' del ADN-T insertado en EE-GM5, donde dicha región flanqueante de ADN-T 5' comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 5 del nucleótido 1 al nucleótido 166 o de la SEQ ID NO. 24 del nucleótido 1 al nucleótido 1113, o la región flanqueante de ADN-T 3' del ADN-T insertado en EE-GM5, donde dicha región flanqueante de ADN-T 3' comprende la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO. 6 del nucleótido 359 al nucleótido 691 o la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO. 25 del nucleótido 359 al nucleótido 1449, donde el otro cebador de dichos cebadores reconoce una secuencia en el ADN-T insertado que comprende el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 5 del nucleótido 167 al nucleótido 353 o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 6 del nucleótido 1 al nucleótido 358, o que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 11 del nucleótido 1 al nucleótido 7459, o su complemento, o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 23 del nucleótido 1114 al nucleótido 8572, o su complemento, e hibridar una sonda específica para el fragmento de ADN amplificado con dichos al menos dos cebadores, tales como una sonda que comprende la secuencia de las SEQ ID NO. 1 o 3 o las SEQ ID

NO. 2 o 4, o su complemento.

37. El método del párrafo 36, que comprende amplificar un fragmento de ADN de 85 pb y en donde dichos cebadores comprenden la secuencia de la SEQ ID NO. 12 y la SEQ ID NO. 13, respectivamente, y en donde dicha sonda comprende la secuencia de la SEQ ID NO. 14.
38. Un método para determinar el estado de cigosidad de una planta, material de planta o semilla que comprende el evento de élite EE-GM5, donde dicho método comprende amplificar fragmentos de ADN de entre 50 y 1000 pb de un ácido nucleico presente en dichas muestras biológicas usando una reacción en cadena de la polimerasa con al menos tres cebadores, donde dos de dichos cebadores reconocen específicamente ADN vegetal antes de la inserción, tal como un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 21 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 19, donde el tercero de dichos cebadores reconoce una secuencia en el ADN-T insertado, tal como la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 18, tal como dicho método que usa dichos cebadores en donde se amplifican fragmentos de ADN de 84 y 72 pb.
39. Un método para detectar la presencia del evento de élite EE-GM5 en muestras biológicas mediante hibridación con una sonda de ácido nucleico marcada sustancialmente complementaria en la que la relación de sonda:ácido nucleico diana se amplifica mediante el reciclado de la secuencia de ácido nucleico diana, donde dicho método comprende:
 - a) hibridar dicha secuencia de ácido nucleico diana con un primer oligonucleótido de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 5 de la posición de nucleótido 167 a la posición de nucleótido 184 o su complemento o donde dicho primer oligonucleótido de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 6 de la posición de nucleótido 341 a la posición de nucleótido 358 o su complemento;
 - b) hibridar dicha secuencia de ácido nucleico diana con un segundo oligonucleótido de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 5 del nucleótido 149 al nucleótido 166 o su complemento o donde dicho oligonucleótido de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 6 del nucleótido 359 al nucleótido 376 o su complemento, en donde dicho primer y segundo oligonucleótido se solapan en al menos un nucleótido y en donde dicho primer o dicho segundo

oligonucleótido se marca para ser dicha sonda de ácido nucleico marcada;

c) escindir solamente la sonda marcada en el dúplex de sonda:secuencia de ácido nucleico diana con una enzima que provoca escisión de sonda selectiva que da como resultado disociación de dúplex, y deja la secuencia diana intacta;

d) reciclar la secuencia de ácido nucleico diana repitiendo las etapas (a) a (c); y

e) detectar una sonda marcada escindida, con lo que se determina de este modo la presencia de dicha secuencia de ácido nucleico diana, y detectar la presencia del evento de élite EE-GM5 en dicha muestra biológica.

40. Una planta de soja transgénica, o células, partes, semillas o descendencia de la misma, donde cada una comprende el evento de élite EE-GM5 en su genoma, habiéndose depositado semillas de referencia que comprenden dicho evento en la ATCC con el número de depósito PTA-123625.
41. La planta transgénica, semilla, células, partes o descendencia del párrafo 40, cuyo ADN genómico, cuando se analiza usando PCR para EE-GM5 con dos cebadores que comprenden la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID 12 y la SEQ ID 13, respectivamente, produce un fragmento de ADN de 85 pb.
42. Semilla que comprende el evento de élite EE-GM5, que es un ADN-T insertado en una posición específica en el genoma de soja, como está contenido en la semilla depositada en la ATCC con el número de depósito PTA-123625 o en derivados de la misma.
43. Una planta, parte de planta, célula o tejido de soja, o semilla que comprende el evento de élite EE-GM5 que puede obtenerse de la semilla del párrafo 42.
44. Una planta de soja, o semilla, células o tejidos de la misma, que comprenden cada uno el evento de élite EE-GM5 en su genoma, que puede obtenerse mediante propagación de y/o cultivo con una planta de soja que ha crecido a partir de la semilla depositada en la ATCC con el número de depósito PTA-123625.
45. Una semilla de soja que comprende el evento de élite EE-GM5, en donde la semilla de referencia comprende dicho evento que se ha depositado en la ATCC con el número de depósito PTA-123625.
46. Una planta de soja transgénica, célula o tejido, que comprende el evento de élite EE-GM5, que puede obtenerse de la semilla del párrafo 45.
47. la célula de planta de soja según uno cualquiera de los párrafos 40, 41, 43, 44

y 46, que es una célula vegetal que no está en propagación.

48. Un método para producir una planta o semilla de soja que comprende el evento de élite EE-GM5 que comprende cruzar una planta según uno cualquiera de los párrafos 40, 41, 43, 44 y 46 con otra planta de soja y plantar la semilla obtenida de dicho cruce.
49. ADN genómico de soja que comprende el evento de élite EE-GM5.
50. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos esencialmente similar a la secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NO. 1, 3 o 5 o la secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NO. 2, 4 o 6, o el complemento de dichas secuencias, tal como una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 99 % o al menos 99,5 % de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 5 o 24 o 6 o 25, o su complemento, tal como dicho ácido nucleico que confiere tolerancia a un herbicida inhibidor de HPPD y/o resistencia a SCN en soja.
51. La molécula de ácido nucleico del párrafo 50 que comprende la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de las SEQ ID NO. 1 o 3 o las SEQ ID NO. 2 o 4, o el complemento de dichas secuencias, tal como dicha molécula de ácido nucleico que también comprende la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO. 7 y 9 o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 98 % de identidad de secuencia con la misma, o su complemento, o dicha molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 11 de la posición de nucleótido 188 a la posición de nucleótido 7101 o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 98 % de identidad de secuencia con la misma.
52. Una planta de soja, célula, parte de planta, semilla o descendencia de la misma que comprende una molécula de ácido nucleico de uno cualquiera de estos párrafos, tal como una planta de soja, célula, parte de planta, semilla o descendencia de la misma que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO. 1, 3 o 5 o la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO. 2, 4 o 6, o una planta de soja, célula, parte de planta, semilla o descendencia de la misma, que comprende en su genoma la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 3 y la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 4, o una planta de soja, célula, parte de planta, semilla o descendencia de la misma, que comprende en su genoma la

secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 5 y la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 6, o una planta de soja, célula, parte de planta, semilla o descendencia de la misma, que comprende en su genoma la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 24 y la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 25, tal como una planta de soja de este tipo que comprende también un gen quimérico que codifica Cry14Ab-1 y un gen quimérico que codifica HPPD-4, en particular dichos genes quiméricos que comprenden la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO. 7 y 9, respectivamente.

53. Una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de las SEQ ID NO. 1, 3 o 5 o las SEQ ID NO. 2, 4 o 6, tal como una molécula de ácido nucleico, que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 5 y la SEQ ID NO. 6, o su complemento, o dicha molécula de ácido nucleico, que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 24 y la SEQ ID NO. 25, o su complemento.
54. Una planta de soja transgénica, célula de planta, tejido o semilla, que comprende en su genoma el evento EE-GM5 caracterizado por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos esencialmente similar a la secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NO. 1, 3, 5 o 24 o la secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NO. 2, 4, 6 o 25, o el complemento de dichas secuencias, en donde dicha planta de soja también comprende un gen quimérico que codifica Cry14Ab-1 y un gen quimérico que codifica HPPD-4.
55. Una planta, célula, tejido o semilla de soja, que comprende EE-GM5 y que comprende en el genoma de sus células una secuencia de ácido nucleico con al menos 80 %, 90 %, 95 % o 100 % de identidad de secuencia con una secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NO. 1, 3 o 5 o una secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NO. 2, 4 o 6, o el complemento de dichas secuencias, tal como una planta de soja que también comprende un gen quimérico que codifica Cry14Ab-1 y un gen quimérico que codifica HPPD-4 o dicha planta, célula, tejido o semilla de soja, que comprende en el genoma de sus células una secuencia de ácido nucleico con al menos 80 %, 90 %, 95 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO. 24 o la SEQ ID NO. 25.
56. Una planta, célula de planta, tejido o semilla de soja, que comprende en su genoma una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de

nucleótidos con al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO. 5 o 24 o las SEQ ID NO. 6 o 25, o su complemento, o dicha planta, célula de planta, tejido o semilla de soja, que comprende en su genoma una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO. 5 o 24 y las SEQ ID NO. 6 o 25, o su complemento.

57. Una planta, célula de planta, tejido o semilla de soja, que comprende en su genoma una molécula de ácido nucleico que hibrida en condiciones de rigurosidad convencionales con la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO. 5 o 6, o su complemento.
58. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO. 5 o 24 o las SEQ ID NO. 6 o 25, o su complemento, tal como una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO. 5 o 24 y las SEQ ID NO. 6 o 25, o su complemento.
59. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones de rigurosidad convencionales con la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO. 5 o 6, o su complemento.
60. La molécula de ácido nucleico de uno cualquiera de los párrafos 50, 51, 58 y 59, que también comprende la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO. 7 y 9.
61. Un ADN quimérico que comprende una región flanqueante de ADN-T 5', un ADN-T insertado, y una región flanqueante de ADN-T 3', en donde la secuencia de dicho ADN-T insertado comprende la secuencia de la SEQ ID NO. 11 del nucleótido 188 al nucleótido 7101 o una secuencia al menos 95, 96, 97, 98, 99 o al menos 99,5 % idéntica a la misma o en donde la secuencia de dicho ADN-T insertado comprende la secuencia de las SEQ ID NO. 7 y 9 y en donde dicha región flanqueante de ADN-T 5' está localizada inmediatamente encima de y contigua con dicho ADN-T insertado y comprende la secuencia de la SEQ ID NO. 5 del nucleótido 1 al nucleótido 166 o una secuencia al menos 95, 96, 97, 98, 99 o al menos 99,5 % idéntica a la misma, o de la SEQ ID NO. 24 del nucleótido 1 al nucleótido 1113, o una secuencia al menos 95, 96, 97, 98, 99 o

al menos 99,5 % idéntica a la misma y en donde dicha región flanqueante de ADN-T 3' se localiza inmediatamente cadena abajo de y contigua con dicho ADN-T insertado y comprende la secuencia de la SEQ ID NO. 6 del nucleótido 359 al nucleótido 691 o una secuencia al menos 95, 96, 97, 98, 99 o al menos 99,5 % idéntica a la misma, o la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO. 25 del nucleótido 359 al nucleótido 1449, o una secuencia al menos 95, 96, 97, 98, 99 o al menos 99,5 % idéntica a la misma.

62. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 98 % de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 7 o su complemento, tal como la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 7, tal como una molécula de ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 11 del nucleótido 131 a 5276, o su complemento, o una secuencia que codifica una proteína Cry14Ab nematocida que tiene al menos 95, 96, 97, 98 o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 7 o con la secuencia de la SEQ ID NO. 11 de la posición de nucleótido 131 a la posición de nucleótido 5276, o su complemento.
63. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 98 % de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 9 o su complemento, tal como la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 9, tal como una molécula de ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 11 del nucleótido 5382 a 7459, o su complemento, o una secuencia que tiene al menos 95, 96, 97, 98 o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 9 o con la secuencia de la SEQ ID NO. 11 de la posición de nucleótido 5382 a la posición de nucleótido 7459, o su complemento, en donde dicha secuencia codifica una proteína HPPD que proporciona tolerancia a herbicidas inhibidores de HPPD cuando se expresa en una planta.
64. Un método para producir un producto de soja, que comprende obtener semilla de soja que comprende el evento de élite EE-GM5 como se ha descrito anteriormente, y producir el producto de soja a partir de la misma.
65. El método del párrafo 64, en donde el producto de soja es o comprende harina de soja, semillas molidas, harina fina o copos.
66. El método del párrafo 4 o 65, en donde dicho producto de soja comprende un ácido nucleico específico para el evento de élite EE-GM5, tal como dicho producto que comprende un ácido nucleico que produce un diagnóstico de

amplicón o específico para el evento EE-GM5, tal como la secuencia de las SEQ ID NO. 1 o 3 o la secuencia de las SEQ ID NO. 2 o 4.

67. Un producto de soja, que comprende el evento de élite EE-GM5 como se ha descrito anteriormente, tal como un producto de soja producido a partir de la planta, célula, parte, semilla o descendencia de soja de uno cualquiera de estos párrafos.
68. El producto de soja del párrafo 67, en donde el producto de soja es o comprende harina de soja, semillas molidas, harina fina o copos.
69. El producto de soja del párrafo 67 o 68, en donde dicho producto de soja comprende un ácido nucleico específico para el evento de élite EE-GM5, tal como dicho producto que comprende un ácido nucleico que produce un diagnóstico de amplicón o específico para el evento EE-GM5, tal como la secuencia de las SEQ ID NO. 1 o 3 o la secuencia de las SEQ ID NO. 2 o 4, o su complemento.
70. Un método para proteger plantas de soja emergentes de la competición por malas hierbas, que comprende tratar un campo en el que se sembraron semillas que contenían el evento de élite EE-GM5 como se ha descrito en cualquiera de estos párrafos, con un herbicida inhibidor de HPPD, en donde las plantas son tolerantes al herbicida inhibidor de HPPD.
71. Un método para proteger plantas de soja emergentes de la competición por malas hierbas, que comprende tratar un campo para plantar con plantas de soja que comprenden el evento de élite EE-GM5 como se ha descrito anteriormente con un herbicida inhibidor de HPPD, antes de plantar las plantas de soja o sembrar las semillas, seguido de plantar o sembrar dichas plantas o semillas de soja en dicho campo pretratado, en donde las plantas son tolerantes al herbicida inhibidor de HPPD.
72. Un método para controlar malas hierbas en un campo de plantas de soja que comprenden el evento de élite EE-GM5 como se ha descrito anteriormente, que comprende tratar dicho campo con una cantidad eficaz de un herbicida inhibidor de HPPD, en donde las plantas son tolerantes al herbicida inhibidor de HPPD.
73. El método de uno cualquiera de los párrafos 70 a 72, en donde el herbicida inhibidor de HPPD es isoxaflutol, topamezona o mesotriona.
74. Uso de una planta de soja transgénica, semilla o descendencia de la misma, que comprende el evento de élite EE-GM5 como se ha descrito anteriormente

para producir grano o semilla de soja.

75. Uso de una planta o semilla de soja que comprende el evento de élite EE-GM5 como se ha descrito anteriormente en su genoma para cultivar una planta resistente a nematodos y/o tolerante a herbicidas inhibidores de HPPD.
76. Uso de una semilla de soja que comprende el evento de élite EE-GM5 para obtener un producto de soja, en donde EE-GM5 es como se ha descrito anteriormente, tal como en donde dicho producto de soja es o comprende grano de soja molido, harina fina de soja, harina de soja o copos de soja.
77. Uso de una planta o semilla de soja que comprende el evento de élite EE-GM5 como se ha definido anteriormente, en combinación con un herbicida inhibidor de HPPD, para cultivar un campo de soja o para cultivar un cultivo de soja.
78. Una molécula de ácido nucleico que puede obtenerse de la semilla depositada en la ATCC con el número de referencia PTA-123625, en donde dicha molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de las SEQ ID NO. 1, 3 o 5 y la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de las SEQ ID NO. 2, 4 o 6.
79. Una planta, célula, parte o semilla de soja, que comprenden cada una en su genoma el evento de élite EE-GM5, en donde dicho evento de élite es el locus genético que comprende un ADN-T insertado que contiene un gen quimérico que codifica la proteína HPPD-4 y un gen quimérico que codifica la proteína Cry14Ab-1 y secuencias flanqueantes 5' y 3' inmediatamente circundantes a dicho ADN-T insertado, como se encuentra en la semilla de referencia depositada en la ATCC con el número de depósito PTA-123625.
80. Una planta, célula, parte de planta o semilla descendiente de la planta, célula, parte de planta o semilla del párrafo 79, en donde dicha planta, célula, parte de planta o semilla descendiente comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 3 y la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 4.
81. La planta, célula, parte, semilla o descendencia de soja del párrafo 79, cuyo ADN genómico, cuando se analiza usando PCR con dos cebadores que comprenden la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 18 y la SEQ ID NO. 19, respectivamente, produce un fragmento de ADN de 84 pb.
82. La planta de uno cualquiera de los párrafos anteriores que es tolerante a isoxaflutol y/o topramezona y/o mesotriona, tal como una planta tolerante de este tipo tolerante a isoxaflutol, topramezona y mesotriona.
83. Un método para producir una planta de soja resistente a SCN y tolerante a

herbicidas inhibidores de HPPD, que comprende introducir resistencia a SCN y tolerancia a herbicidas inhibidores de HPPD en el genoma de una planta de soja cruzando una primera planta de soja que carece de un gen que codifica Cry14Ab-1 y que carece de un gen que codifica HPPD-4 con la planta de soja de uno cualquiera de los párrafos anteriores y seleccionar una planta descendiente resistente a SCN y tolerante a herbicidas inhibidores de HPPD.

84. Uso de una planta o semilla de soja que comprende el evento de élite EE-GM5 como se ha definido anteriormente para obtener un cultivo de soja, tal como un cultivo de soja que rinde mejor cuando está infestado por nematodos o síndrome de muerte súbita.
85. Un método para producir un cultivo de soja con resistencia mejorada a nematodos o síndrome de muerte súbita, que comprende las etapas (a) plantar un campo usando la semilla como se ha descrito en cualquiera de los párrafos anteriores; y (b) recolectar la semilla de soja producida en las plantas cultivadas a partir de dicha semilla y, opcionalmente, (c) aplicar al campo plantado con dichas semillas antes o después de la aparición de las semillas o en dichas plantas de soja una o más dosis de un herbicida inhibidor de HPPD suficiente para matar las malas hierbas pero que es tolerado por dichas semillas o plantas de soja, tal como en donde dichos nematodos son SCN o especies de *Pratylenchus* o nematodo de los nudos de la raíz o nematodos de especies de nematodos reniformes.
86. Uso de la semilla de soja descrita en los párrafos anteriores para preparar un producto de alimento o pienso procesado, en donde dicho producto de alimento o pienso procesado comprende una cantidad detectable de un ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 1 y/o SEQ ID NO. 2, o su complemento.
87. El uso del párrafo 86, en donde (i) dicho producto de alimento o pienso comprende harina de soja, harina fina de soja, copos de soja o aceite de soja; (ii) dicho ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 3 y/o SEQ ID NO. 4, o su complemento; o (iii) dicho ácido nucleico comprende además la secuencia de nucleótidos contenida en la SEQ ID NO. 7 y la SEQ ID NO. 9.
88. Una planta, semilla o célula de soja que comprende en su genoma el evento de élite EE-GM5, en donde el evento de élite EE-GM5 comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia expuesta en la

SEQ ID NO. 23, en donde dicho evento de élite comprende un gen quimérico que codifica HPPD-4 y un gen quimérico que codifica Cry14Ab-1, en donde dicha planta, semilla o célula es tolerante a un herbicida inhibidor de HPPD y tiene resistencia a SCN.

89. La planta del párrafo 88, en donde el evento de élite EE-GM5 comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 95 % idéntica a la secuencia expuesta en la SEQ ID NO. 23.
90. La planta del párrafo 88, en donde el evento de élite EE-GM5 comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,9 % idéntica a la secuencia expuesta en la SEQ ID NO. 23.
91. Una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 23 o una secuencia de nucleótidos con al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 23, que confiere tolerancia a un herbicida inhibidor de HPPD y/o resistencia a nematodos, tal como en donde dicho nematodo es una SCN o una especie de *Pratylenchus* o nematodo de los nudos de la raíz o nematodo de una especie de nematodo reniforme.
92. Una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 11 de la posición de nucleótido 131 a la posición de nucleótido 7941 o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la misma.
93. La molécula de ácido nucleico del párrafo 92, que codifica una proteína HPPD tolerante a un inhibidor de HPPD y una proteína que afecta de forma negativa a plagas vegetales de nematodos, tales como nematodos SCN, RKN o *Pratylenchus* spp.
94. La molécula de ácido nucleico del párrafo 93, que codifica la proteína de la SEQ ID NO. 8 o una proteína al menos 99 % idéntica a la misma y la proteína de la SEQ ID NO. 10 o una proteína al menos 99 % idéntica a la misma.
95. Un método para controlar malas hierbas y/o nematodos en un campo en el que se van a plantar plantas de soja, que comprende la etapas de: 1) tratar dicho campo con un herbicida inhibidor de HPPD tal como isoxaflutol, topamezona o mesotriona y 2) plantar o sembrar plantas o semillas de soja que comprenden el evento de transformación de élite EE-GM5 como se ha descrito anteriormente en dicho campo tratado, en donde la semilla de referencia que comprende dicho evento de élite está depositada en la ATCC con el número de

depósito PTA-123625.

