

## **EVENTO TRANSGÉNICO DE SOJA GM\_CSM63770 Y MÉTODOS PARA SU DETECCIÓN Y SUS USOS**

### **REFERENCIA RECÍPROCA CON SOLICITUD RELACIONADA**

**[0001]** Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos de América nro. 63/355.947, presentada el 27 de junio de 2022, la cual se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad.

### **INCORPORACIÓN DE LISTADO DE SECUENCIAS**

**[0002]** Juntamente con la presente, mediante presentación electrónica, se presenta y se incorpora como referencia el listado de secuencias contenido en el archivo denominado MONS567WO\_ST26 que tiene un tamaño de 341.230 bytes (medición según Microsoft Windows®), creado el 16 de junio de 2023.

### **CAMPO DE LA INVENCION**

**[0003]** La invención está relacionada con moléculas de ADN recombinante presentes en y/o aisladas del evento de soja GM\_CSM63770. La invención también está relacionada con plantas de soja transgénicas, partes de plantas, y semillas, células, y productos agrícolas que contienen el evento de soja GM\_CSM63770, como así también con métodos para la utilización de estos y detectar la presencia del evento de soja GM\_CSM63770. Las plantas de soja transgénicas, partes de plantas, semillas y células que contienen el ADN del evento de soja GM\_CSM63770 exhiben resistencia a infestaciones de insectos de la familia Lepidoptera.

### **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

**[0004]** La soja (*Glycine max*) es un importante cultivo y es una fuente de alimentos primarios en muchas áreas del mundo. Se han aplicado métodos de biotecnología a la soja para mejorar los rasgos agronómicos y la calidad del producto. Uno de tales rasgos agronómicos es la resistencia a insectos, lo cual se logra a través de la expresión de toxinas de insectos heterólogos, también conocidos como transgenes, insertados en el genoma de la planta de soja.

**[0005]** Existe un número de diversos eventos transgénicos en soja que han sido descritos en la técnica que proporcionan diversos tipos de resistencia a insectos, particularmente a especies de lepidópteros, y esos incluyen MON87701, MON87751 y DAS81419 (resistente a lepidópteros y tolerante a herbicidas). Estos eventos transgénicos se han empleado comercialmente en una variedad de geografías en todo el mundo durante un lapso extendido

de tiempo, y se ha observado resistencia a las toxinas expresadas en estos eventos por parte de las plagas de insectos diana en muchas regiones geográficas donde estos se han desplegado.

**[0006]** Por lo tanto, existe la continua necesidad en la técnica de proporcionar eventos transgénicos de soja novedosos que exhiban resistencia a la infestación por parte de insectos, y preferentemente, que los novedosos eventos transgénicos confieran resistencia a los insectos diana, inclusive a aquellas razas que han desarrollado resistencia a los rasgos existentes desplegados comercialmente, empleando modos de acción que no se superpongan con los modos de acción previamente desplegados en realizaciones comerciales anteriores ni sean similares a estos. En la presente se describe un ejemplo de tal evento transgénico novedoso que confiere resistencia a infestaciones de lepidópteros, inclusive resistencia a lepidópteros que han desarrollado resistencia a realizaciones comerciales que se han desplegado con anterioridad.

### **SÍNTESIS DE LA INVENCION**

**[0007]** En una realización, la invención proporciona un novedoso evento de soja transgénica – GM\_CSM63770 – que proporciona control insecticida sobre plagas de lepidópteros de la soja. En una realización adicional, la invención también proporciona plantas transgénicas, células de plantas, semillas, partes de plantas y productos básicos que comprenden ADN del evento de soja GM\_CSM63770. El evento contiene ADN novedoso que es específico y exclusivo de este evento GM\_CSM63770 y comprende el segmento de ADN transgénico insertado y los novedosos segmentos de ADN que son adyacentes al segmento de ADN insertado. Estos segmentos adyacentes se describen en la presente como las secuencias de unión que corresponden a las secuencias de ADN que se extienden a lo largo del ADN cromosómico adyacente al punto de ruptura cromosómico en el cual se ha introducido el ADN insertado. En otra realización, la invención proporciona polinucleótidos específicos y exclusivos, y aptos para usar en la identificación y detección de la presencia del ADN del evento de soja GM\_CSM63770 en una muestra biológica que contiene tejido de soja, como así también plantas, células de plantas, partes de plantas, plantas de progenie, y productos básicos que comprenden ADN del evento de soja GM\_CSM63770. En inclusive otra realización, se proporcionan métodos relacionados con la selección de células de plantas, plantas y semillas que comprenden ADN del evento de soja GM\_CSM63770, y la detección de la presencia (o ausencia) de ADN del evento de soja GM\_CSM63770 en una muestra, tales métodos se proporcionan al investigador para confirmar que el ADN del evento está o no presente en una