96. Un método de control de malas hierbas, caracterizado porque comprende las etapas de: 1) plantar plantas o semillas de soja tolerantes a un herbicida inhibidor de HPPD tales como isoxaflutol, topamezona o mesotriona, en un campo y 2) aplicación de un herbicida inhibidor de HPPD, tal como isoxaflutol, topamezona o mesotriona, en dicho campo antes de plantar dichas plantas o semillas o en dichas plantas o semillas de soja después de plantar (puede ser antes o después de la germinación de las semillas), en donde dichas plantas o semillas comprenden el evento de transformación de élite de soja EE-GM5 en su genoma, donde la semilla de referencia comprende dicho evento de élite que está depositado en la ATCC con el número de depósito PTA-123625.
97. Un proceso para control de malas hierbas, caracterizado porque comprende las etapas de: 1) tratar un campo para plantar con plantas de soja o un campo para sembrar con semillas de soja con un herbicida inhibidor de HPPD, tal como isoxaflutol, topamezona o mesotriona, antes de plantar las plantas de soja o sembrar las semillas y 2) plantar plantas de soja que comprenden el evento de transformación de élite de soja EE-GM5 o sembrar semillas de soja que comprenden el evento de transformación de élite de soja EE-GM5 en dicho campo pretratado, en donde la semilla de referencia que comprende dicho evento de transformación de élite de soja EE-GM5 está depositada en la ATCC con el número de depósito PTA-123625.
98. Un método para reducir la pérdida de rendimiento en un campo para plantar con plantas de soja, en particular un campo que contiene o se espera que contenga nematodos tales como SCN, RKN o *Pratylenchus* o nematodos reniformes o una combinación de los mismos, que comprende la etapa de 1) obtener plantas o semillas que comprenden el evento de transformación de élite EE-GM5 como se ha descrito anteriormente y 2) plantar o sembrar plantas o semillas de soja, en donde la semilla de referencia que comprende dicho evento de élite está depositada en la ATCC con el número de depósito PTA-123625.
99. Un método para aumentar el rendimiento de plantas de soja cuando se plantan en un campo que contiene nematodos tales como SCN, RKN o *Pratylenchus* o nematodos reniformes o una combinación de los mismos, que comprende la etapa de 1) obtener plantas o semillas que comprenden el evento de transformación de élite EE-GM5 como se ha descrito anteriormente y 2) plantar

o sembrar plantas o semillas de soja, en donde la semilla de referencia que comprende dicho evento de élite está depositada en la ATCC con el número de depósito PTA-123625.

100. Un método para producir una planta o semilla de soja tolerante a un herbicida inhibidor de HPPD, tal como isoxaflutol, topramezona o mesotriona, o para producir una planta o semilla de soja tolerante a nematodos, tales como SCN, RKN o *Pratylenchus* o nematodos reniformes, o para producir una planta o semilla de soja tolerante a un herbicida inhibidor de HPPD, tal como isoxaflutol, topramezona o mesotriona, y tolerante a nematodos, tales como SCN, RKN o *Pratylenchus* o nematodos reniformes, caracterizado por la etapa de introducir en el genoma de una planta o semilla de soja el evento de transformación de soja de élite EE-GM5 como se ha descrito anteriormente y opcionalmente tratar dicha planta o semilla con un herbicida inhibidor de HPPD, tal como isoxaflutol, topramezona o mesotriona, u opcionalmente tratar el campo en el que se plantará dicha planta o semilla con un herbicida inhibidor de HPPD, tal como isoxaflutol, topramezona o mesotriona, y plantar dicha planta o semilla en dicho campo pretratado.
101. Una molécula de ácido nucleico que caracteriza específicamente el evento de transformación de élite de soja EE-GM5, caracterizada porque comprende la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de las SEQ ID NO. 1, 3 o 5, que contiene una parte del ADN genómico de planta de soja y una parte de ADN extraño insertado de EE-GM5 cadena abajo del mismo y contiguo con el mismo, y/o caracterizada porque comprende la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO. 2, 4 o 6, que contiene una parte de ADN extraño insertado de EE-GM5 y una parte de ADN genómico de planta de soja cadena abajo del mismo y contiguo con el mismo.
102. Una planta o semilla que comprende EE-GM5 como se ha descrito anteriormente y que también comprende tolerancia o resistencia a SCN, RKN o *Pratylenchus* o nematodos reniformes o una combinación de los mismos, como se proporciona por loci/genes de resistencia a soja.
103. La planta o semilla del párrafo 102, en donde dicha planta o semilla comprende EE-GM5 y uno cualquiera o una combinación de los alelos/loci de resistencia a SCN de PI 548316, PI 567305, PI 437654, PI 90763, PI 404198B, PI 88788, PI 468916, PI 567516C, PI 209332, PI 438489B, PI 89772, Peking, PI 548402, PI 404198A, PI 561389B, PI 629013, PI 507471, PI 633736, PI 507354, PI

404166, PI 437655, PI 467312, PI 567328, PI 22897 o PI 494182.

104. Una planta o semilla que comprende EE-GM5 como se ha descrito anteriormente, que también comprende tolerancia a otros herbicidas, como se proporciona por genes de tolerancia a herbicidas (genes o transgenes de soja nativos o mutados), tales como tolerancia a herbicidas a base de inhibidor de glifosato, glufosinato, sulfonilurea, imidazolinona, inhibidor de HPPD, dicamba, 2,4-D o PPO, o cualquier combinación de los mismos.
105. La planta o semilla del párrafo 103 en donde dicha planta o semilla comprende EE-GM5 como se ha descrito anteriormente y uno o más de los siguientes eventos de transformación de soja que confieren tolerancia a herbicida: MST-FGØ72-3, SYN-ØØØH2-5, DAS-68416-4, DAS-444Ø6-6, MON-877Ø8-9, MON89788, MON-Ø4Ø32-6, ACS-GMØØ5-3, BPS-CV127-9, ACS-GMØØ6-4, MON-877Ø5-6 o el evento DP-3Ø5423-1.
106. Un método para reducir la gravedad de los efectos del síndrome de muerte súbita o clorosis por deficiencia de hierro en plantas de soja en presencia de infestación por SCN o para aumentar el rendimiento de plantas de soja en campos que contienen SCN infestados con síndrome de muerte súbita o en campos que contienen SCN que provocan clorosis por deficiencia de hierro en soja, donde dicho método comprende plantar plantas de soja o sembrar semillas de soja que comprenden el evento de élite EE-GM5, en donde la semilla de referencia que comprende dicho evento de élite está depositada en la ATCC con el número de depósito PTA-123625.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Los siguientes ejemplos, que no se pretende que limiten la invención a las realizaciones específicas descritas, pueden entenderse junto con las Figuras adjuntas, incorporadas en el presente documento por referencia, en los que:

Figura 1: Representación esquemática de la relación entre las secuencias de nucleótidos y cebadores citados. Barra negra: ADN-T insertado; barra sombreada: ADN que flanquea el ADN-T; flecha ajedrezada (a): gen *cry14Ab-1.b* (véase Tabla 1 para composición del gen quimérico); flecha sombreada (b): gen *hppdPf-4Pa* quimérico (véase Tabla 1 para composición del gen quimérico); flechas negras: cebadores oligonucleotídicos; (c) se refiere al complemento de la secuencia de nucleótidos indicada; línea negra: sondas oligonucleotídicas (el número posterior es la SEQ ID NO representativa). Los números bajo las barras que representan las SEQ ID NO. 5 y 6 son las posiciones de nucleótidos de los diferentes elementos en dichas

secuencias. Nota: el esquema no está dibujado a escala.

Figura 2: Método de puntos finales para el análisis de la identidad de EE-GM5.

La Figura 2 muestra un ejemplo del resultado del método descrito en el Ejemplo 2.1 para una serie de muestras de soja que contienen EE-GM5 y muestras de soja convencionales. Para cada muestra se presentan las relaciones S/B tanto para la reacción específica de EE-GM5 como para la reacción endógena. En esta figura, las muestras dentro de las líneas marcadas con "a" son muestras de soja que no contienen EE-GM5, las muestras dentro de las líneas marcadas con "b" son muestras de soja que contienen EE-GM5 y las muestras dentro de la caja formada por las líneas marcadas con "c" son muestras inconcluyentes.

Figura 3: Método de puntos finales para el análisis de la identidad y cigosidad de EE-GM5 GM5.

La Figura 3 muestra un ejemplo del resultado del método descrito en el Ejemplo 2.2 para una serie de muestras de soja que contienen EE-GM5 en un estado homocigoto, que contiene las muestras de soja EE-GM5 en un estado hemicigoto y muestras de soja convencionales. En esta figura, las muestras dentro de las líneas marcadas con "a" son muestras de soja que no contienen EE-GM5 en un estado homocigoto, las muestras dentro de las líneas marcadas con "b" son muestras de soja que contienen EE-GM5 en un estado hemicigoto, las muestras dentro de las líneas marcadas con "c" son muestras de soja que no contienen EE-GM5 y las muestras dentro de la caja formada por las líneas marcadas con "d" son muestras inconcluyentes.

Figura 4: Método de PCR en tiempo real para el análisis de la presencia de nivel bajo de EE-GM5

La Figura 4 muestra un ejemplo de los resultados del método de RT-PCR descrito en el Ejemplo 2.4 para el análisis de presencia de nivel bajo como se realiza en las muestras de calibración. "a", "b", "c", "d", "e" indican los valores de Ct para las muestras de calibración "A", "B", "C", "D", "E", respectivamente. Las muestras de calibración "A", "B", "C", "D", "E" tienen cantidades decrecientes de ADN de EE-GM5.

Figura 5: Promedio de los resultados de fitotoxicidad máxima para el tratamientos con herbicidas

La Figura 5 muestra el promedio de los datos de fitotoxicidad vegetal máxima registrados para el tratamiento con herbicidas en varios ensayos de campo durante 2 años, para plantas de soja que contienen el evento EE-GM5 en comparación con plantas de soja no transformadas/convencionales (Thorne). Los números entre ()

debajo de un tratamiento proporcionan el número de ensayos incluidos en la barra, el número en la parte superior de cada barra proporciona el promedio del valor de fitotoxicidad máximo para ese tratamiento. Los tratamientos aplicados fueron: IFT= isoxaflutol, MST= mesotriona, PE= pre-aparición, PO= post-aparición (en el estadio V2-V3, con los adyuvantes concentrado de aceite de cultivo y sulfato de amonio añadidos para aumentar la actividad herbicida). Las tasas mostradas están en gramos de principio activo/hectárea (dosis 4x en pre-aparición, dosis 2x en post-aparición).

Figura 6. Rendimiento de grano de EE-GM5 en Thorne en campos infestados por SCN.

Se ensayó EE-GM5 en fondo de transformante original (Thorne) en 9 localizaciones diferentes a lo largo de Iowa, Illinois, Indiana, Misuri y Tennessee en 2015 y 2016, en campos infestados por SCN (que varían de baja a alta infestación por SCN). El punto es el rendimiento estimado del evento homocigoto para cada ensayo (como porcentaje de diferencia con respecto al nulo), las líneas horizontales representan los límites de confianza al 95 % del contraste entre el evento homocigoto y el segregado nulo (si la línea no se solapa con la línea vertical en 100 % de rendimiento de segregado nulo, entonces el evento fue significativamente diferente del segregado nulo). "Entre localizaciones" es el rendimiento estimado de un análisis combinado entre las 9 localizaciones.

Figura 7. Rendimiento de grano de EE-GM5 en fondo de élite susceptible a SCN en campos infestados por SCN.

Se realizó introgresión de EE-GM5 (BC2F3) en una línea de MG I (grupo de madurez I) de élite que es susceptible a SCN y se ensayó en una localización en Minesota y una localización en Dakota del Norte en 2016 (cada una con altos niveles de infestación por SCN). El punto es el rendimiento estimado del evento homocigoto para cada ensayo (como porcentaje de diferencia con respecto al nulo), la línea horizontal alrededor del punto representa los límites de confianza al 95 % del contraste entre el evento homocigoto y el segregante nulo (si la línea no se solapa con la línea vertical en 100 % de rendimiento de segregante nulo, entonces el evento fue significativamente diferente del segregante nulo). "Entre localizaciones" es el rendimiento estimado de un análisis combinado entre ambas localizaciones.

Figura 8. Rendimiento de grano de EE-GM5 en fondo de élite resistente a SCN en campos infestados por SCN.

Se cruzó EE-GM5 en una línea de MG III (grupo de madurez III) de élite que es resistente a SCN (debido al locus *rhg1* de PI88788) y se ensayó en tres localizaciones

en 2016 (los ensayos que empiezan con "16" tales como 16-IN1) y en 7 localizaciones en 2017 (los ensayos que empiezan con "17", tales como 17-IN1), que variaron de niveles de infestación por SCN bajos a altos (véase flecha, las localizaciones con baja presión de SCN están en la parte inferior de la figura (por ejemplo, 17-IL2) y las localizaciones con alta presión de SCN en la parte superior (por ejemplo, 17-IN1)). Se asignó presión de SCN teniendo en cuenta varios factores, incluidos la historia conocida del campo, poblaciones de SCN en el suelo, rendimientos relativos de variedades de control resistentes y susceptibles, características del suelo (pH y % de arena) y una evaluación visual de la infestación de las raíces en entradas susceptibles. El punto es el promedio de la diferencia del rendimiento (en toneladas por hectárea) del evento homocigoto en cada ensayo en comparación con el segregante nulo, la línea horizontal alrededor del punto representa los límites de confianza al 95 % del contraste entre el evento homocigoto y el segregante nulo (si la línea no se solapa con la línea vertical en diferencia 0 con el segregante nulo, entonces el rendimiento para el evento fue significativamente diferente del segregante nulo). "Pro" es el promedio de rendimiento entre todas las localizaciones en cada año.

Figura 9. Ensayo de invernadero de resistencia de *Pratylenchus* en los Estados Unidos

Las plantas de soja de élite con EE-GM5 controlan *Pratylenchus brachyurus* en ensayos de invernadero en los Estados Unidos. Se compararon plantas con EE-GM5 ("EE-GM5") con otras líneas de soja de élite: una línea susceptible a SCN de grupo de madurez (MG)3 ("THORNE"), una línea susceptible a SCN MG3, una línea susceptible a SCN MG 6.2 y una línea susceptible a SCN MG9 ("Susc WT" muestra el promedio para estas 3 líneas), una línea resistente a SCN MG3 (con el alelo de resistencia de *rhg1* de PI88788, "SCN Res (PI88788)") y una línea resistente a SCN MG 6.2 con la resistencia a SCN de *rhg1* y *Rhg4* de Peking ("SCN Res (Peking)"). Se representan los números promedio de *Pratylenchus* en raíces 30 días después de la infestación (5 plantas por entrada), lo que también muestra la variación observada entre variedades (como se ve normalmente en ensayos de invernadero). Los resultados muestran ~90 % de control de *Pratylenchus* entre líneas EE-GM5. Las líneas de soja con resistencia a SCN nativa (de Peking o PI88788) no controlan *Pratylenchus brachyurus*.

Figura 10. Ensayo de invernadero de resistencia a *Pratylenchus* en Brasil

Las plantas de soja homocigotas para EE-GM5 ("EE-GM5 HH") reducen significativamente *Pratylenchus brachyurus* en raíces de soja. Se aislaron *Pratylenchus brachyurus* de campos locales en Brasil. Se evaluaron plantas EE-GM5

(en dos líneas de élite de los Estados Unidos diferentes (el grupo de madurez 6.2, uno susceptible a SCN y uno con resistencia a SCN Peking ("EE-GM5")) y cinco líneas de soja brasileñas, con control limitado de *Pratylenchus* ("líneas brasileñas"), una línea brasileña marcada como Rf (factor reproductivo) bajo para *Pratylenchus* ("BRS 7380 (Rf bajo)"), una línea de élite de los Estados Unidos (grupo de madurez 6.2) que es susceptible a SCN ("SCN Susc") y una línea de élite de los Estados Unidos (MG 6.2) con resistencia a SCN Peking ("SCN Res (Peking)") para determinar el control de *Pratylenchus* en un ensayo de invernadero en Brasil. Se representan los promedios de esas entradas, que también muestran la variación observada entre variedades (como se ve normalmente en ensayos de invernadero). Una línea de soja brasileña (BRS 7380) mostró ~89 % de reducción de *Pratylenchus*. Las líneas EE-GM5 proporcionaron ~99 % de control de *Pratylenchus*. Las líneas de soja que portan resistencia nativa de Peking a SCN no controlan *Pratylenchus brachyurus*.

Figura 11. Puntuaciones de clorosis por deficiencia de hierro (IDC) para plantas EE-GM5 en comparación con nulas

La Figura 11 muestra las puntuaciones de IDC de plantas de soja con EE-GM5 en una localización (con infestación de SCN alta). El ensayo fue un diseño de parcelas subdivididas (4 parcelas por entrada) que contemplaba el efecto del evento en 3 fondos diferentes (2 líneas de soja susceptibles y 1 con resistencia a SCN de PI88788). Se muestran los promedios de puntuaciones de IDC para plantas con el evento EE-GM5 ("EE-GM5") y el segregante nulo correspondiente ("Nulo", que carece de EE-GM5) entre tres fondos genéticos (1 resistente a SCN, 1 susceptible a SCN y el fondo de Thorne susceptible a SCN). Una barra representa 12 parcelas totales. Las líneas verticales indican el error típico ("SEM" es el error típico de la media).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS DE LA INVENCION

En la presente invención, EE-GM5 se ha identificado como un evento de élite de una población de plantas de soja transgénica en el desarrollo de soja resistente a nematodos (*Glycine max*) que comprende un gen que codifica tolerancia al inhibidor de 4-hidroxi fenilpiruvato dioxigenasa (HPPD) combinado con un gen que confiere resistencia a nematodos, cada uno bajo el control de un promotor expresable en plantas. Se describen en el presente documento herramientas específicas para su uso en la identificación del evento de élite EE-GM5 en muestras biológicas.

La incorporación de una molécula de ADN recombinante en el genoma de la planta resulta normalmente de la transformación de una célula o tejido. El sitio

particular de incorporación se debe habitualmente a la integración aleatoria.

El ADN introducido en el genoma de la planta como resultado de la transformación de una célula o tejido de planta con un ADN recombinante o "ADN transformante" y que se origina de dicho ADN transformante se denomina en lo sucesivo en el presente documento "ADN-T insertado" que comprende uno o más "transgenes". Los transgenes de EE-GM5 son un gen de resistencia a nematodos y un gen de tolerancia a herbicida inhibidor de HPPD. El "ADN de planta" en el contexto de la presente invención se referirá a ADN que se origina de la planta que se transforma. Se encontrará ADN de planta habitualmente en el mismo locus genético en la planta de tipo silvestre correspondiente. El ADN-T insertado se puede caracterizar por la localización y la configuración en el sitio de incorporación de la molécula de ADN recombinante en el genoma de planta. El sitio en el genoma de planta donde se ha insertado un ADN recombinante también se denomina el "sitio de inserción" o "sitio diana". La inserción del ADN recombinante en la región del genoma de planta denominado "ADN de planta preinserción" (o "locus preinserción") puede asociarse con una supresión del ADN de planta, denominado "supresión de sitio diana". Una "región flanqueante" o "secuencia flanqueante" como se usa en el presente documento se refiere a una secuencia de al menos 10 pb, al menos 20 pb, al menos 50 pb y hasta 5000 pb de ADN diferente del ADN-T introducido, con preferencia ADN del genoma de planta que se localiza inmediatamente cadena arriba de y contiguo con o inmediatamente cadena abajo de y contiguo con el ADN-T insertado. Los procedimientos de transformación que conducen a integración aleatoria del ADN-T insertado darán como resultado transformantes con diferentes regiones flanqueantes, que son características y únicas para cada transformante. Cuando el ADN recombinante se introduce en una planta mediante cruce tradicional, su sitio de inserción en el genoma de planta, o sus regiones flanqueantes, generalmente no se cambiarán.

Un(a) "(secuencia/molécula de) ácido nucleico aislado" o "(secuencia/molécula de) ADN aislado", como se usa en el presente documento, se refiere a un(a) (secuencia/molécula de) ácido nucleico o ADN que ya no está en el ambiente natural del que se aisló, por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico en otro hospedador (bacteriano) o en un genoma de planta o un(a) (secuencia/molécula de) ADN o ácido nucleico de otro origen, tal como cuando está contenido en un gen quimérico bajo el control de un promotor expresable en plantas (heterólogo). Cualquier ácido nucleico o ADN de la presente invención, incluido cualquier cebador, también puede ser de

origen no natural, tal como un ácido nucleico o ADN con una secuencia idéntica a una secuencia que aparezca en la naturaleza, pero que tiene un marcador (ausente del homólogo de origen natural), o con una secuencia que tiene al menos una adición o reemplazo de nucleótidos o al menos una supresión de nucleótidos interna en comparación con un nucleótido existente en la naturaleza o con una secuencia que tiene una identidad de secuencia inferior al 100 % (no idéntica) con un ácido nucleico existente en la naturaleza o ADN o fragmento del mismo, o un ácido nucleico o ADN con una secuencia que consiste en secuencias de nucleótidos de diferentes orígenes que no aparecen juntos en la naturaleza (un ADN quimérico o híbrido) o un ácido nucleico o ADN sintético artificial con una secuencia diferente del ácido nucleico o ADN natural o un fragmento del mismo.

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

Un evento de élite, como se usa en el presente documento, es un evento que se selecciona de un grupo de eventos, obtenidos por transformación con el mismo ADN transformante, en base a una eficacia de rasgo óptima y expresión superior, estabilidad del transgén (o transgenes) y su compatibilidad con características agrónomas óptimas de la planta que lo comprende. Por tanto, los criterios para selección del evento de élite son uno o más, con preferencia dos o más, provechosamente todos los siguientes:

a) eficacia del rasgo;

b) que la presencia del ADN-T insertado no altere otras características deseadas de la planta, tales como las relacionadas con el rendimiento agrónomo o

valor comercial;

c) que el evento esté caracterizado por una configuración molecular bien definida que se hereda de forma estable y para la que pueden desarrollarse herramientas apropiadas para control de la identidad;

d) que el gen (o los genes) de interés muestre(n) una expresión fenotípica correcta, apropiada y estable espacial y temporal, a un nivel aceptable desde el punto de vista comercial en una serie de condiciones ambientales en las que las plantas que portan el evento probablemente se expongan en el uso agrónomo normal.

Se prefiere que el ADN-T insertado esté asociado con una posición en el genoma de planta que permita la introgresión sencilla en fondos genéticos comerciales deseados.

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

Un "evento de élite" se refiere por tanto a un locus genético que comprende un ADN-T insertado, que cumple los criterios descritos anteriormente. Una planta, material de planta o descendencia tales como semillas pueden comprender uno o más eventos de élite diferentes en su genoma.

Las herramientas desarrolladas para identificar un evento de élite o la planta o el material de planta que comprenden un evento de élite o productos que comprenden material de planta que comprende el evento de élite se basan en las características genómicas específicas del evento de élite, tales como un mapa de restricción específico de la región genómica que comprende el ADN-T insertado, marcadores moleculares o la secuencia de la región (o regiones) flanqueante(s) del ADN-T insertado.

Una vez que una o ambas de las regiones flanqueantes del ADN-T insertado se han secuenciado, pueden desarrollarse cebadores y/o sondas que reconocen específicamente esta (o estas) secuencia(s) en el ácido nucleico (ADN o ARN) de una muestra por medio de una técnica de biología molecular. Por ejemplo, puede desarrollarse un método de PCR para identificar el evento de élite en muestras biológicas (tales como muestras de plantas, material de planta o productos que comprenden material de planta). Dicha PCR se basa en al menos dos "cebadores" específicos, uno que reconoce una secuencia en la región flanqueante de ADN-T 5' o 3' del evento de élite y el otro que reconoce una secuencia en el ADN-T insertado. Los

cebadores tienen con preferencia una secuencia de entre 15 y 35 nucleótidos que en condiciones de PCR optimizadas "reconocen específicamente" una secuencia en la región flanqueante de ADN-T 5' o 3' del evento de élite y el ADN-T insertado del evento de élite, respectivamente, de modo que un fragmento específico ("fragmento de integración" o amplicón diferenciador) se amplifica a partir de una muestra de ácido nucleico que comprende el evento de élite. Esto significa que solamente el fragmento de integración dirigido, y ninguna otra secuencia en el genoma de la planta o ADN-T insertado, se amplifica en condiciones de PCR optimizadas.

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

- oligonucleótidos de longitud que varía de 17 nt a aproximadamente 200 nt, que comprenden una secuencia de nucleótidos de al menos 17 nucleótidos consecutivos, con preferencia 20 nucleótidos consecutivos, seleccionados de la secuencia flanqueante de ADN-T 5' (SEQ ID NO. 5 del nucleótido 1 al nucleótido 166 o SEQ ID NO. 24 del nucleótido 1 al nucleótido 1113 o secuencias genómicas de plantas cadena arriba de las mismas y contiguas con las mismas) en su extremo 3' (cebadores que reconocen secuencias flanqueantes de ADN-T 5'); u
- oligonucleótidos de longitud que varía de 17 nt a aproximadamente 200 nt, que comprenden una secuencia de nucleótidos de al menos 17 nucleótidos consecutivos, con preferencia 20 nucleótidos consecutivos, seleccionados de la secuencia flanqueante de ADN-T 3' (complemento de la SEQ ID NO. 6 del nucleótido 359 al nucleótido 691 o la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO. 25 del nucleótido 359 al nucleótido 1449 o secuencias genómicas de plantas cadena abajo de las mismas y contiguas con las mismas) en su extremo 3' (cebadores que reconocen secuencias flanqueantes de ADN-T 3'); u
- oligonucleótidos de longitud que varía de 17 nt a aproximadamente 200 nt, que comprenden una secuencia de nucleótidos de al menos 17 nucleótidos consecutivos, con preferencia 20 nucleótidos consecutivos, seleccionados de las secuencias de ADN-T insertadas (complemento de la SEQ ID NO. 5 del nucleótido 167 al nucleótido 353 o la secuencia de la SEQ ID NO. 6 del nucleótido 1 al nucleótido 358 o la secuencia de la SEQ ID NO. 11 del nucleótido 1 al nucleótido 7459 o la secuencia de la SEQ ID NO. 23 del nucleótido 1114 al nucleótido 8572, o su complemento) en su extremo 3' (cebadores que reconocen ADN-T insertado).

Se entenderá que los cebadores que reconocen las secuencias flanqueantes de ADN-T 5' pueden usarse en una reacción de PCR junto con cebadores que reconocen el ADN-T insertado que se seleccionan del complemento de la SEQ ID NO.

5 del nucleótido 167 al nucleótido 353 o secuencias de ADN-T cadena abajo del mismo y contiguas con el mismo, mientras que los cebadores que reconocen las secuencias flanqueantes de ADN-T 3' pueden usarse en una reacción de PCR junto con cebadores que reconocen el ADN-T insertado que se seleccionan de la secuencia de la SEQ ID NO. 6 del nucleótido 1 al nucleótido 358 o ADN-T cadena arriba de la misma y contigua con la misma. También pueden seleccionarse cebadores que reconocen ADN-T insertado de la secuencia de la SEQ ID NO. 11 del nucleótido 1 al nucleótido 7459 o la secuencia de la SEQ ID NO. 23 del nucleótido 1114 al nucleótido 8572, o su complemento.

Los cebadores pueden ser, por supuesto, más largos que los 17 nucleótidos consecutivos y pueden, por ejemplo, ser de 20, 21, 30, 35, 50, 75, 100, 150, 200 nt de longitud o incluso más largos. Los cebadores pueden consistir completamente en una secuencia de nucleótidos seleccionada de las secuencias de nucleótidos mencionadas de secuencias flanqueantes y secuencias de ADN-T insertadas. Sin embargo, la secuencia de nucleótidos de los cebadores en su extremo 5' (es decir, fuera de los 17 nucleótidos consecutivos en el extremo 3') es menos crítica. Por tanto, la secuencia 5' de los cebadores puede comprender o consistir en una secuencia de nucleótidos seleccionada de las secuencias flanqueantes o ADN-T insertado, según sea apropiado, pero puede contener varios (por ejemplo, 1, 2, 5 o 10) desapareamientos en comparación con el ADN-T o ADN flanqueante de ADN-T. La secuencia 5' de los cebadores puede ser completamente una secuencia de nucleótidos no relacionada con las secuencias flanqueantes o ADN-T insertado, tal como, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que representa uno o más sitios de reconocimiento de enzimas de restricción, o tal como secuencias de nucleótidos capaces de unirse con otros oligonucleótidos, tales como oligonucleótidos marcados, tales como casetes de FRET (LGC genomics; véase Semagn *et al.*, 2014, Mol Breeding 33:1-14, y documento US 7615620). Dichas secuencias no relacionadas o secuencias de ADN flanqueantes con desapareamientos no deberían ser con preferencia mayores de 100, con mayor preferencia no mayores de 50 o incluso 25 nucleótidos. Los cebadores también pueden modificarse con un marcador, tal como un marcador fluorescente.

Por otra parte, los cebadores adecuados pueden comprender o consistir (esencialmente) en una secuencia de nucleótidos en su extremo 3' que abarca la región de unión entre las secuencias procedentes de región flanqueante de ADN-T 5' o 3' y las secuencias de ADN-T insertadas (localizadas en los nucleótidos 166 y 167 en la SEQ ID NO.5 y los nucleótidos 358 y 359 en la SEQ ID NO. 6, o los nucleótidos

1113 y 1114 en la SEQ ID NO. 24 y los nucleótidos 358 y 359 en la SEQ ID NO. 25) siempre que los 17 nucleótidos consecutivos localizados en 3' mencionados no procedan exclusivamente del ADN-T insertado o las secuencias flanqueantes de ADN-T en las SEQ ID NO. 5 o 6 o las SEQ ID NO. 24 o 25.

También resultará inmediatamente evidente para una persona del oficio de nivel medio que los pares de cebadores de PCR seleccionados de forma apropiada no deberían comprender también secuencias complementarias entre sí.

Para el fin de la invención, el "complemento de una secuencia de nucleótidos representada en la SEQ ID NO. X" es la secuencia de nucleótidos que puede obtenerse de la secuencia de nucleótidos representada reemplazando los nucleótidos con su nucleótido complementario según las normas de Chargaff ($A \rightleftharpoons T$; $G \rightleftharpoons C$) y leyendo la secuencia en la dirección de 5' a 3', es decir, en dirección opuesta de la secuencia de nucleótidos representada.

Son ejemplos de cebadores adecuados las secuencias oligonucleotídicas de la SEQ ID NO. 13 o la SEQ ID NO. 19 o las SEQ ID NO. 26 o 27 (cebador que reconoce la secuencia flanqueante de ADN-T 3' o 5'), o la SEQ ID NO. 12 o la SEQ ID NO. 18 o las SEQ ID NO. 28 o 29 (cebador que reconoce ADN-T insertado para su uso con los cebadores que reconocen la secuencia flanqueante de ADN-T 3' o 5').

Con preferencia, el fragmento amplificado tiene una longitud de entre 50 y 500 nucleótidos, tal como una longitud de entre 50 y 150 nucleótidos. Los cebadores específicos pueden tener una secuencia que es entre 80 y 100 % idéntica a una secuencia en la región flanqueante de ADN-T 5' o 3' del evento de élite y el ADN-T insertado del evento de élite, respectivamente, siempre que los desapareamientos aún permitan la identificación específica del evento de élite con estos cebadores en condiciones de PCR optimizadas. El intervalo de desapareamientos permisibles, no obstante, puede determinarse fácilmente de forma experimental y es conocido por una persona del oficio de nivel medio.

Puede realizarse detección de fragmentos de integración de diversas maneras, por ejemplo, mediante estimación del tamaño después de análisis en gel. Los fragmentos de integración también pueden secuenciarse directamente. También se conocen en la técnica otros métodos específicos de secuencia para la detección de fragmentos de ADN amplificado. También pueden detectarse fragmentos de ADN amplificados usando secuencias marcadas y detección del marcador. Por ejemplo, puede incluirse una sonda marcada en la mezcla de reacción que se une específicamente con el fragmento amplificado. En una realización, la sonda marcada

(sonda de hibridación de FRET) puede comprender un marcador fluorescente y un interruptor, de modo que el casete de FRET ya no esté inactivado y emita fluorescencia cuando se une al producto de PCR. Como alternativa, un casete de FRET marcado, es decir, un oligonucleótido marcado con un marcador fluorescente y un interruptor, pueden incluirse en la mezcla de reacción que se une específicamente con uno de los cebadores en la mezcla de reacción, tal como un casete de FRET dirigido a una extensión 5' del cebador usado en la mezcla de reacción (véase, por ejemplo, Semagn *et al.*, 2014, Mol Breeding 33:1-14 y documento US 7615620). La fluorescencia puede medirse usando métodos conocidos en la técnica. La fluorescencia puede medirse en tiempo real, es decir, durante cada ciclo de la reacción de PCR. La fluorescencia también puede medirse al final de la reacción de PCR.

Ya que la secuencia de los cebadores y su localización relativa en el genoma son únicos para el evento de élite, se producirá amplificación del fragmento de integración solamente en muestras biológicas que comprenden (el ácido nucleico de) el evento de élite. Con preferencia, cuando se realiza una PCR para identificar la presencia de EE-GM5 en muestras desconocidas, se incluye un control de un conjunto de cebadores con el que un fragmento en un "gen constitutivo" de la especie de planta del evento puede amplificarse. Los genes constitutivos son genes que se expresan en la mayoría de tipos celulares y que se ocupan de actividades metabólicas básicas comunes para todas las células. Con preferencia, el fragmento amplificado a partir del gen constitutivo es un fragmento que es mayor que el fragmento de integración amplificado. Dependiendo de las muestras para analizar, pueden incluirse otros controles.

Se describen protocolos de PCR en la técnica, tal como en "PCR Applications Manual" (Roche Molecular Biochemicals, 2ª edición, 1999, o 3ª edición, 2006) y otras referencias. Las condiciones óptimas para la PCR, incluida la secuencia de los cebadores específicos, se especifican en un "protocolo de identificación de PCR (o reacción en cadena de la polimerasa)" para cada evento de élite. Se entiende, sin embargo, que puede ser necesario ajustar varios parámetros en el protocolo de identificación de PCR a las condiciones específicas de laboratorio y pueden modificarse ligeramente para obtener resultados similares. Por ejemplo, el uso de un método diferente para preparación de ADN puede requerir el ajuste de, por ejemplo, la cantidad de cebadores, polimerasa y las condiciones de hibridación usadas. De forma similar, la selección de otros cebadores puede dictar otras condiciones óptimas para el protocolo de identificación de PCR. Sin embargo, estos ajustes resultarán evidentes

para una persona del oficio de nivel medio y están más detalladas en manuales de aplicación de PCR actuales tales como el citado anteriormente.

Como alternativa, pueden usarse cebadores específicos para amplificar un fragmento de integración que puede usarse como una "sonda específica" para identificar EE-GM5 en muestras biológicas. Poner en contacto ácido nucleico de una muestra biológica con la sonda, en condiciones que permitan la hibridación de la sonda con su fragmento correspondiente en el ácido nucleico, da como resultado la formación de un híbrido de ácido nucleico/sonda. La formación de este híbrido puede detectarse (por ejemplo, mediante marcaje del ácido nucleico o sonda), por lo que la formación de este híbrido indica la presencia de EE-GM5. Dichos métodos de identificación basados en hibridación con una sonda específica (en un vehículo de fase sólida o en solución) se han descrito en la técnica. La sonda específica es con preferencia una secuencia que, en condiciones optimizadas, hibrida específicamente con una región que comprende parte de la región flanqueante de ADN-T 5' o 3' del evento de élite y parte del ADN-T insertado contiguo con la misma (denominada en lo sucesivo en el presente documento "región específica"). Con preferencia, la sonda específica comprende una secuencia de entre 50 y 500 pb o de 100 a 350 pb que es al menos 80 %, o entre 80 y 85 %, o entre 85 y 90 %, o entre 90 y 95 % o entre 95 % y 100 % idéntica (o complementaria) o es idéntica (o complementaria) a la secuencia de nucleótidos de una región específica de EE-GM5. Con preferencia, la sonda específica comprenderá una secuencia de aproximadamente 15 a aproximadamente 100 nucleótidos contiguos idénticos (o complementarios) a una región específica del evento de élite.

También pueden usarse oligonucleótidos adecuados como cebadores de PCR para la detección del evento de élite EE-GM5 para desarrollar un protocolo basado en PCR para determinar el estado de cigosidad de plantas que contienen el evento de élite. Para este fin, se diseñan dos cebadores que reconocen el locus de tipo silvestre antes de la integración de tal manera que se dirijan uno al otro y tengan el sitio de inserción localizado entre los cebadores. Estos cebadores pueden contener cebadores que reconocen específicamente las secuencias flanqueantes de ADN-T 5' y/o 3' de EE-GM5. Este conjunto de cebadores que reconocen el locus de tipo silvestre antes de la integración, junto con un tercer cebador complementario de secuencias de ADN transformante (ADN-T insertado) permite la amplificación simultánea por PCR de diagnóstico del locus específico de EE-GM5, así como del locus de tipo silvestre. Si la planta es homocigota para el locus transgénico o el locus de tipo silvestre

correspondiente, la PCR de diagnóstico dará lugar a un único producto de PCR típico, con preferencia típico en su longitud, para el locus transgénico o de tipo silvestre. Si la planta es hemicigota para el locus transgénico, aparecerán dos productos de PCR específicos de locus, que reflejan la amplificación del locus tanto transgénico como de tipo silvestre.

Como alternativa, para determinar el estado de cigosidad de plantas que contienen el evento de élite, se diseñan dos cebadores que reconocen el locus de tipo silvestre antes de la integración de tal manera que se dirijan uno al otro y que un cebador reconozca específicamente las secuencias flanqueantes de ADN-T 5' o 3' contenidas en las SEQ ID NO. 5 o 6 o en las SEQ ID NO. 24 o 25, y que un cebador reconozca específicamente las secuencias flanqueantes de ADN-T 3' o 5' contenidas en las SEQ ID NO. 6 o 5 o las SEQ ID NO. 24 o 25, o reconozca específicamente el locus preinserción. Para la presente invención, un par de cebadores adecuado que reconoce el locus de tipo silvestre antes de la integración es un par de cebadores que contiene un cebador que comprende o consiste (esencialmente) en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 21 y un cebador que comprende o consiste (esencialmente) en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 19. Este conjunto de cebadores, junto con un tercer cebador complementario de secuencias de ADN transformante (ADN-T insertado) o complementario de secuencias de ADN transformante y las secuencias flanqueantes de ADN-T 5' o 3' contiguas con las mismas y en una dirección hacia el cebador que reconoce específicamente las secuencias flanqueantes de ADN-T 5' o 3' (tales como un cebador que comprende o consiste (esencialmente) en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 18, que está en una dirección hacia el cebador que comprende o consiste (esencialmente) en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 19) permiten amplificación por PCR de diagnóstico del locus específico de EE-GM5, así como del locus de tipo silvestre, simultánea. Si la planta es homocigota para el locus transgénico o el locus de tipo silvestre correspondiente, la PCR de diagnóstico dará lugar a un único producto de PCR típico para el locus transgénico o de tipo silvestre. Si la planta es hemicigota para el locus transgénico, aparecerán dos productos de PCR específicos de locus, que reflejan la amplificación del locus tanto transgénico como de tipo silvestre.

La detección de los productos de PCR típicos para el locus de tipo silvestre y transgénico puede basarse en la determinación de la longitud de los productos de PCR que puede ser típica del locus de tipo silvestre y transgénico. Como alternativa, puede realizarse detección de los productos de PCR típicos para el locus de tipo

silvestre y transgénico mediante modificación del cebador específico para el locus preinserción y mediante modificación del cebador específico para el ADN-T insertado y detección de la incorporación en un producto de PCR de los cebadores modificados. Por ejemplo, el cebador específico para el locus preinserción y el cebador específico para el ADN-T insertado pueden marcarse usando un marcador fluorescente, en donde los marcadores son diferentes para los dos cebadores. Puede detectarse fluorescencia cuando el cebador se incorpora en un producto de PCR. Si la planta es homocigota para el locus transgénico o el locus de tipo silvestre correspondiente, puede detectarse fluorescencia del marcador del cebador específico para el ADN-T insertado solamente o del cebador específico para el locus preinserción solamente. Si la planta es hemicigota para el locus transgénico, puede detectarse fluorescencia tanto del marcador del cebador específico para el ADN-T insertado y del cebador específico para el locus preinserción, lo que refleja la amplificación del locus tanto transgénico como de tipo silvestre.

Como alternativa, el cebador específico para el locus preinserción y el cebador específico para el ADN-T insertado puede tener una extensión 5' que se une específicamente con un casete de FRET marcado, es decir un oligonucleótido marcado con un marcador fluorescente y un interruptor, en donde la extensión 5' y los casetes de FRET correspondientes son diferentes para los dos cebadores (véase, por ejemplo, Semagn *et al.*, 2014, Mol Breeding 33:1-14, y el documento US 7615620). Puede detectarse fluorescencia cuando el cebador se incorpora en un producto de PCR y, posteriormente, el casete de FRET se incorpora en el producto de PCR. Si la planta es homocigota para el locus transgénico o el locus de tipo silvestre correspondiente, puede detectarse fluorescencia del casete de FRET que se une específicamente con el cebador específico para el ADN-T insertado solamente o del casete de FRET que se une específicamente con el cebador específico para el locus preinserción solamente. Si la planta es hemicigota para el locus transgénico, puede detectarse fluorescencia tanto del marcador del casete de FRET que se une específicamente con el cebador específico para el ADN-T insertado como del casete de FRET que se une con el cebador específico para el locus preinserción, lo que refleja la amplificación del locus tanto transgénico como de tipo silvestre.

Si la planta es homocigota para el locus transgénico o el locus de tipo silvestre correspondiente, la PCR de diagnóstico dará lugar a un único producto de PCR típico, con preferencia típico en su longitud, para el locus transgénico o de tipo silvestre. Si la planta es hemicigota para el locus transgénico, aparecerán dos productos de PCR

específicos de locus, que reflejan la amplificación del locus tanto transgénico como de tipo silvestre.

Como alternativa, para determinar el estado de cigosidad de plantas que contienen el evento de élite, la presencia del evento puede determinarse en una reacción de PCR de una manera cuantitativa como se describe en los ejemplos. Para este fin, se diseñan dos cebadores que reconocen el evento EE-GM5 de tal modo que se dirijan uno al otro, en donde un cebador reconoce específicamente la secuencia flanqueante de ADN-T 5' o 3' contenida en las SEQ ID NO. 5 o 6 o en las SEQ ID NO. 24 o 25, y en donde un cebador reconoce específicamente el ADN-T insertado en las SEQ ID NO. 5 o 6 o en las SEQ ID NO. 24 o 25 o en las SEQ ID NO. 11 o 23. Este conjunto de cebadores permite la amplificación por PCR del locus específico de EE-GM5. El fragmento de ADN amplificado puede detectarse de forma cuantitativa usando una sonda marcada que se incluye en la mezcla de reacción que se une de forma específica al fragmento amplificado. La sonda marcada puede comprender un marcador fluorescente y un interruptor, de modo que el marcador ya no esté inactivado y emita fluorescencia cuando se une al producto de PCR. La fluorescencia puede medirse en tiempo real, es decir, durante cada ciclo de la reacción de PCR, usando métodos conocidos en la técnica. El ciclo de PCR en el que la fluorescencia supera un nivel umbral determinado es una medida de la cantidad de locus específico de EE-GM5 en la muestra biológica que se analiza y el estado de cigosidad puede calcularse en base a muestras homocigotas y heterocigotas de referencia.

Como alternativa, el estado de cigosidad de plantas que comprende EE-GM5 también puede determinarse en base al análisis del número de copias, usando la química de Taqman y principios de PCR en tiempo real. El método alternativo incluirá normalmente una reacción específica de EE-GM5 para cuantificar el número de copias de EE-GM5 y una reacción específica de genes endógenos para normalización del número de copias de EE-GM5. Las muestras que contienen el evento EE-GM5 en un estado homocigoto tendrán un número de copias relativo que es dos veces mayor que las muestras hemicigotas. Las muestras acigotas no amplificarán la secuencia de EE-GM5 en dicho método.

Asimismo, también pueden desarrollarse métodos de detección específicos del evento de élite EE-GM5 que difieren de métodos de amplificación basados en PCR usando la información de secuencia específica de evento de élite proporcionada en el presente documento. Dichos métodos de detección alternativos incluyen métodos de detección de amplificación de señales lineales en base a la escisión invasiva de

estructuras de ácido nucleico particulares, también conocidas como tecnología Invader™, (como se describe por ejemplo en las patentes de los Estados Unidos 5.985.557 "Invasive Cleavage of Nucleic Acids", 6.001.567 "Detection of Nucleic Acid sequences by Invader Directed Cleavage", incorporadas en el presente documento por referencia). Para este fin, la secuencia diana se hibrida con un primer oligonucleótido de ácido nucleico marcado que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 5 de la posición de nucleótido 167 a la posición de nucleótido 184 o su complemento o que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 6 de la posición de nucleótido 341 a la posición de nucleótido 358, o su complemento, y se hibrida adicionalmente con un segundo oligonucleótido de ácido nucleico de la SEQ ID NO. 5 del nucleótido 149 al nucleótido 166 o su complemento o dicho oligonucleótido de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 6 del nucleótido 359 al nucleótido 376 o su complemento, en donde dicho primer y segundo oligonucleótido se solapan en al menos un nucleótido.

La estructura bicatenaria o tricatenaria que es producida por esta hibridación permite escisión de sonda selectiva con una enzima (Cleavase®) dejando la secuencia diana intacta. La sonda marcada escindida se detecta posteriormente, potencialmente mediante una etapa intermedia que da como resultado la amplificación de señal adicional.