muestra particular sometida al método o a métodos basados en secuencias de nucleótidos que son objeto de esta divulgación.

**[0008]** Por lo tanto, en un aspecto la invención proporciona una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10, y un complemento completo de estas.

**[0009]** En una realización, la molécula de ADN recombinante deriva del evento de soja GM\_CSM63770 en una muestra de semilla que contiene el evento y que contiene los correspondientes segmentos de ADN exclusivos y específicos correspondientes a la semilla con el evento de soja GM\_CSM63770 que ha sido depositada con el Nro. de acceso ATCC (Colección Estadounidense de Cultivos Tipo, por sus siglas en inglés) PTA-126048.

**[0010]** Otro aspecto de la invención proporciona una molécula de ADN que comprende un segmento polinucleotídico con longitud suficiente para funcionar como una sonda de ADN que hibrida específicamente bajo condiciones de hibridación rigurosas con el ADN del evento de soja GM\_CSM63770 en una muestra, donde la detección de la hibridación de la sonda de ADN con el ADN en la muestra en condiciones de hibridación rigurosas es un diagnóstico o una característica que confirma la presencia de ADN del evento de soja GM\_CSM63770 en esa muestra. En ciertas realizaciones, la muestra comprende una planta de soja, célula de planta de soja, semilla de soja, polen de soja, parte de planta de soja, planta de progenie de soja, semilla de soja de proceso, alimento para animales que comprende soja, aceite de soja, soja triturada, harina de soja, hojuelas de soja, salvado de soja, biomasa de soja y productos combustibles producidos usando soja y partes de soja, siempre que tales soja y productos de soja contengan cantidades detectables de ADN del evento de soja GM\_CSM63770 o cantidades detectables de las novedosas toxinas proteicas producidas por plantas de soja, células de soja y similares, para contener el evento de soja GM\_CSM63770.

**[0011]** Inclusive otro aspecto de la invención proporciona una primera molécula de ADN y una segunda molécula de ADN diferente de la primera molécula de ADN, es decir, un par de moléculas de ADN que funcionan como cebadores de ADN cuando se usan juntas en una reacción de amplificación que contiene los reactivos apropiados necesarios para llevar a cabo un procedimiento de amplificación de ADN con una muestra que contiene ADN plantilla del evento de soja GM\_CSM63770 para producir un amplicón que es un diagnóstico, o una característica de la presencia de dicho ADN del evento de soja GM\_CSM63770 en dicha

muestra. El amplicón producido contendrá al menos la secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10, y el complemento completo de estas.

**[0012]** Otra realización de la invención es un método para detectar la presencia de un segmento de ADN diagnóstico para confirmar la presencia o ausencia del evento de soja GM\_CSM63770 en una muestra. En ciertas realizaciones, el método se lleva a cabo al contactar la muestra con una molécula de sonda de ADN que hibrida específicamente con ADN asociado exclusivamente con el evento de soja GM\_CSM63770, luego se someten la muestra y la molécula de sonda de ADN a condiciones de hibridación rigurosas para permitir que la sonda se una al segmento del complemento apropiado del ADN específico del evento de soja GM\_CSM63770. La detección de hibridación de la molécula de sonda de ADN con el ADN en la muestra es concluyente, diagnóstica, determinante, acerca de que el ADN en la muestra contiene ADN del evento de soja GM\_CSM63770.