En una realización se proporciona un método para detectar la presencia del evento de élite EE-GM5 en muestras biológicas mediante hibridación con una sonda de ácido nucleico marcada sustancialmente complementaria en la que la relación de sonda:ácido nucleico diana se amplifica mediante el reciclado de la secuencia de ácido nucleico diana, donde dicho método comprende:

a) hibridar dicha secuencia de ácido nucleico diana con un primer oligonucleótido de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 5 de la posición de nucleótido 167 a la posición de nucleótido 184 o su complemento o dicho primer oligonucleótido de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 6 de la posición de nucleótido 341 a la posición de nucleótido 358 o su complemento;

b) hibridar dicha secuencia de ácido nucleico diana con un segundo oligonucleótido de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 5 del nucleótido 149 al nucleótido 166 o su complemento o dicho segundo oligonucleótido de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 6 del nucleótido 359 al nucleótido 376 o su complemento, en donde dicho primer y

segundo oligonucleótido se solapan en al menos un nucleótido y en donde dicho primer o dicho segundo oligonucleótido se marca para ser dicha sonda de ácido nucleico marcada;

c) escindir solamente la sonda marcada en el dúplex de sonda:secuencia de ácido nucleico diana con una enzima que provoca escisión de sonda selectiva que da como resultado disociación de dúplex, dejando la secuencia diana intacta;

d) reciclar la secuencia de ácido nucleico diana repitiendo las etapas (a) a (c); y

e) detectar una sonda marcada escindida, con lo que se determina la presencia de dicha secuencia de ácido nucleico diana, y detectar la presencia del evento de élite EE-GM5 en dichas muestras biológicas.

Dos ácidos nucleicos son "sustancialmente complementarios", como se usa en el presente documento, cuando no son el complemento completo uno del otro (como se define en el presente documento), tal como cuando sus secuencias son al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % complementarias entre sí.

Un "kit", como se usa en el presente documento, se refiere a un conjunto de reactivos para el fin de realizar el método de la invención, más en particular, la identificación del evento de élite EE-GM5 en muestras biológicas o la determinación del estado de cigosidad de material de planta que contiene EE-GM5. Más en particular, una realización preferida del kit de la invención comprende al menos uno o dos cebadores específicos, como se ha descrito anteriormente para identificación del evento de élite o tres cebadores específicos, o dos cebadores específicos y una sonda específica, como se ha descrito anteriormente para la determinación del estado de cigosidad. Opcionalmente, el kit puede comprender además cualquier otro reactivo descrito en el presente documento en el protocolo de identificación de PCR o cualquiera de los otros protocolos como se describe en el presente documento para detección de EE-GM5. Como alternativa, según otra realización de la presente invención, el kit puede comprender una sonda específica, como se ha descrito anteriormente, que hibrida específicamente con ácido nucleico de muestras biológicas para identificar la presencia de EE-GM5 en las mismas. Opcionalmente, el kit puede comprender además cualquier otro reactivo (tal como, pero sin limitación, tampón de hibridación, marcador) para identificación de EE-GM5 en muestras biológicas, usando la sonda específica.

El kit de la invención puede usarse, y sus componentes pueden ajustarse específicamente, para fines de control de calidad (por ejemplo, pureza de lotes de

semillas), detección de la presencia o ausencia del evento de élite en material de planta o material que comprende o procede de material de planta, tal como, pero sin limitación, productos alimentarios o de pienso o industriales.

Como se usa en el presente documento, la "identidad de secuencia" con respecto a secuencias de nucleótidos (ADN o ARN), se refiere al número de posiciones con nucleótidos idénticos divididos por el número de nucleótidos en la más corta de las dos secuencias. El alineamiento de las dos secuencias de nucleótidos se realiza mediante el algoritmo de Wilbur y Lipmann (Wilbur y Lipmann, 1983, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 80:726) usando un tamaño de ventana de 20 nucleótidos, una longitud de palabra de 4 nucleótidos y una penalización de hueco de 4. Puede realizarse convenientemente análisis e interpretación asistidos por ordenador de datos de secuencias, incluido alineamiento de secuencias como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, usando el paquete de software de análisis de secuencias del Genetics Computer Group (GCG, Centro de biotecnología de la Universidad de Wisconsin). Las secuencias se indican como "esencialmente similares" cuando dichas secuencias tienen una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % o al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o al menos 99,9 %. Resulta evidente que cuando se dice que las secuencias de ARN son esencialmente similares o tienen un determinado grado de identidad de secuencia con secuencias de ADN, la timidina (T) en la secuencia de ADN se considera igual que uracilo (U) en la secuencia de ARN. Además, resulta evidente que pueden aparecer pequeñas diferencias o mutaciones en secuencias de ADN a lo largo del tiempo y que pueden permitirse algunos desapareamientos para cebadores específicos de evento o sondas de la invención, de modo que cualquier secuencia de ADN indicada en el presente documento en cualquier realización de la presente invención para cualquier ADN flanqueante de ADN-T 3' o 5' o para cualquier cebador o sonda de la presente invención también incluye secuencias esencialmente similares a las secuencias proporcionadas en el presente documento, tales como secuencias que hibridan al o con al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia proporcionada para cualquier ADN flanqueante de ADN-T 3' o 5', para cualquier cebador o sonda o para cualquier inserto o ADN-T insertado de la presente invención, tal como una secuencia de nucleótidos que difiere en 1 a 200, 1

a 150, 1 a 100, 1 a 75, 1 a 50, 1 a 30, 1 a 20, 1 a 10, 1 a 5 o 1 a 3 nucleótidos de cualquier secuencia dada.

El término "cebador", como se usa en el presente documento, abarca cualquier ácido nucleico que es capaz de iniciar la síntesis de un ácido nucleico naciente en un proceso dependiente de molde, tal como PCR. Normalmente, los cebadores son oligonucleótidos de 10 a 30 nucleótidos, pero pueden emplearse secuencias más largas. Pueden proporcionarse cebadores en forma bicatenaria, aunque se prefiere la forma monocatenaria. Pueden usarse sondas como cebadores, pero se diseñan para unirse con el ADN o ARN diana y no es necesario usarlos en un proceso de amplificación.

El término "reconocer", como se usa en el presente documento cuando se hace referencia a cebadores o sondas específicos, se refiere al hecho de que los cebadores o sondas específicos hibridan específicamente con una secuencia de ácido nucleico en el evento de élite en las condiciones expuestas en el método (tales como las condiciones del protocolo de identificación de PCR), por el que la especificidad se determina mediante la presencia de controles positivos y negativos.

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

Como se usa en el presente documento, una muestra biológica es una muestra de una planta, material de planta o productos que comprenden material de planta. Se pretende que el término "planta" abarque tejidos de planta de soja (*Glycine max*), en

cualquier estadio de madurez, así como cualquier célula, tejido u órgano tomado o procedente de cualquier planta de este tipo, incluyendo, sin limitación, cualquier semilla, hoja, tallo, flor, raíz, célula individual, gameto, cultivo celular, cultivo tisular o protoplasto. "Material de planta", como se usa en el presente documento, se refiere a material que se obtiene o procede de una planta. Los productos que comprenden material de planta se refieren a alimento, pienso u otros productos que se producen usando material de planta o pueden estar contaminados por material de planta. Se entiende que, en el contexto de la presente invención, dichas muestras biológicas se ensayan para determinar la presencia de ácidos nucleicos específicos para EE-GM5, que implica la presencia de ácidos nucleicos en las muestras. Por tanto, los métodos a los que se hace referencia en el presente documento para identificar el evento de élite EE-GM5 en muestras biológicas, se refieren a la identificación en muestras biológicas de ácidos nucleicos que comprenden el evento de élite.

Como se usa en el presente documento, debe interpretarse que "comprender" especifica la presencia de las características, los elementos integrantes, las etapas, los reactivos o los componentes indicados a los que se hace referencia, pero no excluye la presencia o adición de una o más características, elementos integrantes, etapas o componentes, o grupos de los mismos. Por tanto, por ejemplo, un ácido nucleico o proteína que comprende una secuencia de nucleótidos o aminoácidos puede comprender más nucleótidos o aminoácidos que los de hecho citados, es decir, estar incluido en un ácido nucleico o proteína mayor. Un gen quimérico que comprende una secuencia de ADN que está definida funcional o estructuralmente puede comprender secuencias de ADN adicionales, tales como secuencias promotoras, líder, de seguimiento y/o de terminación de transcritos (que posiblemente también incluyen un ADN que codifica un péptido de dirección o tránsito).

La presente invención también se refiere al desarrollo de un evento de élite EE-GM5 en plantas de soja que comprenden este evento, donde las plantas y semillas descendientes comprenden el evento de élite EE-GM5 obtenido de estas plantas y a las células de planta o material de planta procedente de plantas que comprenden este evento. Pueden obtenerse plantas que comprenden el evento de élite EE-GM5 como se describe en los ejemplos. La presente invención también se refiere a semilla que comprende el evento de élite EE-GM5 depositado en la ATCC con el número de depósito PTA-123625 o derivados del mismo que comprenden el evento de élite EE-GM5. Los "derivados (de semilla)", como se usa en el presente documento, se refiere a plantas que pueden cultivarse a partir de dicha semilla, descendencia resultante de

autofecundación, cruzamiento o retrocruzamiento, así como células de planta, órganos, partes, tejido, cultivos celulares, protoplastos y material de planta de los mismos.

Pueden identificarse plantas de soja o material de planta que comprenden EE-GM5 según uno cualquiera de los protocolos de identificación para EE-GM5 como se ha descrito en los ejemplos, incluido el método de puntos finales para el análisis de la identidad de EE-GM5 en el ejemplo 2.1, el método de puntos finales para el análisis de la identidad de EE-GM5 y cigosidad como se describe en el ejemplo 2.2, el método de PCR en tiempo real para el análisis de la presencia de nivel bajo de EE-GM5 en el ejemplo 2.3 o la PCR en tiempo real para el análisis de la presencia de nivel bajo de EE-GM5 como se describe en el ejemplo 2.4. Brevemente, se amplifica ADN genómico de soja presente en la muestra biológica mediante PCR usando un cebador que reconoce específicamente una secuencia en la secuencia flanqueante de ADN-T 5' o 3' de EE-GM5 tal como el cebador con la secuencia de la SEQ ID NO. 13 o SEQ ID NO. 19 y un cebador que reconoce una secuencia en el ADN-T insertado, tal como el cebador con la secuencia de la SEQ ID NO. 12 o SEQ ID NO. 18 o con un cebador que reconoce la secuencia flanqueante de ADN-T 5' o 3' de EE-GM5 y el ADN-T insertado contiguo con la misma. Se usan cebadores de ADN que amplifican parte de una secuencia de soja endógena como control positivo para la amplificación por PCR. Si, tras la amplificación por PCR, el material produce un fragmento del tamaño esperado o da lugar a la fluorescencia del marcador fluorescente esperado, el material contiene material de planta de una planta de soja que alberga el evento de élite EE-GM5.

Las plantas que albergan EE-GM5 se caracterizan por su resistencia a nematodos, en particular resistencia a SCN, nematodo de las praderas y/o nematodo de los nudos de las raíces ("RKN") y/o nematodo reniforme, así como por su tolerancia a inhibidores de HPPD tales como isoxaflutol, topramezona o mesotriona. Las plantas de soja en diferentes variedades disponibles en el mercado que albergan EE-GM5 también se caracterizan por tener características agrónomas que son comparables a las variedades disponibles en el mercado isogénicas no transgénicas correspondientes, en ausencia de aplicación de herbicida inhibidor de HPPD e infestación por SCN. Se ha observado que la presencia de un ADN-T insertado en la región de inserción del genoma de planta de soja, descrito en el presente documento, confiere características fenotípicas y moleculares particularmente interesantes a las plantas que comprenden este evento.

También se proporciona en el presente documento un método para producir una planta de soja resistente a SCN y tolerante a herbicidas inhibidores de HPPD, que comprende introducir resistencia a SCN y tolerancia a herbicidas inhibidores de HPPD en el genoma de una planta de soja cruzando una primera planta de soja que carece de un gen que codifica Cry14Ab-1 y que carece de un gen que codifica HPPD-4 con una planta de soja que contiene EE-GM5 y seleccionar una planta descendiente resistente a SCN y tolerante a herbicidas inhibidores de HPPD. La resistencia a SCN puede medirse usando un ensayo de invernadero de SCN convencional, por ejemplo, www.plantpath.iastate.edu/tylkalab/greenhouse-resistance-screening y

www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/review/2009/sce08/.

Una realización de la presente invención proporciona un evento de élite en plantas de soja, que puede obtenerse por inserción de 2 transgenes en una localización específica en el genoma de soja, donde dicho evento de élite confiere resistencia a nematodos y tolerancia a un herbicida inhibidor de HPPD tal como isoxaflutol, topramezona o mesotriona en dichas plantas de soja, y en donde dicho evento de élite tiene un rendimiento agrónomo esencialmente similar a las líneas isogénicas (como se usa en el presente documento, las "líneas isogénicas" o "líneas casi isogénicas" son líneas de soja del mismo fondo genético pero que carecen de los transgenes, tales como plantas del mismo fondo genético que la planta usada para transformación, o líneas hermanas segregantes ("nulos") que han perdido los transgenes). En particular, la presente invención proporciona un evento de élite en plantas de soja, en donde la inserción o presencia de dicho evento de élite en el genoma de dichas plantas de soja no parece provocar un aumento de la susceptibilidad a enfermedad, no provoca una penalización de rendimiento o no provoca aumento del encamado, en comparación con líneas isogénicas o a cultivares de soja comerciales. Por tanto, la presente invención proporciona un evento de élite en plantas de soja, designado EE-GM5, que da como resultado plantas de soja que tienen resistencia mejorada a nematodos y pueden tolerar la aplicación de un herbicida inhibidor de HPPD tal como isoxaflutol, topramezona o mesotriona sin afectar de forma negativa al rendimiento de dichas plantas de soja en comparación con líneas isogénicas, donde dichas plantas de soja no son diferentes de forma estadísticamente significativa en su susceptibilidad a enfermedad o encamado, de las plantas de soja isogénicas o de cultivares de soja comerciales. Estas características hacen del evento de élite actual una herramienta valiosa en un programa de gestión del control de nematodos y resistencia a malas hierbas. En una realización, el evento

EE-GM5 se combina con uno o más eventos de GM de soja que proporcionan tolerancia a uno cualquiera o una combinación de herbicidas basados en glifosato, basados en glufosinato, basados en inhibidores de HPPD, basados en sulfonilurea o imidazolinona, inhibidores de AHAS o ALS y/o de tipo auxina (por ejemplo, dicamba 2,4-D), tales como evento EE-GM3 (también conocido como FG-072, MST-FGØ72-3, descrito en el documento WO2011063411, petición de USDA-APHIS 09-328-01p), evento SYHT0H2 (también conocido como 0H2, SYN-ØØØH2-5, descrito en el documento WO2012/082548 y 12-215-01p), evento DAS-68416-4 (también conocido como soja Enlist, descrito en los documentos WO2011/066384 y WO2011/066360, petición de USDA-APHIS 09-349-01p), evento DAS-44406-6 (también conocido como Enlist E3, DAS-444Ø6-6, descrito en el documento WO2012/075426 y USDA-APHIS 11-234-01p), evento MON87708 (evento tolerante a dicamba de sojas Roundup Ready 2 Xtend, descrito en el documento WO2011/034704 y petición de USDA-APHIS 10-188-01p, MON-877Ø8-9), evento MON89788 (también conocido como Genuity Roundup Ready 2 Yield, descrito en el documento WO2006/130436 y petición de USDA-APHIS 06-178-01p), evento 40-3-2 (también conocido como Roundup Ready, GTS 40-3-2, MON-Ø4Ø32-6, descrito en el documento petición de USDA-APHIS 93-258-01), evento A2704-12 (también conocido como LL27, ACS-GMØØ5-3, descrito en el documento WO2006108674 y petición de USDA-APHIS 96-068-01p), evento 127 (también conocido como BPS-CV127-9, descrito en el documento WO2010/080829), evento A5547-127 (también conocido como LL55, ACS-GMØØ6-4, descrito en el documento WO2006108675 y en la petición de USDA-APHIS 96-068-01p), evento MON87705 (MON-877Ø5-6, Vistive Gold, solicitud de patente de PCT publicada WO2010/037016, petición de USDA-APHIS 09-201-01p), o evento DP305423 (también conocido como DP-3Ø5423-1, solicitud de patente de PCT publicada WO2008/054747, petición de USDA-APHIS 06-354-01p) o EE-GM5 se combina con una combinación de los siguientes eventos: evento MON98788 x MON87708 (también conocido como sojas Roundup Ready 2 Xtend, MON-877Ø8-9 x MON-89788-1), evento HOS x evento 40-3-2 (también conocido como sojas de alto contenido oleico Plenish x sojas Roundup Ready), evento EE-GM3 x EE-GM2 (también conocido como FG-072xLL55, descrito en el documento WO2011063413), evento MON 87701 x MON 89788 (también conocido como soja Intacta RR2 Pro, MON-877Ø1-2 x MON-89788-1), DAS-81419-2 x DAS-44406-6 (también conocido como soja Conkesta™ Enlist E3™, DAS-81419-2 x DAS-444Ø6-6), evento DAS-68416-4 x evento MON 89788 (también conocido como soja Enlist™ RoundUp Ready® 2, DAS-68416-4 X MON-89788-1),

evento MON-87769-7 x evento MON-89788-1 (también conocido como sojas Omega-3 X Genuity Roundup Ready 2 Yield), evento MON 87705 x evento MON 89788 (también conocido como Vistive Gold, MON-87705-6 x MON-89788-1), o evento MON87769 x evento MON89788 (también conocido como sojas Omega-3 x Genuity Roundup Ready 2 Yield, MON-87769-7 x MON-89788-1).

También se proporciona en el presente documento una planta de soja o parte de la misma que comprende el evento EE-GM5, en donde se ha depositado semilla de soja representativa que comprende el evento EE-GM5 con el número de referencia de la ATCC PTA-123625. Se proporcionan además en el presente documento semillas de dichas plantas, que comprenden dicho evento, así como un producto de soja producido a partir de dichas semillas, en donde dicho producto de soja comprende el evento EE-GM5. Dicho producto de soja puede ser o puede comprender harina de soja, grano de soja molido, copos de soja o un producto que comprende cualquiera de estos productos de soja procesados. En particular, dicho producto de soja comprende un ácido nucleico que produce un diagnóstico de amplicón de o específico para el evento EE-GM5, donde dicho amplicón comprende la secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NO. 1 o 3 o las SEQ ID NO. 2 o 4. También se proporciona en el presente documento un método para producir un producto de soja, que comprende obtener una semilla o grano de soja que comprende el evento EE-GM5, y producir dicho producto de soja a partir del mismo. También se proporciona en el presente documento un método para obtener productos alimentarios, de pienso o industriales procesados procedentes de grano de soja, tales como aceite de soja, proteína de soja, lecitina, leche de soja, tofu, margarina, biodiésel, biocompuestos, adhesivos, disolventes, lubricantes, limpiadores, espuma, pintura, tinta, velas, productos alimentarios o de piensos (animales) que contienen aceite de soja o proteína de soja, donde dicho método comprende obtener grano que comprende EE-GM5 y producir dicho producto alimentario, de pienso o industrial procesado a partir de dicho grano. En una realización, este proceso también puede incluir la etapa de obtener una semilla o planta de soja que comprende el evento EE-GM5, cultivar dicha semilla o planta en un campo y recolectar el grano de soja. Opcionalmente, este método incluye la aplicación de un herbicida inhibidor de HPPD tal como IFT, topramezona o mesotriona antes de plantar, antes de la aparición, después de la aparición o sobre la parte superior de las plantas que comprenden EE-GM5. En una realización, se incluyen en la presente invención los productos alimentarios, de pienso o industriales procesados procedentes de soja anteriores, tales como dichos productos procesados que producen un

amplicón específico de evento EE-GM5 usando los métodos descritos en el presente documento o que comprenden la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de las SEQ ID NO. 1, 3 o 5, o las SEQ ID NO. 2, 4 o 6.

También se proporciona en el presente documento una planta de soja, que es descendiente de cualquiera de las plantas de soja anteriores y que comprende el evento EE-GM5, tal como una planta o semilla descendiente de una cualquiera de las plantas de soja anteriores que comprende la secuencia de las SEQ ID NO. 1 o 3 o la secuencia de las SEQ ID NO. 2 o 4 o una planta o semilla descendiente de una cualquiera de las plantas de soja anteriores que comprende la secuencia de las SEQ ID NO. 1 o 3 y la secuencia de las SEQ ID NO. 2 o 4 o una planta o semilla descendiente de una cualquiera de las plantas de soja anteriores que comprende la secuencia de la SEQ ID NO. 5 o la SEQ ID NO. 24 o la secuencia de la SEQ ID NO. 6 o la SEQ ID NO. 25 o una planta o semilla descendiente de una cualquiera de las plantas de soja anteriores que comprende la secuencia de la SEQ ID NO. 5 o la SEQ ID NO. 24 y la secuencia de la SEQ ID NO. 6 o la SEQ ID NO. 25.

Se proporciona además en el presente documento un método para producir una planta de soja resistente a nematodos y tolerante al herbicida isoxaflutol y/o topamezona y/o mesotriona, que comprende introducir en el genoma de dicha planta el evento EE-GM5, en particular cruzando una primera planta de soja que carece del evento EE-GM5 con una planta de soja que comprende EE-GM5 y seleccionar una planta descendiente resistente a nematodos y tolerante al herbicida isoxaflutol y/o topamezona y/o mesotriona.

También se proporcionan en el presente documento una planta de soja resistente a nematodos y tolerante al herbicida isoxaflutol, topamezona o mesotriona con características agrónomas aceptables, que comprende un gen que codifica Cry14Ab-1 y gen que codifica HPPD-4, y capaz de producir un diagnóstico de amplicón para el evento EE-GM5. También se proporcionan en el presente documento los amplicones aislados específicos (fragmentos de secuencia de ADN) como tales, que pueden obtenerse usando las herramientas de detección específicas descritas en el presente documento, en particular amplicones que incluyen en su secuencia un fragmento de ADN que se origina de ADN flanqueante de ADN-T 5' o 3' y el ADN insertado en el genoma de planta por transformación, como se define en el presente documento.

También se proporciona en el presente documento un método para controlar malas hierbas en un campo de plantas de soja que comprenden el evento EE-GM5 o

un campo para plantar con dichas plantas de soja (en donde dichas plantas se plantan en dicho campo después del tratamiento), que comprende tratar el campo con una cantidad eficaz de un herbicida inhibidor de HPPD tal como un herbicida a base de isoxaflutol o a base de topramezona o a base de mesotriona, en donde dichas plantas son tolerantes a dicho herbicida.