**[0013]** Inclusive otra realización de la invención es un método para detectar la presencia de un segmento de ADN que es un diagnóstico o una característica del ADN del evento de soja GM\_CSM63770 en una muestra que contiene ADN de soja. En una realización, el método comprende los pasos de contactar una muestra biológica con un par de moléculas de ADN que funcionan como cebadores de amplificación térmica específicos para la amplificación de un segmento de ADN del evento de soja GM\_CSM63770; realizar una reacción de amplificación suficiente para producir el amplicón de ADN; y detectar la presencia del amplicón de ADN en la reacción. La detección del amplicón de ADN es un diagnóstico o una característica de la presencia de una cantidad detectable de ADN del evento de soja GM\_CSM63770 en la muestra, y el amplicón contendrá la totalidad o una porción de la secuencia de nucleótidos a la que está dirigida la amplificación que está situada entre las posiciones de hibridación del cebador, dicha porción de la secuencia de nucleótidos a la que está dirigida la amplificación se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10 y el complemento completo de estas.

**[0014]** Otra realización de la invención es un método para detectar la presencia de proteína que es un diagnóstico o una característica del evento de soja GM\_CSM63770 en una muestra, dicho método comprende: a) contactar dicha muestra con un primer y segundo anticuerpo monoclonal, donde el primer anticuerpo monoclonal se une especialmente a Cry1A.2 y el

segundo anticuerpo monoclonal se une específicamente a Cry1B.2 en un inmunoensayo; 2) incubar el inmunoensayo durante una cantidad de tiempo suficiente para permitir la unión de los anticuerpos monoclonales; y 3) detectar la presencia de las proteínas Cry1A.2 y Cry1B.2 en dicho inmunoensayo, donde dicha detección es un diagnóstico o una característica de la presencia de dicho ADN del evento de soja GM\_CSM63770 en dicha muestra. El ensayo se puede seleccionar del grupo que consiste en un ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés), un radioinmunoensayo, y un ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral.

**[0015]** Otra realización de la invención es una planta de soja, parte de planta de soja, célula de soja, o parte de esta que comprende una molécula de polinucleótido recombinante que comprende la secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10, y el complemento completo de estas. Cada una de estas SEQ ID NOs son el ADN específico y selectivo que define el evento de soja GM\_CSM63770. Esta planta de soja, parte de planta de soja, célula de soja, o parte de esta es insecticida cuando se proporciona en la dieta de un insecto lepidóptero plaga. Los insectos lepidópteros plaga que se pretende controlar incluyen gusano elotero de la soja (*Helicoverpa zea*), gusano falso medidor de la soja (*Chrysodeixis includens*), gusano terciopelo de las leguminosas (*Anticarsia gemmatilis*), oruga militar del sur (*Spodoptera eridania*), oruga militar negra (*Spodoptera cosmioides*), oruga bolillera sudamericana (*Helicoverpa gelotopoeon*), oruga medidora del girasol (*Rachiplusia nu*), polilla del brote del poroto (*Crociosema aporema*), gusano verde del trébol (*Hypena scabra*) y barrenador menor del tallo (*Elasmopalpus lignosellus*). Adicionalmente, la planta de soja puede además definirse como progenie de cualquier generación de una planta de soja que comprende el evento de soja GM\_CSM63770, siempre que la progenie también contenga el ADN específico y selectivo que define el evento de soja GM\_CSM63770.

**[0016]** Inclusive otra realización de la invención es un método para proteger una planta de soja de la infestación de insectos, donde dicho método comprende proporcionar en la dieta de un insecto lepidóptero plaga una cantidad insecticidamente eficaz de células o tejido de la planta de soja que comprende el evento de soja GM\_CSM63770. Los insectos lepidópteros plaga contemplados incluyen gusano elotero de la soja (*Helicoverpa zea*), gusano falso medidor de la soja (*Chrysodeixis includens*), gusano terciopelo de las leguminosas (*Anticarsia gemmatilis*), oruga militar del sur (*Spodoptera eridania*), oruga militar negra (*Spodoptera*

*cosmioides*), oruga bolillera sudamericana (*Helicoverpa gelotopoeon*), oruga medidora del girasol (*Rachiplusia nu*), polilla del brote del poroto (*Crociosema aporema*), gusano verde del trébol (*Hypena scabra*) y barrenador menor del tallo (*Elasmopalpus lignosellus*).

**[0017]** Otra realización de la invención es un método para producir una planta de soja resistente a insectos, que comprende: a) cruzar manualmente mediante técnicas de mejoramiento convencionales dos plantas de soja diferentes para producir progenie, donde al menos una de las dos plantas de soja diferentes contiene ADN del evento de soja GM\_CSM63770; b) confirmar en la semilla que surge de la actividad de mejoramiento, y en las plantas de progenie y los tejidos desarrollados a partir de dicha semilla, la presencia de un segmento de ADN que es un diagnóstico o una característica del evento de soja GM\_CSM63770; y c) seleccionar la progenie que comprende ADN del evento de soja GM\_CSM63770. Dicha semilla y progenie son plantas de soja resistentes a lepidópteros.

**[0018]** Una realización adicional de la invención es una semilla de soja, material vegetal inerte, o un microorganismo que comprende una cantidad detectable de la secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10, o complementos completos de estas.

**[0019]** Inclusive otra realización es un producto básico de soja que comprende una cantidad detectable de una molécula de ADN exclusiva del evento de soja GM\_CSM63770, donde la molécula comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10. Los productos básicos de soja contemplados incluyen, entre otros, semillas de soja enteras o procesadas, alimento para animales que comprende soja, aceite de soja, soja triturada, harina de soja, hojuelas de soja, salvado de soja, biomasa de soja y productos combustibles producidos con el uso de soja y partes de soja.

**[0020]** Otra realización de la invención es una planta de soja, parte de una planta de soja o una semilla de soja de esta que comprenden ADN funcional como un molde cuando se ensaya con un método de amplificación de ADN produciendo un amplicón que es un diagnóstico o una característica de la presencia de ADN del evento de soja GM\_CSM63770.

**[0021]** Inclusive otra realización de la invención es un método para determinar la cigosidad de una planta de soja o una semilla de soja que comprende ADN descriptivo del evento de soja GM\_CSM63770. La cigosidad se determina mediante una serie de pasos consecutivos. En el

primer paso, se contacta una muestra que comprende ADN de soja con un primer par de cebadores que es capaz de producir un amplicón que es un diagnóstico o una característica de ADN que es descriptivo y está presente exclusivamente en el evento de soja GM\_CSM63770. Luego, la muestra que comprende el ADN de soja se contacta con un segundo par de cebadores que está diseñado para producir un amplicón de un estándar interno del que se sabe que es una copia individual y homocigoto en la planta de soja. El método adicionalmente incluye contactar la muestra de ADN con un conjunto de sondas que contiene al menos una primera sonda que hibrida específicamente con el alelo del evento de soja GM\_CSM63770, y una segunda sonda que hibrida específicamente con el ADN genómico del estándar interno del que se sabe que es una copia individual y homocigoto en la planta de soja. El método también incluye una reacción de amplificación de ADN que se realiza usando PCR (reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés) en tiempo real y determinando el valor umbral del número de ciclos (valores Ct) del amplicón correspondiente al alelo del evento de soja GM\_CSM63770 y la copia individual del estándar interno homocigoto. Luego de la amplificación, se puede calcular la diferencia ( $\Delta Ct$ ) entre el valor Ct del amplicón copia individual del estándar interno homocigoto, y el valor Ct del alelo del amplicón del evento de soja GM\_CSM63770. En una realización, se determina la cigosidad donde un  $\Delta Ct$  de aproximadamente cero (0) indica homocigosidad del ADN-T insertado del evento de soja GM\_CSM63770 y un  $\Delta Ct$  de aproximadamente uno (1) indica heterocigosidad del ADN-T insertado del evento de soja GM\_CSM63770. En ciertas realizaciones de este método, los pares de cebadores se seleccionan del grupo que consiste en SEQ ID NO:14 combinada con SEQ ID NO:15 y SEQ ID NO:17 combinada con SEQ ID NO:18; y donde las sondas son SEQ ID NO:16 y SEQ ID NO:19. En incluso otra realización de esta invención, el  $\Delta Ct$  de aproximadamente uno (1) que indica la heterocigosidad del ADN-T insertado del evento de maíz MON95275 está comprendido dentro del rango de 0,75 a 1,25. En ciertas realizaciones, un  $\Delta Ct$  de aproximadamente cero (0) puede ser aproximadamente 0, 0,05; 0,1; 0,15; 0,2 o 0,25; en otras realizaciones, un  $\Delta Ct$  de aproximadamente uno (1) puede ser aproximadamente 0,75; 0,8; 0,85; 0,9; 0,95; 1,0; 1,05; 1,1; 1,15; 1,2 o 1,25. En una realización adicional, un  $\Delta Ct$  de aproximadamente uno (1) puede estar comprendido dentro del rango de 0,75 a 1,25; 0,8 a 1,25; 0,85 a 1,25; 0,9 a 1,25; 0,95 a 1,25; 1,0 a 1,25; 1,05 a 1,25; 1,1 a 1,25; 1,15 a 1,25; 1,2 a 1,25; 0,75 a 1,2; 0,8 a 1,2; 0,85 a 1,2; 0,9 a 1,2; 0,95 a 1,2; 1,0 a 1,2; 1,05 a 1,2; 1,1 a 1,2; 1,15 a 1,2; 0,75 a 1,15; 0,8 a 1,15; 0,85 a 1,15; 0,9 a 1,15; 0,95 a 1,15; 1,0 a 1,15; 1,05 a 1,15; 1,1 a 1,15;