Se proporciona además en el presente documento un ADN que comprende la secuencia de las SEQ ID NO. 5 o 6 o una secuencia esencialmente similar a la misma, y cualquier planta, célula, tejido o semilla, en particular de soja, que comprende dicha secuencia de ADN, tal como una planta, célula, tejido o semilla que comprende EE-GM5. También se incluye en el presente documento cualquier planta, célula, tejido o semilla de soja, que comprende la secuencia de ADN (heterólogo o extraño para una planta, semilla, tejido o célula de soja convencional) de las SEQ ID NO. 5 o 6 o que comprende una secuencia de ADN con al menos 99 % o 99,5 % de identidad de secuencia con la secuencia de las SEQ ID NO. 5 o 24 o las SEQ ID NO. 6 o 25.

También se describe un ADN quimérico que comprende un ADN-T insertado, en donde la secuencia de dicho ADN-T insertado comprende la secuencia de la SEQ ID NO. 11 del nucleótido 1 al nucleótido 7459 o la SEQ ID NO. 23 del nucleótido 1114 al nucleótido 8572 o una secuencia con al menos 97, 98, 99, 99,5 o al menos 99,9 % de identidad de secuencia con la misma, flanqueada por una región flanqueante de ADN-T 5' y una 3', en donde la región flanqueante de ADN-T 5' inmediatamente cadena arriba de, y contigua con, dicho ADN-T insertado se caracteriza por una secuencia que comprende la secuencia de la SEQ ID NO. 5 del nucleótido 1 al nucleótido 166 o de la SEQ ID NO. 24 del nucleótido 1 al nucleótido 1113, y en donde la región flanqueante del ADN-T 3' inmediatamente cadena abajo de, y contigua con, dicho ADN-T insertado se caracteriza por una secuencia que comprende la secuencia de la SEQ ID NO. 6 del nucleótido 359 al nucleótido 691, o la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO. 25 del nucleótido 359 al nucleótido 1449. En una realización, la secuencia de dicho ADN-T insertado consiste en la secuencia de la SEQ ID NO. 11 del nucleótido 1 al nucleótido 7459 o la SEQ ID NO. 23 del nucleótido 1114 al nucleótido 8572 o una secuencia con al menos 97, 98, 99, 99,5 o al menos 99,9 % de identidad de secuencia con la misma, flanqueada por parte de una región flanqueante de ADN-T 5' y una 3', en donde la parte de dicha región flanqueante de ADN-T 5' inmediatamente cadena arriba de, y contigua con, dicho ADN-T insertado se caracteriza por una secuencia que consiste en la secuencia de la SEQ ID NO. 5 del nucleótido 1 al nucleótido 166 o de la SEQ ID NO. 24 del nucleótido 1 al nucleótido

1113 o una secuencia con al menos 97, 98, 99, 99,5 o al menos 99,9 % de identidad de secuencia con la misma y en donde la parte de la región flanqueante del ADN-T 3' inmediatamente cadena abajo de, y contigua con, dicho ADN-T insertado se caracteriza por una secuencia que consiste en la secuencia de la SEQ ID NO. 6 del nucleótido 359 al nucleótido 691 o la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO. 25 del nucleótido 359 al nucleótido 1449 o una secuencia con al menos 97, 98, 99, 99,5 o al menos 99,9 % de identidad de secuencia con la misma.

El ADN quimérico se refiere a secuencias de ADN, incluidas secuencias reguladoras y codificantes que no se encuentran juntas en la naturaleza. En consecuencia, un ADN quimérico puede comprender regiones de ADN adyacentes entre sí que proceden de diferentes fuentes o que se disponen de una manera diferente de la hallada en la naturaleza. Son ejemplos de un ADN quimérico las secuencias de las SEQ ID NO. 5 o 6.

También se proporciona en el presente documento una planta, célula de planta, tejido o semilla de soja transgénica, que comprende en su genoma el evento EE-GM5, caracterizado por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos esencialmente similar a las SEQ ID NO. 1 o 3 y una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos esencialmente similar a las SEQ ID NO. 2 o 4, o el complemento de dichas secuencias, así como una planta, célula de planta, tejido o semilla de soja, que comprende en su genoma el evento EE-GM5, caracterizado por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos esencialmente similar a las SEQ ID NO. 5 o 24 y las SEQ ID NO. 6 o 25, o el complemento de dichas secuencias.

También se proporciona en el presente documento una planta, célula, tejido o semilla de soja, que comprende EE-GM5, caracterizado por comprender en el genoma de sus células una secuencia de ácido nucleico con al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con una cualquiera de las SEQ ID NO. 1, 3, 5 o 24 y una secuencia de ácido nucleico con al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con una cualquiera de las SEQ ID NO. 2, 4, 6 o 25, o el complemento de dichas secuencias.

El término "isoxaflutol", como se usa en el presente documento, se refiere al herbicida isoxaflutol [es decir, (5-ciclopropil-4-isoxazolil)[2-(metilsulfonil)-4-(trifluorometil)fenil]metanona], el metabolito activo del mismo, dicetonitrilo, y cualquier

mezcla o solución que comprende dicho compuesto. Los dicetonitrilos son herbicidas inhibidores de HPPD útiles para aplicación en el evento de esta invención, por ejemplo, 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-metilsulfonil-4-trifluorometilfenil)-propano-1,3-diona y 2-ciano-1-[4-(metilsulfonil)-2-trifluorometilfenil]-3-(1-metilciclopropil)propano-1,3-fiona; otros isoxazoles; y los pirazolinatos, por ejemplo topamezona [es decir, [3-(4,5-dihidro-3-isoxazolil)-2-metil-4-(metilsulfonil)fenil](5-hidroxi-1-metil-1H-pirazol-4-il)metanona] y pirasulfotol [(5-hidroxi-1,3-dimetilpirazol-4-il(2-metil-4-trifluorometilfenil)metanona]; o mesotriona [2-[4-(Metilsulfonil)-2-nitrobenzoil]ciclohexano-1,3-diona]; o 2-cloro-3-(metilsulfonil)-N-(1-metil-1H-tetrazol-5-il)-4-(trifluorometil)benzamida; o 2-metil-N-(5-metil-1,3,4-oxadiazol-2-il)-3-(metilsulfonil)-4-(trifluorometil)benzamida; o pirazofeno [2-[4-(2,4-diclorobenzoil)-1,3-dimetilpirazol-5-il]acetofenona].

En una realización de la presente invención, puede tratarse un campo para plantar con plantas de soja que contienen el evento EE-GM5 con un herbicida inhibidor de HPPD, tal como isoxaflutol ('IFT'), topamezona o mesotriona, o tanto con un herbicida inhibidor de HPPD como con glifosato, antes de sembrar la soja, lo que limpia el campo de malas hierbas que son destruidas por el inhibidor de HPPD y/o glifosato, lo que permite prácticas sin labranza, seguido de plantar o sembrar las sojas en el mismo campo pretratado posteriormente (aplicación de quemado usando un herbicida inhibidor de HPPD). La actividad residual de IFT también protegerá a las plantas de soja emergentes y crecientes de la competencia con malas hierbas en los estadios tempranos del crecimiento. Una vez que las plantas de soja tienen un tamaño determinado y las malas hierbas tienden a reaparecer, se puede aplicar un inhibidor de HPPD o una mezcla de un inhibidor de HPPD con un herbicida de soja selectivo (convencional) o una mezcla de un inhibidor de HPPD con un herbicida que no es selectivo en soja (por ejemplo, glifosato o glufosinato) pero para el que las plantas contienen un gen/locus de tolerancia de modo que dichas plantas sean tolerantes a dicho herbicida, como herbicida postaparición sobre la parte superior de las plantas.

En otra realización de la presente invención, un campo en el que se han sembrado semillas que contienen el evento EE-GM5 puede tratarse con un herbicida inhibidor de HPPD, tal como IFT, topamezona o mesotriona, antes de que aparezcan las plantas de soja pero después de que se siembren las semillas (puede hacerse que el campo no tenga malas hierbas antes de sembrar usando otros medios, incluidas prácticas de labranza convencionales tales como arado, escarificación o preparación de lecho de germinación), donde la actividad residual mantendrá el campo exento de malas hierbas destruidas por el herbicida de modo que las plantas de soja emergentes

y crecientes no tengan competición por malas hierbas (aplicación preaparición de un herbicida inhibidor de HPPD). Una vez que las plantas de soja tienen un tamaño determinado y las malas hierbas tienden a reaparecer, se puede aplicar un inhibidor de HPPD, o una mezcla de inhibidor de HPPD-herbicida de soja selectivo (convencional), o una mezcla de un inhibidor de HPPD con un herbicida que no es selectivo en soja (por ejemplo, glifosato o glufosinato) pero para el que las plantas contienen un gen/locus de tolerancia de modo que dichas plantas sean tolerantes a dicho herbicida, como herbicida postaparición sobre la parte superior de las plantas. En una realización de la invención se proporciona un proceso para el control de malas hierbas que comprende sembrar en un campo semillas de soja que contienen EE-GM5 y tratar dicho campo con un herbicida inhibidor de HPPD antes de que las plantas broten de dicha semilla, pero después de sembrarse las semillas.

En otra realización de la presente invención, las plantas que contienen el evento EE-GM5 pueden tratarse con un herbicida inhibidor de HPPD, tal como IFT, topamezona o mesotriona, sobre la parte superior de las plantas de soja que han brotado de las semillas que se han sembrado, lo que limpia el campo de malas hierbas destruidas por el inhibidor de HPPD, cuya aplicación puede ser junto con (por ejemplo, en una mezcla de tanque de pulverización), seguido de o precedido de un tratamiento con un herbicida selectivo postaparición de soja, o un herbicida que no es selectivo en soja (por ejemplo, glifosato o glufosinato) para el que las plantas contienen un gen/locus de tolerancia de modo que dichas plantas sean tolerantes a dicho herbicida, sobre la parte superior de las plantas (aplicación postaparición de un herbicida inhibidor de HPPD (con o sin dicho herbicida selectivo o no selectivo de soja)).

Además, de acuerdo con la presente invención, las plantas de soja que albergan EE-GM5 (que también pueden contener otro evento/rasgo de soja de tolerancia a herbicida como se describe en el presente documento) pueden tratarse con, o las semillas de soja que albergan EE-GM5 pueden recubrirse con, cualquier insecticida, herbicida o fungicida de soja.

Los siguientes ejemplos describen el desarrollo e identificación del evento de élite EE-GM5, el desarrollo de diferentes líneas de soja que comprenden este evento y el desarrollo de herramientas para la identificación específica del evento de élite EE-GM5 en muestras biológicas.

A menos que se indique otra cosa en los ejemplos, todas las técnicas recombinantes se llevan a cabo según protocolos convencionales como se describe en "Sambrook J y Russell DW (eds.) (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª

edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York" y en "Ausubel FA, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA y Struhl K (eds.) (2006) Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Nueva York".

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

Debe entenderse que puede ser necesario ajustar varios parámetros, en cualquier protocolo de laboratorio, tal como los protocolos de PCR en los ejemplos posteriores, a las condiciones específicas de laboratorio y pueden modificarse ligeramente para obtener resultados similares. Por ejemplo, el uso de un método diferente para la preparación de ADN o la selección de otros cebadores en un método de PCR puede dictar otras condiciones óptimas para el protocolo de PCR. Sin embargo, estos ajustes resultarán evidentes para una persona del oficio de nivel medio y están más detallados en manuales de aplicación de PCR actuales.

En la descripción y los ejemplos, se hace referencia a las siguientes secuencias en el listado de secuencias incluido:

SEQ ID NO. 1:	unión 5' EE-GM5
SEQ ID NO. 2:	unión 3' EE-GM5
SEQ ID NO. 3:	unión 5' EE-GM5
SEQ ID NO. 4:	unión 3' EE-GM5
SEQ ID NO. 5:	región 5' EE-GM5
SEQ ID NO. 6:	región 3' EE-GM5
SEQ ID NO. 7:	secuencia codificante de <i>cry14Ab-1.b</i>
SEQ ID NO. 8:	secuencia de aminoácidos de proteína Cry14Ab-1
SEQ ID NO. 9:	secuencia codificante de <i>hppdPf-4Pa</i>
SEQ ID NO. 10:	secuencia de aminoácidos de proteína HPPD-4
SEQ ID NO. 11:	plásmido de transformación pSZ8832 – secuencia entre límites de ADN-T
SEQ ID NO. 12:	cebador PRIM1038
SEQ ID NO. 13:	cebador PRIM1039

SEQ ID NO. 14:	sonda TM1788
SEQ ID NO. 15:	cebador KVM164
SEQ ID NO. 16:	cebador KVM165
SEQ ID NO. 17:	sonda TM1242
SEQ ID NO. 18:	cebador PRIM1041
SEQ ID NO. 19:	cebador PRIM1040
SEQ ID NO. 20:	sonda TM1789
SEQ ID NO. 21:	cebador PRIM1629
SEQ ID NO. 22:	sonda TM2083
SEQ ID NO. 23:	evento de soja EE-GM5
SEQ ID NO. 24:	secuencia de unión 5' EE-GM5
SEQ ID NO. 25:	secuencia de unión 3' EE-GM5
SEQ ID NO. 26:	cebador GLPA210
SEQ ID NO. 27:	cebador GLPA212
SEQ ID NO. 28:	cebador GLPB167
SEQ ID NO. 29:	cebador GLPB170
SEQ ID NO. 30:	cebador PRIM2123
SEQ ID NO. 31:	cebador PRIM2122
SEQ ID NO. 32:	sonda TM2327
SEQ ID NO. 33:	secuencia de locus preinserción

EJEMPLOS

1. Transformación de *Glycine max* con un gen de resistencia a nematodo y un gen de tolerancia de herbicida

1.1. Descripción del ADN-T insertado que comprende los genes quiméricos *cry14Ab-1.b* y *hppdPf-4Pa*

Se desarrolló soja EE-GM5 mediante transformación mediada por *Agrobacterium* usando el vector pSZ8832 que contiene casetes de expresión de *hppdPf-4Pa* y *cry14Ab-1.b*:

(i) El gen *hppdPf-4Pa* mutante que codifica la proteína HPPD-4 (la secuencia de aminoácidos de la cual se muestra en la SEQ ID NO. 10). La secuencia codificante de *hppdPf-4Pa* se desarrolló introduciendo mutaciones puntuales en la posición 335 (sustitución de Glu por Pro), en la posición 336 (sustitución de Gly por Trp), en la posición 339 (sustitución de Lys por Ala) y en la posición 340 (sustitución de Ala por Gln) en un ADN que codifica la proteína HPPD procedente de la cepa de *Pseudomonas fluorescens* A32. La expresión de la proteína HPPD-4 confiere

tolerancia a herbicidas inhibidores de HPPD, tales como isoxaflutol, topramezona o mesotriona.

(ii) El gen *cry14Ab-1.b* codifica la proteína Cry14Ab-1 (la secuencia de aminoácidos del cual se muestra en la SEQ ID NO. 8). La expresión de la proteína Cry14Ab-1 confiere resistencia a nematodos tales como la heterodera de la soja *Heterodera glycines*.

El plásmido pSZ8832 es un vector de transformación de plantas que contiene un gen *cry14Ab-1.b* quimérico y un gen *hppdPf-4Pa* quimérico localizado entre el límite de ADN-T derecho (RB) y el límite de ADN-T izquierdo (LB). Se proporciona una descripción de los elementos genéticos comprendidos en el ADN-T entre el límite de ADN-T derecho y el izquierdo en la Tabla 1 posterior. La secuenciación de confirmación del ADN-T (entre los límites de ADN-T) de este plásmido dio como resultado la secuencia de la SEQ ID NO. 11. La secuencia de nucleótidos de las secuencias codificantes de *cry14Ab-1.b* y *hppdPf-4Pa* (que muestran la cadena codificante) está representada en las SEQ ID NO. 7 y 9, respectivamente.

Tabla 1: Descripción de los elementos genéticos entre los límites de ADN-T en pSZ8832 y las posiciones de nucleótidos en la SEQ ID NO. 11.

Posición en la SEQ ID NO. 11	Orientación	Descripción
1 - 130		Secuencia de poliligador: secuencia usada en clonación
131 - 400	Sentido contrario a las agujas del reloj	secuencia que incluye la región no traducida 3' del transcrito 35S del Virus del mosaico de la coliflor (Sanfaçon <i>et al.</i> , 1991, Genes & development, 5(1), 141-149)
401 - 411		Secuencia de poliligador: secuencia usada en clonación
412 - 3969	Sentido contrario a las agujas del reloj	<i>cry14Ab-1.b</i> : secuencia codificante del gen de delta-endotoxina de <i>Bacillus thuringiensis</i>
3970 - 5276	Sentido contrario a las agujas del reloj	Pubi10At: secuencia que incluye la región promotora del gen de ubiquitina-10 de <i>Arabidopsis thaliana</i> (Grefen <i>et al.</i> , 2010, The Plant journal, 64(2), 355-365)
5277 - 5381		Secuencia de poliligador: secuencia usada en clonación
5382 - 5576	Sentido contrario a las agujas del reloj	secuencia que incluye la región no traducida 3' del transcrito 35S del Virus del mosaico de la coliflor (Sanfaçon <i>et al.</i> , 1991, Genes & development, 5(1), 141-149)
5577 - 5588		Secuencia de poliligador: secuencia usada en clonación
5589 - 6665	Sentido contrario a las agujas del reloj	<i>hppdPf-4Pa</i> : secuencia que codifica una variante 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa procedente de <i>Pseudomonas fluorescens</i>
6666 - 7037	Sentido contrario	TPotpY-1Pf: secuencia codificante de un derivado de

Posición en la SEQ ID NO. 11	Orientación	Descripción
	a las agujas del reloj	péptido de tránsito optimizado (posición 55 cambiada a Tyr), que contiene secuencia de los genes de subunidad pequeña de la RuBisCO de <i>Zea mays</i> y <i>Helianthus annuus</i> (patente de los Estados Unidos 5510471)
7038 - 7058		Secuencia de poliligador: secuencia usada en clonación
7059 - 7185	Sentido contrario a las agujas del reloj	secuencia que incluye la secuencia líder del ARN genómico del virus del grabado del tabaco (Allison <i>et al.</i> , 1985, Virology, 147(2), 309-316)
7186 - 7191		Secuencia de poliligador: secuencia usada en clonación
7192 - 7941	Sentido contrario a las agujas del reloj	secuencia que incluye la región promotora potenciada doble del transcrito genómico del Virus del mosaico de la coliflor 35S (Kay <i>et al.</i> , 1987, Science, 236(4806), 1299-1302)
7942 - 8068		Secuencia de poliligador: secuencia usada en clonación

1.2. Evento EE-GM5

El vector de ADN-T pSZ8832 se introdujo en *Agrobacterium tumefaciens* y se seleccionaron plantas de soja transformadas (var. Thorne) usando tolerancia al inhibidor de HPPD según métodos conocidos en la técnica. Luego, las plantas supervivientes se autopolinizaron para generar semilla T1. Se produjeron generaciones posteriores mediante autopolinización o mediante cruce en otro germoplasma de soja.

1.2.1 Identificación del evento de élite EE-GM5

El evento de élite EE-GM5 se seleccionó en base a un procedimiento de selección exhaustivo (basado en parámetros que incluyen, pero sin limitación, la eficacia de rasgos en el invernadero y el campo, características moleculares y características agrónomas) de una amplia serie de diferentes eventos de transformación obtenidos usando los mismos genes quiméricos. Se descubrió que las plantas de soja que contenían EE-GM5 tenían una inserción de los transgenes en un único locus en el genoma de planta de soja, tenían agronomía general similar a las plantas parentales usadas para transformación, no provocaban penalización en el rendimiento por la inserción del ADN transformante (en comparación con una línea isogénica correspondiente sin el evento, tal como una línea de planta "nula" obtenida de una planta transformada en la que los transgenes se segregaron), daban como resultado una reducción significativa de hembras adultas que infestan las raíces en un ensayo de invernadero de SCN convencional y tenían rendimiento mejorado con presión por nematodos de SCN en el campo en comparación con la línea nula

isogénica que no contiene EE-GM5. Adicionalmente, la tolerancia a la aplicación de herbicida inhibidor de HPPD se midió en ensayos de campo, pero la tolerancia a herbicida no fue un criterio de selección para la selección del evento de élite.

1.2.1.1 Análisis molecular del evento

Los resultados de la transferencia Southern mostraron que EE-GM5 contiene un único locus transgénico que contiene una única copia del gen *cry14Ab-1.b* quimérico y una única copia del gen *hppdPf-4Pa* quimérico. EE-GM5 carece de una parte del promotor de 35S del gen *hppdPf-4Pa* quimérico (lo que indica que no se insertó el ADN-T completo de la SEQ ID NO. 11 en el genoma de soja durante la transformación). No se obtuvo ningún fragmento de PCR tras el análisis de PCR usando cebadores que se dirigen a secuencias de cadena principal del vector que flanquean el límite izquierdo y derecho del ADN-T así como la secuencia de *aadA*. Además, la presencia de fragmentos de integración de EE-GM5 idénticos en múltiples generaciones de EE-GM5 demuestra la estabilidad estructural del evento.

1.2.1.2 Herencia del evento

La herencia del inserto de ADN-T insertado en generaciones posteriores ensayando el genotipo de genes *hppdPf-4Pa* y *cry14Ab-1.b* mediante análisis por PCR muestra que los genes *hppdPf-4Pa* y *cry14Ab-1.b* contenidos en el inserto de EE-GM5 se heredan de una manera predecible y como se espera para una única inserción. Estos datos son coherentes con principios mendelianos y apoyan la conclusión de que el evento EE-GM5 consiste en un único inserto integrado en un único locus cromosómico en el genoma nuclear de soja.

Además, el análisis de los patrones de segregación de EE-GM5 en generaciones posteriores tras introgresión de EE-GM5 en 5 líneas de soja de élite confirmó la segregación mendeliana normal. La tabla 2 muestra la segregación observada de EE-GM5 en poblaciones de segregación diferentes.