0,75 a 1,1; 0,8 a 1,1; 0,85 a 1,1; 0,9 a 1,1; 0,95 a 1,1; 1,0 a 1,1; 1,05 a 1,1; 0,75 a 1,05; 0,8 a 1,05; 0,85 a 1,05; 0,9 a 1,05; 0,95 a 1,05; 1,0 a 1,05; 0,75 a 1,0; 0,8 a 1,0; 0,85 a 1,0; 0,9 a 1,0; 0,95 a 1,0; 0,75 a 0,95; 0,8 a 0,95; 0,85 a 0,95; 0,9 a 0,95; 0,75 a 0,9; 0,75 a 0,85; 0,75 a 0,8; 0,8 a 0,9; 0,8 a 0,85 o 0,85 a 0,9.

**[0022]** Una realización adicional de la invención es un método para determinar la cigosidad de una planta de soja, semilla de soja, polen de soja, óvulo, o célula, en el cual cada uno de tales componentes biológicos de los que se sospecha que contienen ADN del evento de soja GM\_CSM63770 se somete al siguiente método: a) contactar una muestra que contiene ADN obtenido del componente biológico en cuestión con al menos dos conjuntos de cebadores diferentes, i) en los cuales un primer par de cebadores que consiste en un primer cebador y un segundo cebador diferente del primero, cuando se usan en una reacción de amplificación junto con ADN de soja, son capaces de producir un primer amplicón que es un diagnóstico o una característica de la presencia de ADN del evento de soja GM\_CSM63770 en la muestra, y ii) un segundo par de cebadores que consiste en el primer cebador y un tercer cebador diferente del primer cebador y del segundo cebador, que cuando se usan en una reacción de amplificación junto con ADN de soja, son capaces de producir un segundo amplicón que es un diagnóstico o una característica del ADN genómico nativo de soja que no contiene ni incluye ADN específico para el evento de soja GM\_CSM63770; b) realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico con la muestra y los dos pares de cebadores; c) detectar en la reacción de amplificación de ácido nucleico el primer amplicón que es un diagnóstico o una característica del evento de soja GM\_CSM63770, o el segundo amplicón que es un diagnóstico o una característica del ADN genómico nativo de soja que no comprende el evento de soja GM\_CSM63770, donde la presencia de solo el primer amplicón que es un diagnóstico o una característica de ADN homocigoto del evento de soja GM\_CSM63770 en una muestra, y la presencia de ambos, el primer amplicón y el segundo amplicón es un diagnóstico o una característica de una planta de soja heterocigota para el alelo del evento de soja GM\_CSM63770; o b) contactar una muestra que comprende ADN de soja con un conjunto de sondas que contiene al menos una primera sonda que hibrida específicamente con el ADN del evento de soja GM\_CSM63770 y al menos una segunda sonda que hibrida específicamente con el ADN genómico de soja a través del segmento de ADN cromosómico que fue interrumpido por la inserción del ADN heterólogo del evento de soja GM\_CSM63770 y que no hibrida con el ADN del evento de soja GM\_CSM63770; i) hibridar el conjunto de sondas con una muestra en condiciones rigurosas de hibridación, donde la detección de hibridación solo de la primera sonda en las condiciones