Tabla 2. Análisis de segregación de EE-GM5

Parental	Generación	Observado				Estadística		
		HH	Hemi	nulo	Total	Chi-cuadrado	Valor de P	signo
Parental 1	BC2F2	481	903	497	1881	3,26	0,20	ns
Parental 1	BC3F2	108	200	102	410	0,42	0,81	ns
Parental 2	BC2F2	45	101	50	196	0,44	0,80	ns
Parental 2	BC3F2	16	37	25	78	2,28	0,32	ns
Parental 3	BC2F2	57	127	57	241	0,70	0,70	ns
Parental 3	BC3F2	12	39	27	78	5,77	0,06	ns
Parental 4	F2	174	397	197	768	2,26	0,32	ns
Parental 5	BC2F2	72	132	89	293	4,84	0,09	ns

En la tabla 2, "HH" significa plantas homocigotas, "Hemi", plantas hemicigotas y

"nulo", segregantes nulos que tienen EE-GM5 perdido y "ns" significa estadísticamente significativo (con respecto a cualquier variación de segregación normal/esperada). En estos ensayos, el parental 1 fue una línea MG VI con resistencia a SCN nativa de *Rhg1* y *Rhg4*, el parental 2 fue una línea MG VI susceptible a SCN, el parental 3 fue una línea MG IX susceptible a SCN, el parental 4 fue una línea MG III con resistencia a SCN nativa de *Rhg1* y el parental 5 fue una línea MG I susceptible a SCN.

1.2.1.3 Estabilidad de expresión de proteínas

Los niveles de expresión de proteínas HPPD-4 y Cry14Ab-1 en plantas cultivadas en invernadero se determinaron mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de tipo sándwich en muestras de hoja, raíz y semilla recogidas de diferentes generaciones (por ejemplo, T4, T6 y BC2F3) de soja EE-GM5. HPPD-4 y Cry14Ab-1 muestran niveles de expresión medios similares en hoja, raíz y semilla entre todas las generaciones ensayadas. Cualquier diferencia observada en concentraciones de Cry14Ab-1 y HPPD-4 se atribuyó a la variabilidad natural entre plantas.

1.2.1.4 Rendimiento agrónomo y tolerancia a herbicidas inhibidores de HPPD

En ensayos de equivalencia agrónoma, se compararon plantas que comprendían EE-GM5 en el fondo de transformación original (Thorne) con nulos segregantes (que carecen de EE-GM5) y con plantas Thorne de tipo silvestre cuando se cultivan en ausencia de SCN. Las parcelas no se trataron con herbicidas de HPPD pero se mantuvieron sin malas hierbas mediante el uso de herbicidas convencionales y escarda manual cuando fue necesario. No se observó ninguna diferencia que influya en el rendimiento agrónomo de una manera biológicamente significativa entre las plantas que contienen el evento y los nulos segregantes (que carecen de EE-GM5) cuando se cultivan en ensayos comparables en diferentes localizaciones cuando se comprueban para determinar características cualitativas de plantas tales como color de la flor, color de la vaina, color de la semilla y pubescencia y para determinar características cuantitativas como rendimiento, altura, encamado, posición y días hasta su madurez. Por tanto, las plantas que comprendían EE-GM5 mostraron características agrónomas normales comparables con las plantas no transgénicas correspondientes.

Se realizaron ensayos adicionales con EE-GM5 en el fondo de transformación de Thorne original en 2017. También se establecieron ensayos preliminares en donde EE-GM5 estaba en fondos genéticos de MG1 y MG3 de élite en un número limitado de localizaciones en 2017. Cuando se comprueban características cualitativas de plantas

tales como el color de la flor, el color de la vaina, el color de la semilla y la pubescencia y para determinar características como el rendimiento, la altura, el encamado, la posición, el peso en el ensayo y días hasta la madurez, no se detectaron diferencias uniformes y significativas entre el evento EE-GM5 y los nulos segregantes (que carecen de EE-GM5) en ninguno de los tres acervos genéticos, lo que confirma que las plantas que comprenden EE-GM5 mostraron características agrónomas normales.

La tolerancia de plantas que comprenden EE-GM5 a herbicidas inhibidores de HPPD se ensayó en diferentes localizaciones en el campo durante 2 años. En estos ensayos, se descubrió que las plantas con EE-GM5 tuvieron tolerancia comercialmente relevante a isoxaflutol (IFT) cuando se aplicó preaparición así como cuando se aplicó postaparición, pero el daño a los cultivos fue un poco mayor para la aplicación preaparición de IFT. Estos ensayos también mostraron que las plantas que contenían el evento EE-GM5 tenían tolerancia comercialmente relevante a mesotriona (MST) cuando se aplica preaparición o cuando se aplica postaparición. Todos los tratamientos postaparición estaban en el estadio V2-V3, con los adyuvantes concentrado de aceite de cultivo y sulfato de amonio añadidos para aumentar la actividad herbicida.

La Fig. 5 muestra el promedio de los datos de fitotoxicidad máxima (daño vegetal) registrados para el tratamiento con herbicidas en varios ensayos de campo durante 2 años, para plantas de soja que contienen el evento EE-GM5 en comparación con plantas de soja no transformadas/convencionales. Las plantas de Thorne sin transformar de control mostraron valores de fitotoxicidad máxima promedios de aproximadamente 80 a 90 % en estos mismos ensayos, lo que muestra que estos herbicidas inhibidores de HPPD no son tolerados por soja (no GM). La "fitotoxicidad máxima" como se usa en el presente documento es la mayor clasificación de fitotoxicidad registrada en cualquier observación durante el transcurso de un ensayo (con 3 a 4 observaciones por ensayo). En aplicaciones de control de malas hierbas existentes, una dosis normal (1x) para isoxaflutol (IFT) en aplicación pre o postaparición y para MST en aplicación postaparición es 105 g/ha, y una dosis normal (1x) para mesotriona en aplicación preaparición es 210 g/ha. Por tanto, en estos ensayos presentados en la Fig. 5, las aplicaciones usadas en preaparición en la Fig. 5 (420 g/ha para IFT, 840 g/ha para mesotriona) fueron a 4 veces la dosis normal y en postaparición (210 g/ha para cada uno de IFT y mesotriona) fueron a 2 veces la dosis normal.

de Thorne. Además, los ensayos de SCN convencionales que medían el índice femenino en el invernadero también mostraron que las plantas de soja que contenían el evento EE-GM5 y la resistencia a SCN nativa mostraban una reducción significativa de quistes de SCN en raíces en comparación con líneas de soja de élite resistentes a SCN sin EE-GM5. Cuando se realizó introgresión de EE-GM5 en una línea de soja de élite con resistencia de soja PI88788 (grupo de madurez 3) o en una línea de soja de élite con resistencia de soja Peking (grupo de madurez 6.2), uniformemente se vio un número reducido de quistes de SCN en las raíces en comparación con raíces con resistencia nativa solamente.

En ensayos de campo durante 2 años en varias localizaciones, las plantas de soja que contenían EE-GM5 proporcionaron un aumento del rendimiento significativo en comparación con los segregantes nulos isogénicos en campos infestados por SCN. La Figura 6 muestra el rendimiento de grano de EE-GM5 en el fondo de transformante original (Thorne) como se ensayó en 9 localizaciones diferentes a lo largo de Iowa, Illinois, Indiana, Misuri y Tennessee en 2015 y 2016, en campos infestados por SCN (que varían de baja a alta infestación por SCN). Se realizaron ensayos adicionales con EE-GM5 en el fondo de transformante original (Thorne) en 2017 en un total de 12 localizaciones con presión de SCN diversa. A lo largo de estos 12 ensayos, las plantas que contenían EE-GM5 produjeron rendimientos en promedio 10 % mayores que los segregantes nulos que carecían de EE-GM5 ($p=0,003$). La Fig. 7 muestra el rendimiento de grano de EE-GM5 cuando se realizó introgresión (BC2F3) en una línea de MG I (grupo de madurez I) de élite que es susceptible a SCN y se ensayó en una localización en Minesota y una localización en Dakota del Norte en 2016 (cada una con alto nivel de infestación por SCN). Se ensayó la misma línea de MG I en las mismas dos localizaciones (cada una de nuevo con alta infestación de SCN) y en un sitio adicional en Wisconsin en 2017 (este último tiene presión de SCN moderada), y el rendimiento de grano de plantas que contenía EE-GM5 fue uniformemente mayor que los segregantes nulos correspondientes que carecen de EE-GM5. Finalmente, los estudios preliminares entre tres localizaciones con presión de SCN de moderada a alta en Brasil en ensayos plantados tardíos en 2017 mostraron un aumento promedio significativo de 31 % ($p=0,01$) en una línea susceptible de élite para plantas con EE-GM5 en comparación con el nulo segregante (que carece de EE-GM5). Debido a la fecha de plantado tardía, los rendimientos generales en estos ensayos de Brasil preliminares tendieron a ser bajos y la variabilidad en un ensayo fue más bien alta, lo que puede haber influido en la magnitud del aumento de rendimiento, pero se

descubrió un aumento del rendimiento claramente significativo y visualmente observable para plantas con EE-GM5. Por tanto, el evento EE-GM5 confiere un aumento de rendimiento significativo en plantas de soja en campos infestados por SCN.

En un estudio para evaluar el efecto del evento EE-GM5 en el rendimiento cuando se combina con resistencia a SCN nativa, se desarrolló una serie de poblaciones F3 a partir del cruce individual de EE-GM5 con una línea convencional MG III de élite que porta el gen de resistencia de rhg1 de PI88788. En las poblaciones F3 una población 'apilada' que es homocigota tanto para el evento EE-GM5 como para el alelo rhg1, se comparó con una población homocigota para solamente el alelo rhg1 (que carece de EE-GM5). Los ensayos de rendimiento se establecieron con estas poblaciones en 2016 en tres localizaciones con infestación de moderada a alta de SCN y en 2017 en siete localizaciones que varían de presión de SCN de baja a alta. Los resultados se muestran en la Figura 8. Todos los ensayos de 2017 incluyeron tres tratamientos de semillas diferentes. No se observó ninguna diferencia de rendimiento o interacciones significativas para ninguno de estos tratamientos de semillas solo, de modo que se agruparon datos entre tratamientos de semillas para proporcionar las mejores estimaciones estadísticas de la diferencia de rendimiento entre el evento homocigoto (HH) y el segregante nulo. Como se muestra en la Fig. 8, a lo largo de las tres localizaciones en 2016, la población 'apilada' (plantas homocigotas para el evento EE-GM5 y el alelo rhg1) produjo rendimientos 8 % mayores que la población que portaba solamente el alelo rhg1 ($p=0,08$), y los ensayos de 2017 proporcionaron un aumento del rendimiento promedio de 11 % para plantas homocigotas para el evento EE-GM5 y el alelo rhg1 ($p=1,24-11$), en comparación con la población que portaba solamente el alelo rhg1. Como referencia, el aumento de rendimiento promedio para líneas que contienen EE-GM5 a lo largo de los ensayos de 2017 solamente con el tratamiento de semillas básico (Evergol® Energy + fungicida Allegiance® + insecticida Poncho®) fue de 0,27 T/ha (aumento del rendimiento de 10,2 %; $p = 0,0002$). El tratamiento de semillas básico usado en todos los ensayos de 2016 fue Evergol® Energy + fungicida Allegiance®. Como se muestra en la Figura 8, se descubrió una relación estrecha entre los 10 ensayos en ambos años entre la respuesta de rendimiento y la presión de SCN observándose mayores aumentos de rendimiento en sitios con alta presión de SCN (hacia la parte superior en la Fig. 8). Estos resultados muestran que la adición del evento EE-GM5 a variedades de soja con resistencia a SCN convencional pueden proporcionar un aumento de rendimiento significativo en

campos infestados por SCN.

La realización de ensayos de rendimiento con infestación de SCN de moderada a alta es difícil debido a muchos factores que tienen una influencia en los resultados. Las densidades de población de SCN en campos pueden variar sustancialmente y, de este modo, la influencia general de SCN en el rendimiento también puede variar de una parcela a la siguiente (véase, por ejemplo, www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/review/2009/sce08/). Tipos de suelo favorables, buena fertilidad y lluvias adecuadas pueden mitigar la influencia de la infestación por SCN en la planta de soja y pueden minimizar las influencias en el rendimiento incluso con poblaciones de SCN altas. Muchos campos con poblaciones de SCN muy altas tienden a tener suelos pobres y por tanto menor potencial de rendimiento, lo que hace difícil discernir influencias estadísticamente significativas en el rendimiento. Por tanto, los datos de rendimiento de ensayos de campo de SCN pueden ser bastante variables y no se esperaría ver mejoras significativas en el rendimiento en cada ensayo con poblaciones de SCN altas. Las tendencias generales entre ensayos son los criterios más relevantes para valorar el rendimiento de un evento.

Se establecieron ensayos de campo de SCN que se realizaron con plantas que contenían EE-GM5 en campo con infestación de SCN natural. Las unidades experimentales consistieron en una parcela de campo que contenía de 2 a 4 filas separadas a 0,76 m de distancia y que variaba de 3,8 a 9,1 m de longitud. El número de filas por parcela y la longitud de las parcelas variaron de una localización a otra en base al tamaño del campo y las configuraciones de equipamiento. Se sembraron parcelas a 26 semillas por metro y, por tanto, cada unidad experimental contenía entre 200 y 960 semillas. Las parcelas se seleccionaron aleatoriamente en el campo usando un diseño de parcelas subdivididas o parcelas divididas y subdivididas. Los diseños de parcelas subdivididas están bien adaptados para ayudar a minimizar el efecto de la alta variabilidad en el tipo de suelo o poblaciones de SCN que es habitual en campos infestados por SCN. En ensayos de campo de SCN se plantaron plantas que comprendían EE-GM5 en una subparcela junto a, o muy cerca de, una subparcela acompañante que contenía plantas nulas segregantes (sin EE-GM5). La proximidad estrecha de las dos parcelas ayuda a minimizar el efecto de la variabilidad de campo (de SCN) en la estimación de la diferencia entre las plantas con y sin el evento EE-GM5. La mayoría de los ensayos se repitieron cuatro veces, pero algunos se repitieron tres veces y algunos se repitieron cinco o seis veces.

Se observaron infestaciones de moderadas a graves de síndrome de muerte súbita en dos localizaciones (Indiana e Iowa) en 2016. Las parcelas en estas dos localizaciones se clasificaron según la incidencia y gravedad de los síntomas de SDS y el índice de enfermedad de SDS (DX) se calculó usando el "método SIUC de puntuación de SDS" (www.scnresearch.info/462.pdf). Las clasificaciones de DX en plantas homocigotas para EE-GM5 fueron 61 % menores en Indiana y 55 % menores en Iowa que en el segregado nulo susceptible (que carece de EE-GM5), lo que indica que el evento proporcionaba protección contra infección por SDS. SDS y SCN se asocian con frecuencia estrechamente en el campo y mostrarán algunas interacciones en la planta (véase, por ejemplo, www.soybeanresearchinfo.com/pdf_docs/sdsupdate.pdf y www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/pages/suddendeath.aspx).

En 2017, se reunieron puntuaciones de clorosis por deficiencia en hierro (IDC) en plantas con EE-GM5 (y sus segregantes nulos) en una localización de ensayo en los Estados Unidos (con alta infestación de SCN) donde se observaron síntomas de IDC. El ensayo fue un diseño de parcelas subdivididas que contempla el efecto de evento en tres fondos diferentes. Las clasificaciones de IDC se tomaron como se ha descrito en Cianzio *et al.* (1979) Crop Science 19: 644-646. La Fig. 11 muestra los promedios de puntuaciones de IDC para plantas con el evento EE-GM5 y las correspondientes para los segregantes nulos correspondientes (que carecen de EE-GM5) entre tres fondos genéticos (1 resistente a SCN (resistencia a PI88788), 1 susceptible a SCN y el fondo de Thorne susceptible a SCN). Se descubrieron puntuaciones de IDC significativamente menores para plantas que contenían EE-GM5 en comparación con sus segregantes nulos. Por tanto, EE-GM5 redujo significativamente la gravedad foliar de IDC en un ensayo de campo donde las plantas de soja se expusieron tanto a SCN como a IDC. Esta reducción se produjo entre tres líneas de soja, una de las cuales incluía resistencia a SCN nativa de tipo PI 88788.

Además, se hicieron germinar semillas de Thorne no transformadas y EE-GM5 y se plantaron en invernadero para comprobar el control del nematodo de las praderas, *Pratylenchus brachyurus*. Se aplicaron nematodos *Pratylenchus brachyurus* (# 1500/planta, diferentes estadios del desarrollo) a las plantas cuando tenían 2 semanas de edad. 30 días después de la aplicación, se extrajeron nematodos *Pratylenchus* de las raíces y se contaron. El número promedio de nematodos hallado en las raíces de plantas que contenían EE-GM5 se comparó con el número promedio

de nematodos *Pratylenchus* hallados en las raíces de plantas de Thorne de tipo silvestre. Se descubrió en promedio de 80 a 90 % menos nematodos *Pratylenchus* en raíces de plantas que contenían EE-GM5 en comparación con las raíces de control de Thorne, lo que indica control significativo de nematodos de las praderas por el evento de soja EE-GM5.

La Figura 9 muestra resultados de un ensayo de invernadero de *Pratylenchus brachyurus* en los Estados Unidos, que compara líneas de élite con EE-GM5 en 5 líneas de soja de élite (una susceptible a SCN (MG 1), una resistente a SCN (PI88788, MG 3), una susceptible a SCN (MG 6.2), una resistente a SCN (Peking, MG 6.2) y una susceptible a SCN (MG 9)) con líneas de soja de los Estados Unidos susceptibles a SCN y resistente a SCN. Las plantas de soja se cultivaron en macetas cónicas pequeñas y se mantuvieron en invernaderos con una temperatura que varió entre 25 y 32 °C. Se usaron nematodos *Pratylenchus brachyurus*, obtenidos de Carolina del Sur y aumentados en el invernadero para inocular plantas en el estadio del desarrollo V2-V3. Se inocularon aproximadamente 1500 huevos + adultos por planta y cada entrada tuvo 5 plantas. 30 días después de la infestación, se extrajeron nematodos y huevos de las raíces y se contaron. Cada entrada se procesó en dos experimentos independientes. Aunque las líneas de soja de los Estados Unidos susceptibles a SCN y resistentes a SCN no mostraron control de *Pratylenchus*, las plantas con EE-GM5 mostraron aproximadamente 90 % de control de *Pratylenchus*.

La Figura 10 muestra resultados de un ensayo de invernadero de *Pratylenchus brachyurus* en Brasil, que compara plantas de soja con EE-GM5 con líneas de soja de Brasil sin resistencia y 1 línea de Rf bajo y plantas susceptibles y resistentes a SCN. Las líneas de soja se cultivaron en macetas cónicas pequeñas y se mantuvieron en invernaderos con una temperatura que varió entre 25 y 32 °C. Se usaron nematodos *Pratylenchus brachyurus*, obtenidos de campos de Brasil y aumentados en el invernadero para inocular plantas en el estadio del desarrollo V2-V3. Se inocularon aproximadamente 1000 huevos + adultos por planta y cada entrada tuvo 5 plantas. 30 días después de la infestación, se extrajeron nematodos y huevos de las raíces y se contaron. Los resultados mostrados son de un único experimento. Una línea de soja brasileña (BRS 7380), marcada como poseedora de un factor reproductivo bajo para *Pratylenchus* mostró aproximadamente 89 % de reducción de *Pratylenchus*. Las plantas con EE-GM5 proporcionaron ~99 % de control de *Pratylenchus*. Las líneas de soja que portan resistencia nativa a SCN (rhg1 + rhg4) no controlan *Pratylenchus brachyurus*.

Además, pueden usarse plantas que contienen EE-GM5 para controlar nematodos de los nudos de la raíz (RKN) tales como *Meloidogyne incognita*. Incluso aunque la población de *Meloidogyne incognita* no infesta soja de tipo silvestre Thorne muy bien, las plantas Thorne con EE-GM5 muestran una reducción adicional en el número de huevos de RKN/masa de la raíz en promedio, en comparación con plantas Thorne sin transformar.

1.2.2 Identificación de las regiones flanqueantes y ADN-T insertado del evento de élite EE-GM5

La secuencia de las regiones que flanquean el ADN-T insertado y el ADN-T contiguo con el mismo como está contenido en el evento de élite EE-GM5 se muestran en el listado de secuencias adjunto.

1.2.2.1 Región flanqueante de ADN-T 5'

Se secuenció un fragmento identificado por comprender la región flanqueante de ADN-T 5' de EE-GM5 y su secuencia de nucleótidos está representada en la SEQ ID NO. 5, nucleótidos 1-166. Esta región flanqueante de ADN-T 5' está compuesta por secuencias genómicas de soja correspondientes a la secuencia de locus preinserción (SEQ ID NO. 5, nucleótidos 1-166). La región de unión 5' que comprende parte de la secuencia de ADN-T insertada y parte de la secuencia flanqueante de ADN-T 5' contigua con la misma está representada en las SEQ ID NO. 1 y 3.

1.2.2.2 Región flanqueante de ADN-T 3'

Se secuenció un fragmento identificado por comprender la región flanqueante de ADN-T 3' de EE-GM5 y su secuencia de nucleótidos está representada en la SEQ ID NO. 6, nucleótidos 359-691. Esta región flanqueante de ADN-T 3' está compuesta de una secuencia de ADN de carga de 39 nucleótidos (de la posición 359 a la posición 397 en la SEQ ID NO. 6), seguido de secuencias genómicas de soja correspondientes a la secuencia de locus preinserción (de la posición 398 a la posición 691 en la SEQ ID NO. 6). La región de unión 3' que comprende parte de la secuencia de ADN-T insertada y parte de la secuencia flanqueante de ADN-T 3' contigua con la misma está representada en las SEQ ID NO. 2 y 4.

1.2.2.3 ADN-T insertado de EE-GM5

El ADN-T insertado contiguo con la secuencia flanqueante de ADN-T 5' anterior se secuenció y su secuencia de nucleótidos está representada en la SEQ ID NO. 5, nucleótidos 167-353. Además, el ADN-T insertado contiguo con la secuencia flanqueante de ADN-T 3' se secuenció y su secuencia de nucleótidos está representada en la SEQ ID NO. 6, nucleótidos 1-358. Durante la transformación, se

suprimieron 63 pb de ADN genómico en la secuencia de locus preinserción y estos se reemplazaron por el ADN insertado (compuesto de ADN-T y una parte pequeña de ADN de carga).

La secuenciación de la región de ADN-T en el plásmido de transformación pSZ8832 (la parte entre los límites de ADN-T) dio como resultado la secuencia indicada en la SEQ ID NO. 11. La secuencia del gen *cry14Ab-1.b* quimérico (que comprende el promotor de Ubi10 y la región no traducida 3' de 35S) está representada en la SEQ ID NO. 11 de los nucleótidos 131-5276 (sentido contrario a las agujas del reloj). La secuencia de ADN-T insertada en la región flanqueante 5' en la SEQ ID NO. 5 (nucleótido 167-353) es idéntica a la secuencia de nucleótidos en la SEQ ID NO. 11 del nucleótido 1 al nucleótido 187 y la secuencia de ADN-T insertada en la región flanqueante 3' en la SEQ ID NO. 6 (nucleótido 1-358) es idéntica a la secuencia de nucleótidos en la SEQ ID NO. 11 del nucleótido 7102 al nucleótido 7459. Por tanto, el extremo 5' del ADN-T insertado en EE-GM5 corresponde al nucleótido 1 en la secuencia del plásmido de transformación de la SEQ ID NO. 11 y el extremo 3' del ADN-T insertado en EE-GM5 corresponde al nucleótido 7459 en la secuencia del plásmido de transformación de la SEQ ID NO. 11. El ADN-T insertado en EE-GM5 entre la secuencia de la SEQ ID NO. 5 y la secuencia de la SEQ ID NO. 6 está contenido en la semilla depositada en la ATCC con el número de referencia PTA-123625 y tiene una secuencia esencialmente similar o idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO. 11 del nucleótido 188 al nucleótido 7101.

El locus de inserción para el evento EE-GM5 puede determinarse a partir de la variante de soja de tipo silvestre Thorne en base a las secuencias flanqueantes de ADN-T 5' y 3' proporcionadas en el presente documento (SEQ ID NO. 5 del nt 1 al nt 166 y la SEQ ID NO. 6 del nt 359 al nt 691) por métodos conocidos en la técnica. La secuencia del locus preinserción en el genoma de soja corresponde a las siguientes secuencias en orden: posición de nucleótido 1 a posición de nucleótido 166 en la SEQ ID NO. 5, una supresión de 63 nt y posición de nucleótido 398 a posición de nucleótido 691 en la SEQ ID NO. 6. La secuencia del locus preinserción completa se proporciona en la SEQ ID NO. 33, en donde nt 1-1000 son secuencias genómicas flanqueantes 5', nt 1001-1063 son la supresión del sitio diana y 1064-2063 son secuencias genómicas flanqueantes 3'.

1.2.3 Confirmación de las regiones flanqueantes y ADN-T insertado del evento de élite EE-GM5

La amplificación por PCR usando cebadores dirigidos al ADN de planta cadena

arriba y cadena abajo del ADN-T insertado y al ADN-T insertado en EE-GM5 confirmó y extendió las secuencias flanqueantes 5' y 3' de EE-GM5.

1.2.3.1. Reacción específica de EE-GM5 de secuencia de unión 5'

Se diseñaron dos cebadores, GLPA210 y GLPB167, para amplificar un amplicón de aproximadamente 5118 pb que abarcan la región de unión de la secuencia flanqueante de ADN-T 5' con el fragmento de inserción de ADN-T para el evento EE-GM5. La secuencia del cebador GLPA210 se origina de la secuencia de referencia de soja de *Glycine max* Williams 82.a2.v1.

Cebador directo dirigido a la secuencia flanqueante 5' de ADN-T de EE-GM5:

GLPA210 5'- CTCTCACCCAgATTTCAC -3' (SEQ ID NO. 26)

Cebador inverso dirigido a la secuencia de ADN-T insertada en EE-GM5:

GLPB167 5'- TACAACgTgCTCgCTATTCC -3' (SEQ ID NO. 28)

Composición de la mezcla de reacción para la reacción de secuencia de unión 5':

5	µl	de tampón <i>Expand</i> TM (Roche)
1	µl	de dNTP (10 mM)
2	µl	de cebador directo (10 pmol/µl)
2	µl	de cebador inverso (10 pmol/µl)
0,75	µl	de mezcla de enzimas de alta fidelidad <i>Expand</i> TM (3,5 U/µL; Roche)
50	ng	de ADN molde
Agua hasta 50 µl		

Condiciones de termociclación para la reacción de secuencia de unión 5':

	Tiempo		Temperatura
	4	min.	94 °C
Seguido de:	1	min.	94 °C
	1	min.	55 °C
	4	min.	68 °C
	Durante 5 ciclos		
Seguido de:	15	s	94 °C
	45	s	60 °C
	4	min. + 5 s/ciclo	68 °C
	Durante 25 ciclos		
Seguido de:	10	min.	68 °C
Seguido de:	10	min.	4 °C

Mantenido 10 °C

La secuencia de la secuencia flanqueante de ADN-T 5' que se obtuvo y que es contigua con y cadena arriba de parte del ADN-T insertado como se muestra en la SEQ ID NO. 5 se muestra en la SEQ ID NO. 24.

1.2.3.2. Reacción específica de EE-GM5 de secuencia de unión 3'

Se diseñaron dos cebadores, GLPB170 y GLPA212, para amplificar un amplicón de aproximadamente 4982 pb que abarcan la región del fragmento de inserción de ADN-T para el evento EE-GM5 con la secuencia flanqueante de ADN-T 3'. La secuencia del cebador GLPA212 se origina de la secuencia de referencia de *Glycine max* Williams 82.a2.v1.

Cebador directo dirigido a la secuencia de ADN-T insertada en EE-GM5:

GLPB170 5'- TCTCggTATCAgCgTTCTTg -3' (SEQ ID NO. 29)

Cebador inverso dirigido a la secuencia flanqueante 3' de ADN-T de EE-GM5:

GLPA212 5'- CCCATgCggTATTATgTg -3' (SEQ ID NO. 27)

Composición de la mezcla de reacción para la reacción de secuencia de unión 3':

5	µl	de tampón <i>Expand</i> TM (Roche)
1	µl	de dNTP (10 mM)
2	µl	de cebador directo (10 pmol/µl)
2	µl	de cebador inverso (10 pmol/µl)
0,75	µl	de mezcla de enzimas de alta fidelidad <i>Expand</i> TM (3,5 U/µL; Roche)
50	ng	de ADN molde
Agua hasta 50 µl		

Condiciones de termociclación para la reacción de secuencia de unión 3':

	Tiempo	Temperatura
	4 min.	94 °C
Seguido de:	1 min.	94 °C
	1 min.	54,3 °C
	4 min.	68 °C
	Durante 5 ciclos	
Seguido de:	15 s	94 °C
	45 s	60 °C
	4 min. + 5 s/ciclo	68 °C
	Durante 25 ciclos	

Seguido de:	10 min.	68 °C
Seguido de:	10 min.	4 °C
	Mantenido	10 °C

La secuencia de la secuencia flanqueante de ADN-T 3' que se obtuvo y es contigua con y cadena abajo de parte del ADN-T insertado como se muestra en la SEQ ID NO. 6 se muestra en la SEQ ID NO. 25.

Ya que los amplicones resultantes en las 2 reacciones anteriores se solapaban, esto permitió una reconstrucción de la secuencia del ADN-T insertado en EE-GM5 y las secuencias flanqueantes 5' y 3', que se muestra en la SEQ ID NO. 23. La secuencia flanqueante de ADN-T 5' en la SEQ ID NO. 23 es de la posición de nucleótido 1 a la posición de nucleótido 1113 (correspondiente a secuencias genómicas de locus preinserción), la secuencia de ADN-T insertada es de la posición de nucleótido 1114 a la posición de nucleótido 8572 y la secuencia flanqueante de ADN-T 3' en la SEQ ID NO. 23 es de la posición de nucleótido 8573 a la posición de nucleótido 9663 (correspondiente a ADN de carga de 39 nt (nt 8573-8611 en la SEQ ID NO. 23) secuencias genómicas de locus preinserción (nt 8612-9663 en la SEQ ID NO. 23)).

2. Desarrollo de protocolos de identificación para EE-GM5

2.1. Método de puntos finales para el análisis de la identidad de EE-GM5

Este método describe un método de detección por reacción en cadena de la polimerasa para analizar la presencia de secuencias de ADN específicas del evento EE-GM5 en muestras de ADN obtenidas de muestras biológicas, tales como materiales de planta (por ejemplo, hoja o semilla) usando procedimientos de extracción de ADN convencionales.

La descripción del método destaca el diseño del método, que incluye las secuencias de cebadores y sondas oligonucleotídicos, la composición de la mezcla de reacción, las condiciones de termociclación necesarias para realizar la reacción y los ajustes de lectura fluorescente que se ha descubierto son apropiados para la detección de amplicón. También proporciona recomendaciones generales acerca de la naturaleza y el uso de muestras de control. Además, se proporciona orientación para el análisis e interpretación de datos, que incluye un ejemplo de un resultado del método teniendo en cuenta las recomendaciones acerca del uso de materiales de control y la orientación para el análisis de datos.

2.1.1. Diseño del método

El método usa la química de Taqman para amplificar y detectar dos secuencias diana: una reacción específica de EE-GM5 determina la presencia del evento, una reacción específica de taxón valida los resultados negativos para la reacción específica de evento.

2.1.1.1. Reacción específica de EE-GM5

Se diseñaron dos cebadores, PRIM1038 y PRIM1039, para amplificar un amplicón de 85 pb que abarcan la región de unión de la secuencia flanqueante 3' con el fragmento de inserción de ADN-T para el evento EE-GM5.

Se diseñó una sonda, TM1788 usando FAM como marcador fluorescente y BHQ1 como interruptor para detectar la secuencia amplificada.

Cebador directo dirigido a la secuencia de ADN-T de EE-GM5:

PRIM1038 5'- gAgCCACCTTCCTTTTCCACTA -3' (SEQ ID NO. 12)

Cebador inverso dirigido a la secuencia flanqueante 3' de ADN-T de EE-GM5:

PRIM1039 5'- ATAgggTtACTgCTTCgTAAAATAAgCA -3' (SEQ ID NO. 13)

Sonda dirigida a la unión del ADN-T de EE-GM5 y su secuencia flanqueante 3':

TM1788 FAM 5'- CgCgTCCATgATgCTgCgACTATg -3' BHQ1 (SEQ ID NO. 14)

2.1.1.2. Reacción específica de taxón

Se diseñaron dos cebadores, KVM164 y KVM165, para amplificar un amplicón de 102 pb de la secuencia génica de lectina 1 endógena de soja.

Se diseñó una sonda, TM1242, JOE FAM como marcador fluorescente y BHQ1 como se diseñó para detectar la secuencia amplificada

Cebador directo dirigido a la secuencia génica de Lectina 1 endógena:

KVM164 5'- CTTTCTCgCACCAATTgACA -3' (SEQ ID NO. 15)

Cebador inverso dirigido a la secuencia génica de Lectina 1 endógena:

KVM165 5'- TCAAACCTCAACAgCgACgAC -3' (SEQ ID NO. 16)

Sonda dirigida a la secuencia génica de Lectina 1 endógena:

TM1242 JOE 5'- CCACAAACACATgCAggTTATCTTgg -3' BHQ1 (SEQ ID NO. 17)

2.1.2. Composición de la mezcla de reacción

5,0	µl	de 2x PerfeCta qPCR FastMix II, ROX
0,2	µl	de PRIM1038 [10 pmol/µl]
0,2	µl	de PRIM1039 [10 pmol/µl]
0,05	µl	de KVM164 [10 pmol/µl]
0,05	µl	de KVM165 [10 pmol/µl]

0,1 µl de TM1788 [10 pmol/µl]
 0,1 µl de TM1242 [10 pmol/µl]
 x µl de ADN molde (20 ng*)
 Agua hasta 10 µl

Notas:

- *La 2x PerfeCta qPCR FastMix II, ROX fue proporcionada por Quanta Bioscience. Pueden usarse otros tampones de enzimas, pero debería verificarse el rendimiento.*
- *Los cebadores y las sondas marcadas se pidieron a Integrated DNA Technologies*
- **La cantidad de ADN molde por reacción puede variar, pero debería verificarse*

2.1.3. Condiciones de termociclación

	Tiempo	Temperatura
	5 min.	95 °C
Seguido de:	3 s	95 °C
	30 s	60 °C
	Durante 35 ciclos	
Seguido de:	Mantenido	10 °C

Notas:

- *Las condiciones de termociclación se validaron para su uso en un termociclador BIORAD C1000. Puede usarse otro equipamiento, pero debería verificarse el rendimiento*

2.1.4. Ajustes de longitud de onda y ancho de banda

Excitación	Emisión
FAM	495 nm ± 5nm 517 nm ± 5nm
JOE	530 nm ± 5nm 555 nm ± 5nm
ROX	581 nm ± 5nm 607 nm ± 5nm

Notas:

- *Los ajustes de longitud y ancho de banda se validaron para su uso en un lector de placas Tecan M1000. Pueden usarse otro equipamiento y ajustes, pero debería verificarse el rendimiento*

2.1.5. Muestras de control

Las siguientes muestras de control deberían incluirse en el experimento para validar los resultados de muestras de ensayo:

- Control positivo: una muestra de ADN que contiene las secuencias diana y endógenas
- Control negativo: una muestra de ADN que contiene solamente la secuencia endógena
- Control sin molde: una muestra de agua (sin ADN)

2.1.6. Análisis de datos

- Para todas las muestras, se calculan las relaciones de señal fluorescente con respecto a fondo (S/B) para la reacción tanto diana como endógena.
- Las muestras de control deberían proporcionar el resultado esperado, es decir:
 - o El control positivo debería puntuarse como "detectado"
 - o El control negativo debería puntuarse como "no detectado"
 - o El control sin molde debería mostrar solamente niveles de fondo fluorescentes
- Una muestra se puntúa de la siguiente manera:
 - o Detectada: la S/B diana y la S/B endógena supera una relación umbral aceptable, por ejemplo, 2
 - o No detectada: la S/B diana está por debajo de una relación umbral aceptable, por ejemplo, 1, y, además, la S/B endógena supera una relación umbral aceptable, por ejemplo, 2
 - o Inconcluyente: la S/B diana y endógena están por debajo de un umbral aceptable, por ejemplo, 1

La Figura 2 muestra un ejemplo del resultado del método para una serie de muestras de soja que contienen EE-GM5 y muestras de soja convencionales. Para cada muestra se presentan las relaciones S/B tanto para la reacción específica de EE-GM5 como para la reacción endógena.

2.2. Método de puntos finales para el análisis de la identidad y cigosidad de EE-GM5

Este método describe un método de detección por reacción en cadena de la polimerasa para analizar la presencia y el estado de cigosidad de secuencias de ADN específicas del evento EE-GM5 en muestras de ADN obtenidas de muestras biológicas, tales como materiales de planta (por ejemplo, hoja o semilla) usando procedimientos de extracción de ADN convencionales.

La descripción del método destaca los reactivos de reacción, las secuencias de

cebadores y sondas oligonucleotídicos, las condiciones de termociclación necesarias para realizar la reacción y los ajustes de lectura fluorescente que se ha descubierto que son apropiados para la detección de amplicón. También proporciona recomendaciones generales acerca de la naturaleza y el uso de muestras de control. Además, se proporciona orientación para el análisis e interpretación de datos, que incluye un ejemplo de un resultado del método teniendo en cuenta las recomendaciones acerca del uso de materiales de control y la orientación para el análisis de datos.

Se observa que el rendimiento del método para el análisis de la cigosidad (de la opción 1 posterior) puede depender de la variedad debido a la naturaleza de la secuencia de locus preinserción. Por lo tanto, es necesaria verificación del rendimiento para cada variedad en la que se realiza introgresión del evento. Para casos de rendimiento inadecuado, puede usarse un método de puntos finales alternativo para cigosidad (como en la opción 2 posterior) o un método de PCR en tiempo real alternativo basado en el análisis del número de copias para determinación de la cigosidad, tal como el descrito posteriormente en la sección 2.3.

2.2.1. Diseño del método

El método usa la química de Taqman para amplificar y detectar dos secuencias diana: una reacción específica de EE-GM5 determina la presencia del evento, una reacción específica de locus preinserción determina la presencia del locus preinserción del evento.

La detección de solamente la secuencia específica de EE-GM5 indica la presencia del evento EE-GM5 en un estado de cigosidad homocigoto.

La detección de la secuencia específica de EE-GM5 y específica del locus preinserción indica la presencia del evento EE-GM5 en un estado de cigosidad hemocigoto.

La detección de solamente la secuencia específica del locus preinserción indica la ausencia del evento EE-GM5.

2.2.1.1. Reacción específica de EE-GM5

A. Opción 1

Se diseñaron dos cebadores, PRIM1040 y PRIM1041, para amplificar un amplicón de 84 pb que abarcan la región de unión de la secuencia flanqueante 5' de ADN-T con el fragmento de inserción de ADN-T para el evento EE-GM5.

Se diseñó una sonda, TM1789 usando FAM como marcador fluorescente y BHQ1 como interruptor, para detectar la secuencia amplificada.

Cebador directo dirigido a la secuencia de ADN-T de EE-GM5:

PRIM1041 5'- CATTgTgCTgAATAggTTTATAgCTATgAT -3' (SEQ ID NO.

18)

Cebador inverso dirigido a la secuencia flanqueante 5' de ADN-T de EE-GM5:

PRIM1040 5'- TCAAATCAACATgggTgACTAgAAA -3' (SEQ ID NO. 19)

Sonda dirigida a la unión del ADN-T de EE-GM5 y su secuencia flanqueante 5':

TM1789 FAM 5'- CAgTACTgggCCCTTgTggCgCT -3' BHQ-1 (SEQ ID NO.

20)

B. Opción 2

Se diseñaron dos cebadores, PRIM2123 y PRIM1041, para amplificar un amplicón de 134 pb que abarcan la región de unión de la secuencia flanqueante 5' de ADN-T con el fragmento de inserción de ADN-T para el evento EE-GM5.

Se diseñó una sonda, TM1789 usando FAM como marcador fluorescente y BHQ1 como interruptor, para detectar la secuencia amplificada.

Cebador directo dirigido a la secuencia de ADN-T de EE-GM5:

PRIM1041 5'- CATTgTgCTgAATAggTTTATAgCTATgAT -3' (SEQ ID NO.

18)

Cebador inverso dirigido a la secuencia flanqueante 5' de ADN-T de EE-GM5:

PRIM2123 5'- gCACTgTTTAACTTTAAATAACTCATTTgAg -3'(SEQ ID NO. 30)

Sonda dirigida a la unión del ADN-T de EE-GM5 y su secuencia flanqueante 5':

TM1789 FAM 5'- CAgTACTgggCCCTTgTggCgCT -3' BHQ-1 (SEQ ID NO.

20)

2.2.1.1. Reacción específica del locus preinserción

A. Opción 1

Se diseñan dos cebadores, PRIM1629 y PRIM1040, para amplificar un amplicón de 72 pb que abarca la unión del locus preinserción y la secuencia flanqueante 5' del locus preinserción de EE-GM5.

Se diseña una sonda de MGB, TM2083 usando VIC como marcador fluorescente y el MGB-NFQ como interruptor, para detectar la secuencia amplificada

Cebador directo dirigido a la secuencia del locus preinserción de EE-GM5:

PRIM1629 5'- TTggTgAAAAACAATTTggTgTACA -3' (SEQ ID NO. 21)

Cebador inverso dirigido a la secuencia flanqueante 5' de ADN-T de EE-GM5:

PRIM1040 5'- TCAAATCAACATgggTgACTAgAAA -3' (SEQ ID NO. 19)

Sonda de tipo silvestre que se dirige a la unión del locus preinserción y secuencia flanqueante 5':

TM2083 VIC 5'- AATCAAATCgACATCAATgT -3' MGB-NFQ (SEQ ID NO. 22)

B. Opción 2

Se diseñan dos cebadores, PRIM2122 y PRIM2123, para amplificar un amplicón de 193 pb que abarca la unión del locus preinserción y la secuencia flanqueante 5' del locus preinserción de EE-GM5.

Se diseña una sonda de MGB, TM2327 usando VIC como marcador fluorescente y el MGB-NFQ como interruptor, para detectar la secuencia amplificada.

Cebador directo dirigido a la secuencia del locus preinserción de EE-GM5:

PRIM2122 5' CAAgCAAAATAAgCAACTAgATCTATTgg -3' (SEQ ID NO.

31)

Cebador inverso dirigido a la secuencia flanqueante 5' de ADN-T de EE-GM5:

PRIM2123 5'- gCACTgTTTAACTTTAAATAACTCATTTgAg -3' (SEQ ID NO.

30)

Sonda de tipo silvestre que se dirige a la unión del locus preinserción y secuencia flanqueante 5':

TM2327 VIC 5'- TTTggTgAAAAACAATTTggTgT -3' MGB-NFQ (SEQ ID NO.

32)

2.2.2. Composición de la mezcla de reacción

A. Opción 1

5,0 µl	de 2x PerfeCta qPCR FastMix II, ROX
0,4 µl	de PRIM1040 [10 pmol/µl]
0,2 µl	de PRIM1041 [10 pmol/µl]
0,2 µl	de PRIM1629 [10 pmol/µl]
0,1 µl	de TM1789 [10 pmol/µl]
0,1 µl	de TM2083 [10 pmol/µl]
x µl	de ADN molde (20 ng*)
Agua hasta 10 µl	

B. Opción 2

5,0 µl	de 2x PerfeCta qPCR FastMix II, ROX
0,2 µl	de PRIM1041 [10 pmol/µl]
0,2 µl	de PRIM2122 [10 pmol/µl]

0,2	μl	de PRIM2123 [10 pmol/μl]
0,1	μl	de TM1789 [10 pmol/μl]
0,1	μl	de TM2327 [10 pmol/μl]
x	μl	de ADN molde (20 ng*)
Agua hasta 10 μl		

Notas:

- *La 2x PerfeCta qPCR FastMix II, ROX fue proporcionada por Quanta Bioscience. Pueden usarse otros tampones de enzimas, pero debería verificarse el rendimiento.*
- *Los cebadores y las sondas marcadas se pidieron a Integrated DNA Technologies*
- **La cantidad de ADN molde por reacción puede variar pero debería verificarse*

2.2.3. Condiciones de termociclación (las mismas para la opción 1 y 2)

	Tiempo	Temperatura
	5 min.	95 °C
Seguido de:	3 s	95 °C
	30 s	60 °C
	Durante 35 ciclos	
Seguido de:	Mantenido	10 °C

Notas:

- *Las condiciones de termociclación se validaron para su uso en un termociclador BIORAD C1000. Puede usarse otro equipamiento, pero debería verificarse el rendimiento*

2.2.4. Ajustes de longitud de onda y ancho de banda (los mismos para la opción 1 y 2)

Excitación	Emisión
FAM	495 nm ± 5nm 517 nm ± 5nm
JOE	530 nm ± 5nm 555 nm ± 5nm
ROX	581 nm ± 5nm 607 nm ± 5nm

Notas:

- *Los ajustes de longitud y ancho de banda se validaron para su uso en un lector de placas Tecan M1000. Pueden usarse otro equipamiento y ajustes, pero debería verificarse el rendimiento*

2.2.5. Muestras de control (las mismas para la opción 1 y 2)

Las siguientes muestras de control deberían incluirse en el experimento para

validar los resultados de muestras de ensayo:

- Control homocigoto: una muestra de ADN que contiene la secuencia diana en un estado homocigoto
- Control hemicigoto: una muestra de ADN que contiene la secuencia diana en un estado hemicigoto
- Control de tipo silvestre: una muestra de ADN que no contiene la secuencia diana
- Control sin molde: una muestra de agua

2.2.6. Análisis de datos (el mismo para la opción 1 y 2)

- Para todas las muestras, se calculan las relaciones de señal fluorescente con respecto a fondo (S/B) para la reacción de locus tanto diana como preinserción.
- Las muestras de control deberían proporcionar el resultado esperado, es decir:

- o El control homocigoto debería puntuarse como "homocigoto"
- o El control hemicigoto debería puntuarse como "hemicigoto"
- o El control de tipo silvestre debería puntuarse como "tipo silvestre"
- o El control sin molde debería mostrar solamente niveles de fondo fluorescentes
- Una muestra se puntúa de la siguiente manera:
 - o homocigota: la S/B diana supera una relación umbral aceptable, por ejemplo, 2, y la S/B de locus preinserción está por debajo de una relación umbral aceptable, por ejemplo, 1
 - o hemicigota: la S/B de locus tanto diana como preinserción supera una relación umbral aceptable, por ejemplo, 2
 - o tipo silvestre: la S/B diana está por debajo de una relación umbral aceptable, por ejemplo, 1, y la S/B de locus preinserción supera una relación umbral aceptable, por ejemplo, 2
 - o Inconcluyente: la S/B de locus diana y preinserción están por debajo de un umbral aceptable, por ejemplo, 1

La Figura 3 muestra un ejemplo del resultado del método (de la opción 1 anterior) para una serie de muestras de soja que contienen EE-GM5 en un estado homocigoto, que contiene las muestras de soja EE-GM5 en un estado hemicigoto y muestras de soja convencionales.

2.3. Método de PCR en tiempo real para el análisis de la identidad y cigosidad de EE-GM5

El método describe un método de detección por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa para analizar el estado de cigosidad del evento EE-GM5 en muestras de ADN obtenidas de muestras biológicas, tales como materiales de planta (por ejemplo, hoja o semilla) usando procedimientos de extracción de ADN convencionales.

La descripción del método destaca los reactivos de reacción, las secuencias de cebadores y sondas oligonucleotídicas, las condiciones de termociclación necesarias para realizar la reacción, incluidos los ajustes de lectura fluorescente que se ha descubierto que son apropiados para la detección de amplicón. También proporciona recomendaciones generales acerca de la naturaleza y el uso de muestras de control. Además, se proporciona orientación para el análisis y la interpretación de los datos.

Este método no depende de la variedad y puede usarse como método de análisis de la cigosidad alternativo al método descrito en la sección 2.2 anterior.

2.3.1. Diseño del método

El método usa la química de Taqman y los principios de la PCR en tiempo real para cuantificar el número de copias relativo de una secuencia específica de EE-GM5.

El método incluye una reacción específica de EE-GM5 para cuantificar el número de copias de EE-GM5 y una reacción específica de taxón para normalización del número de copias de EE-GM5.

Las muestras que contienen la secuencia de inserción de EE-GM5 en un estado homocigoto tienen un número de copias relativo que es dos veces mayor que las muestras hemicigotas. Las muestras acigotas no amplifican la secuencia de EE-GM5.

2.3.2. Reacción específica de EE-GM5

Se diseñaron dos cebadores, PRIM1038 y PRIM1039, para amplificar un amplicón de 85 pb que abarcan la región de unión de la secuencia flanqueante 3' con el fragmento de inserción de ADN-T para el evento EE-GM5.

Se diseñó una sonda, TM1788 usando FAM como marcador fluorescente y BHQ1 como interruptor, para cuantificar la secuencia amplificada.

Cebador directo dirigido a la secuencia de ADN-T de EE-GM5:

PRIM1038 5'- gAgCCACCTTCCTTTTCCACTA -3' (SEQ ID NO. 12)

Cebador inverso dirigido a la secuencia flanqueante 3' de EE-GM5:

PRIM1039 5'- ATAgggTTACTgCTTCgTAAAATAAgCA -3' (SEQ ID NO. 13)

Sonda dirigida a la unión del ADN-T de EE-GM5 y su secuencia flanqueante 3':

TM1788 FAM 5'- CgCgTCCATgATgCTgCgACTATg -3' BHQ-1 (SEQ ID NO. 14)

2.3.3. Reacción específica de taxón

Se diseñaron dos cebadores, KVM164 y KVM165, para amplificar un amplicón de 102 pb de la secuencia génica de lectina 1 endógena de soja.

Se diseñó una sonda, TM1242 usando JOE como marcador fluorescente y BHQ1 como interruptor, para cuantificar la secuencia amplificada

Cebador directo dirigido a la secuencia génica de Lectina 1 endógena:

KVM164 5'- CTTTCTCgCACCAATTgACA -3' (SEQ ID NO. 15)

Cebador inverso dirigido a la secuencia génica de Lectina 1 endógena:

KVM165 5'- TCAAACCTCAACAgCgACgAC -3' (SEQ ID NO. 16)

Sonda dirigida a la secuencia génica de Lectina 1 endógena:

TM1242 JOE 5'- CCACAAACACATgCAggTTATCTTgg -3' BHQ1 (SEQ ID NO. 17)

2.3.4. Composición de la mezcla de reacción

5,0	µl	de 2x PerfeCta qPCR FastMix II, Low ROX
0,2	µl	de PRIM1038 [10 pmol/µl]
0,2	µl	de PRIM1039 [10 pmol/µl]
0,2	µl	de KVM164 [10 pmol/µl]
0,2	µl	de KVM165 [10 pmol/µl]
0,05	µl	de TM1788 [10 pmol/µl]
0,05	µl	de TM1242 [10 pmol/µl]
x	µl	de ADN molde (20 ng*)
Agua hasta 10 µl		

Notas:

- *La 2x PerfeCta qPCR FastMix II, LOW ROX fue proporcionada por Quanta Bioscience. Pueden usarse otros tampones de enzimas, pero debería verificarse el rendimiento.*
- *El cebador y las sondas marcadas se pidieron a Integrated DNA*

Technologies

- **La cantidad de ADN molde por reacción puede variar pero debería verificarse*

2.3.5. Condiciones de termociclación

Tiempo	Temperatura
--------	-------------

5 min. 95 °C
 Seguido de: 3 s 95 °C
 30 s 60 °C **
 Durante 35 ciclos
 Seguido de: Mantenido 10 °C

Notas:

- ***Se realiza lectura fluorescente en cada ciclo, tras la finalización de la etapa de elongación del cebador a 60 °C*
- *Las condiciones de termociclación se validaron para su uso en un aparato de PCR en tiempo real ViiA7 y Quantstudio 7. Puede usarse otro equipamiento, pero debería verificarse el rendimiento*

2.3.6. Muestras de control

Las siguientes muestras de control deberían incluirse en el experimento para validar los resultados de muestras de ensayo

- Control homocigoto: una muestra de ADN que contiene la secuencia diana en un estado homocigoto
- Control hemicigoto: una muestra de ADN que contiene la secuencia diana en un estado hemicigoto
- Control de tipo silvestre: una muestra de ADN que no contiene la secuencia diana
- Control sin molde: una muestra de agua

2.3.7. Análisis de datos

- Se realiza análisis de datos usando el método de ddCt. En este método se calcula el número de copias para todas las muestras en relación con una muestra de referencia elegida. Se recomienda usar el control hemicigoto como la muestra de referencia.
- Las muestras de control deberían proporcionar el resultado esperado,

es decir:

- o El control homocigoto debería puntuarse como "homocigoto"
- o El control hemicigoto debería puntuarse como "hemicigoto"
- o El control de tipo silvestre debería puntuarse como "tipo silvestre"
- o El control sin molde debería mostrar solamente niveles de fondo fluorescentes
- Una muestra se puntúa de la siguiente manera:

- o homocigota: el número de copias relativo es $2 \pm$ un umbral aceptable, por ejemplo 0,5
- o hemicigota: el número de copias relativo es $1 \pm$ un umbral aceptable, por ejemplo 0,25
- o tipo silvestre: el número de copias relativo es $0 \pm$ un umbral aceptable, por ejemplo 0,1
- o Inconcluyente: el número de copias relativo está fuera de los intervalos aceptables para muestras homocigotas, hemicigotas y de tipo silvestre

2.4. Método de PCR en tiempo real para el análisis de la presencia de nivel bajo de EE-GM5

Este método describe un método de detección para analizar la presencia de nivel bajo de las secuencias de ADN del evento EE-GM5 a partir de materiales de planta agrupados (por ejemplo, hoja o semilla) o materiales procesados (por ejemplo, alimento o pienso que contiene grano de soja procesado) agrupados usando procedimientos de extracción de ADN convencionales.

La descripción del método destaca los reactivos de reacción, las secuencias de cebadores y sondas oligonucleotídicos y las condiciones de termociclación necesarias para realizar la reacción. También proporciona recomendaciones generales acerca del uso simultáneo de un método específico de taxón para respaldar el análisis de datos y la interpretación de resultados. Además, se proporcionan recomendaciones acerca de la naturaleza y el uso de muestras de control.

Se observa que pueden estar disponibles métodos alternativos para el fin pretendido, incluyendo, pero sin limitación, métodos de PCR digital droplet. Los métodos de PCR Digital droplet usan métodos de puntos finales para el análisis de identidad de eventos, como se ha descrito en la sección 1.1, en combinación con principios de submuestreo en la muestra de ADN extraída. En este método, la presencia de nivel bajo del evento se determina en base a la relación de submuestras de ADN que se ha descubierto que son positivas y negativas para la secuencia del evento.

2.4.1 Diseño del método

El método usa la química de Taqman y los principios de la PCR en tiempo real para detectar o cuantificar niveles bajos de EE-GM5 en una muestra de ADN.

Se diseñan dos cebadores, PRIM1040 y PRIM1041, para amplificar un amplicón de 84 pb que abarcan la región de unión de la secuencia flanqueante 5' con

el fragmento de inserción de ADN-T para el evento EE-GM5.

Se diseña una sonda, TM1789 usando FAM como marcador fluorescente y BHQ1 como interruptor, para cuantificar la secuencia amplificada.

Cebador directo dirigido a la secuencia de ADN-T de EE-GM5:

PRIM1041 5'- CATTgTgCTgAATAggTTTATAgCTATgAT -3' (SEQ ID NO. 18)

Cebador inverso dirigido a la secuencia flanqueante 5' de ADN-T de EE-GM5:

PRIM1040 5'- TCAAATCAACATgggTgACTAgAAA -3' (SEQ ID NO. 19)

Sonda dirigida a la unión del ADN-T de EE-GM5 y su secuencia flanqueante 5':

TM1789 FAM 5'- CAgTACTgggCCCTTgTggCgCT -3' BHQ-1 (SEQ ID NO. 20)

2.4.2 Composición de la mezcla de reacción

10,0	µl	de 2x PerfeCta qPCR Fastmix II, Low ROX
0,5	µl	de PRIM1040 [10 pmol/µl]
0,5	µl	de PRIM1041 [10 pmol/µl]
0,5	µl	de TM1789 [10 pmol/µl]
x	µl	de ADN molde (200 ng*)
Agua hasta 20 µl		

Notas:

- La 2x PerfeCta qPCR FastMix II, LOW ROX fue proporcionada por Quanta Bioscience. Pueden usarse otros tampones de enzimas, pero debería verificarse el rendimiento.
- El cebador y las sondas marcadas se pidieron a Integrated DNA Technologies

Technologies

- *La cantidad de ADN molde por reacción puede variar pero debería verificarse

2.4.3 Condiciones de termociclación

	<u>Tiempo</u>	<u>Temperatura</u>
	5 min.	95 °C
Seguido de:	3 s	95 °C
	30 s	60 °C **
Durante 40 ciclos		
Seguido de:	Mantenido	10 °C

Notas:

- **Se realiza lectura fluorescente en cada ciclo, tras la finalización de la

etapa de elongación del cebador a 60 °C

- *Las condiciones de termociclación se validaron para su uso en un aparato de PCR en tiempo real ViiA7 y Quantstudio 7. Puede usarse otro equipamiento, pero debería verificarse el rendimiento*

2.4.4 Método específico de taxón

Debería realizarse un método de detección de PCR en tiempo real que se dirige a una secuencia endógena simultáneamente en una cantidad idéntica de ADN molde como se usa en el método de PCR en tiempo real específico de diana. El resultado del método específico de taxón debería usarse para respaldar el análisis y la interpretación de los datos, es decir, para normalizar la cantidad de ADN aportado y para validar cualquier resultado negativo para la reacción específica de diana.

2.4.5 Muestras de ensayo, muestras de calibración y muestras de control

- Se recomienda que todas las muestras de ensayo se analicen por duplicado.
- Se incluye un conjunto de muestras de calibración en el experimento para generar curvas patrón para el método específico tanto de diana como de taxón.
- Además, se incluyen las siguientes muestras de control:
 - o Control positivo: una muestra de ADN que contiene la secuencia diana en el nivel del límite de detección
 - o Control negativo: una muestra de ADN que contiene solamente la secuencia endógena
 - o Control sin molde: una muestra de agua

2.4.6 Análisis de datos

- Para todas las muestras se determinan los valores de ciclo umbral (es decir, valores de Ct) para el método específico tanto de diana como de taxón. Un ciclo umbral se define como el número de ciclo en el que el diagrama de amplificación para una muestra dada alcanza un umbral señal definido (véase Figura 4)
- Se calculan fórmulas de curvas patrón para el método específico tanto de diana como de taxón usando los valores de Ct y la cantidad de copias de genoma de las muestras de calibración
- Los parámetros de curvas patrón deberían satisfacer los criterios de aceptación para pendiente y linealidad (R^2), por ejemplo
 - o $-3,2 < \text{pendiente} < -3,6$

- o $R^2 > 0,98$
- Para todas las muestras, el número de copias del genoma para el método de diana y endógeno se calcula usando análisis de regresión lineal.
- La cantidad de presencia de nivel bajo en relación con la cantidad total de ADN específico de taxón se determina calculando el % de relación de los números de copias de genoma para el método específico de diana y taxón.
- Las muestras de control deberían proporcionar el resultado esperado, es decir:
 - o El control positivo debería puntuarse como "detectado"
 - o El control negativo debería puntuarse como "no detectado"
 - o El control sin molde debería mostrar solamente niveles de fondo fluorescentes
- Una muestra se puntúa de la siguiente manera:
 - o Detectada: la presencia de nivel bajo está por encima del límite de detección para todas las repeticiones, teniendo en cuenta la incertidumbre de medición del método
 - o No detectada: la presencia de nivel bajo está por debajo del límite de detección para todas las repeticiones, teniendo en cuenta la incertidumbre de medición del método
 - o Inconcluyente: las muestras repetidas proporcionan puntuaciones contradictorias

La Figura 4 muestra un ejemplo del resultado del método realizado en las muestras de calibración.

3. Introgresión de EE-GM5 en cultivares preferidos

El evento de élite EE-GM5 se introdujo mediante retrocruzamiento repetido en seis líneas de soja de élite diferentes. Las líneas se seleccionaron para representar una serie de madureces: dos líneas de MG I, una línea de MG III, dos líneas de MG VI y una línea de MG IX. Una de las líneas de MG I y la línea de MG III contenían el alelo de resistencia nativo *Rhg1* de PI88788 y una de las líneas de MG VI portaba los alelos de resistencia nativos *Rhg1* y *Rhg4* de PI437654. Las otras tres líneas fueron susceptibles a SCN.

Además, en ensayos iniciales, en varios experimentos, no se observó ninguna diferencia biológicamente significativa para Cry14Ab-1 de niveles de expresión de

proteína HPPD-4 medidos en hojas de plantas cultivadas en invernadero (como se mide con ELISA transferencia Western (solamente se vio variación de ensayo normal)), y no se vieron diferencias significativas en los resultados de ensayo de SCN de invernadero convencional (que miden el % de reducción en quistes de SCN frente a control de Thorne), cuando se realizó introgresión del evento EE-GM5 de fondo de Thorne en otros fondos de germoplasma de soja (de diferente madurez, en diferentes estadios de introgresión), en comparación con lo que se descubrió para EE-GM5 en el fondo de Thorne.

La introgresión del evento de élite EE-GM5 en otros cultivares de soja no influye significativamente en ninguna de las características fenotípicas o agrónomas deseables de estos cultivares (sin arrastre por enlace) mientras que la expresión de los transgenes cumple niveles comercialmente aceptables. Esto confirma el estado del evento EE-GM5 como un evento de élite.

Asimismo, el evento de élite EE-GM5 se combina provechosamente con otros eventos de transformación de élite de soja. Son plantas particularmente útiles según la invención plantas que contienen EE-GM5 combinado con otro evento de transformación de soja, o una combinación de más de un evento de transformación de soja adicional, tales como los enumerados en las bases de datos de diversas agencias reguladoras nacionales o regionales, incluyendo, pero sin limitación, evento MON87751 (descrito en el documento WO2014201235 y petición de USDA-APHIS 13-337-01p), evento pDAB8264.42.32.1 (descrito en el documento WO2013010094), evento DAS-81419-2 (también conocido como Conkesta™ Soybean, descrito en el documento WO2013016527 y la petición de USDA-APHIS 12-272-01p), evento EE-GM3 (también conocido como FG-072, MST-FG072-3, descrito en el documento WO2011063411, petición de USDA-APHIS 09-328-01p), evento SYHT0H2 (también conocido como 0H2, SYN-ØØØH2-5, descrito en los documentos WO2012/082548 y 12-215-01p), evento DAS-68416-4 (también conocido como soja Enlist, descrito en los documentos WO2011/066384 y WO2011/066360, petición de USDA-APHIS 09-349-01p), evento DAS-81615-9 (descrito en el documento WO2014004458), evento DAS-44406-6 (también conocido como Enlist E3, DAS-444Ø6-6, descrito en los documentos WO2012/075426 y USDA-APHIS 11-234-01p), evento MON87708 (sojas Xtend, descrito en el documento WO2011/034704 y la petición de USDA-APHIS 10-188-01p), evento MON89788 (también conocido como Genuity Roundup Ready 2 Yield, descrito en el documento WO2006/130436 y la petición de USDA-APHIS 06-178-01p), evento DAS-14536-7 (descrito en el documento WO2012/075429), evento 40-3-2 (también

conocido como RoundUp Ready, MON-Ø4Ø32-6, descrito en la petición de USDA-APHIS 93-258-01), evento A2704-12 (también conocido como LL27, ACS-GMØØ5-3, descrito en el documento WO2006108674 y petición de USDA-APHIS 96-068-01p), evento 127 (también conocido como BPS-CV127-9, descrito en el documento WO2010/080829), evento A5547-127 (también conocido como LL55, ACS-GMØØ6-4, descrito en el documento WO2006108675 y en la petición de USDA-APHIS 96-068-01p), evento MON87754 (también conocido como Vistive III, MON-87754-1, descrito en el documento WO2010/024976), evento HOS (también conocido como DP-3Ø5423-1, soja de alto contenido oleico Plenish, descrito en el documento WO2008054747), evento MON87701 (también conocido como MON-877Ø1-2, descrito en el documento WO2009064652 y la petición de USDA-APHIS 09-082-01p), evento MON 87705 (también conocido como MON-877Ø5-6, descrito en el documento WO2010/037016 y la petición USDA-APHIS 09-201-01p), evento MON87712 (también conocido como MON-87712-4, descrito en el documento WO2012/051199), evento pDAB4472-1606 (también conocido como evento 1606, descrito en el documento WO2012/033794), evento 3560.4.3.5 (también conocido como DP-356043-5, descrito en el documento WO2008/002872), evento MON87769 (también conocido como MON-87769-7, descrito en el documento WO2009102873 y en la petición de USDA-APHIS 09-183-01p) o cualquier combinación de EE-GM5 con varios de estos eventos de soja transgénicos adicionales, tales como una combinación de EE-GM5 con una cualquiera de las siguientes combinaciones: evento MON98788 x MON87708 (también conocido como sojas Roundup Ready 2 Xtend, MON-877Ø8-9 x MON-89788-1), evento HOS x evento 40-3-2 (también conocido como sojas de alto contenido oleico Plenish x sojas Roundup Ready), evento EE-GM3 x EE-GM2 (también conocido como FG-072xLL55, descrito en el documento WO2011063413), evento MON 87701 x MON 89788 (también conocido como soja Intacta RR2 Pro, MON-877Ø1-2 x MON-89788-1), DAS-81419-2 x DAS-44406-6 (también conocido como soja Conkesta™ Enlist E3™, DAS-81419-2 x DAS-444Ø6-6), evento DAS-81419-2 x evento DAS-68416-4 (descrito en el documento WO2013016516), evento DAS-68416-4 x evento MON 89788 (también conocido como soja Enlist™ RoundUp Ready® 2, DAS-68416-4 X MON-89788-1), evento MON-87769-7 x evento MON-89788-1 (también conocido como sojas Omega-3 X Genuity Roundup Ready 2 Yield), MON 87705 x MON 89788 (también conocido como Vistive Gold, MON-877Ø5-6 x MON-89788-1), MON 87769 x MON 89788 (también conocido como sojas Omega-3 x Genuity Roundup Ready 2 Yield, MON-87769-7 x MON-89788-1).

Como se usa en las reivindicaciones posteriores, a menos que se indique claramente otra cosa, se pretende que el término "planta" abarque tejidos de planta, en cualquier estadio de madurez, así como cualquier célula, tejido u órgano tomado o procedente de cualquier planta de este tipo, incluyendo, sin limitación, cualquier semilla, hoja, tallo, flor, raíz, célula individual, gameto, cultivo celular, cultivo tisular o protoplasto.

La semilla de referencia que comprendía el evento de élite EE-GM5 se depositó en la ATCC (10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209) el 9 de noviembre 2016, con el número de referencia de ATCC PTA-123625 y se confirmó la viabilidad de la misma. Son nombres alternativos para EE-GM5 evento GMB151 o BCS-GM151-6.

Se pretende que la descripción anterior de la invención sea ilustrativa y no limitante.

Las personas del oficio de nivel medio pueden idear diversos cambios o modificaciones en las realizaciones descritas. Estos pueden realizarse sin alejarse del espíritu o alcance de la invención.

LAC\LAC\ID-840578\WPC25238