de hibridación es un diagnóstico o una característica de un alelo homocigoto de ADN del evento de soja GM\_CSM63770 en la muestra, y donde la detección de hibridación de ambas, la primera sonda y la segunda sonda en las condiciones de hibridación es un diagnóstico o una característica de un alelo heterocigoto del evento de soja GM\_CSM63770 en dicha muestra. En una realización de este método, el conjunto de pares de cebadores comprende SEQ ID NO:14 combinada con SEQ ID NO:15, y SEQ ID NO:20 combinada con SEQ ID NO:15. En otra realización de este método, el conjunto de sondas comprende SEQ ID NO:16 y SEQ ID NO:21.

**[0023]** Inclusive en otra realización de la invención se proporcionan plantas de soja, células de plantas, polen, partes de plantas y semillas que comprenden un constructo de ADN recombinante integrado en el cromosoma 19. El constructo de ADN recombinante confiere resistencia a especies de insectos lepidópteros plaga. El constructo de ADN recombinante está integrado en una posición de dicho cromosoma flanqueada por al menos 50 nucleótidos contiguos de SEQ ID NOs:11 o 36 y 50 nucleótidos contiguos de SEQ ID NOs:12 o 37. Los al menos 50 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:11 pueden comprender una o más secuencias de nucleótidos seleccionadas de SEQ ID NOs:118-137. Los al menos 50 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:36 pueden comprender una o más secuencias de nucleótidos seleccionadas de SEQ ID NOs:38-117. Los al menos 50 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:12 pueden comprender una o más secuencias de nucleótidos seleccionadas de SEQ ID NOs:138-157. Los al menos 50 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:37 pueden comprender una o más secuencias de nucleótidos seleccionadas de SEQ ID NOs:158-237.

**[0024]** Los aspectos precedentes y otros aspectos de la invención se tornarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada.

## **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

**[0025]** La Figura 1 es una ilustración que grafica la orientación y la alineación de los elementos/segmentos de ADN que están presentes dentro de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:10 representada en el dibujo como [10], que es la secuencia del ADN transgénico insertado y secuencias adyacentes 5' y 3' del genoma de soja presentes dentro del evento de soja GM\_CSM63770. SEQ ID NO:1 está representada por [1] y es un segmento de cincuenta (50) nucleótidos que abarca veinticinco (25) nucleótidos del ADN insertado y veinticinco (25) nucleótidos del segmento 5' arbitrariamente asignado de ADN cromosómico de soja adyacente al ADN insertado. SEQ ID NO:2 está representada por [2] y es un segmento de cincuenta (50)

nucleótidos que abarca veinticinco (25) nucleótidos del ADN insertado y veinticinco (25) nucleótidos del segmento 3' arbitrariamente asignado de ADN cromosómico de soja adyacente al ADN insertado. SEQ ID NO:1 está incrustada dentro de SEQ ID NO:3 representada por [3], que es un segmento de cien (100) nucleótidos que abarca cincuenta (50) nucleótidos del ADN insertado y cincuenta (50) nucleótidos del segmento 5' arbitrariamente asignado de ADN cromosómico de soja adyacente al ADN insertado. SEQ ID NO:2 está incrustada dentro de SEQ ID NO:4 representada por [4], que es un segmento de cien (100) nucleótidos que abarca cincuenta (50) nucleótidos del ADN insertado y cincuenta (50) nucleótidos del segmento 3' arbitrariamente asignado de ADN cromosómico de soja adyacente al ADN insertado. SEQ ID NO:5 está representada por [5], que tiene una longitud de doscientos (200) nucleótidos, y contiene SEQ ID NO:3, y abarca cien (100) nucleótidos del ADN insertado y cien (100) nucleótidos del segmento 5' arbitrariamente asignado de ADN cromosómico de soja adyacente al ADN insertado. SEQ ID NO:6 está representada por [6], que tiene una longitud de doscientos (200) nucleótidos, contiene SEQ ID NO:4, y abarca cien (100) nucleótidos del ADN insertado y cien (100) nucleótidos del segmento 3' arbitrariamente asignado de ADN cromosómico de soja adyacente al ADN insertado. [7] es representativo de SEQ ID NO:7 correspondiente a mil (1.000) nucleótidos consecutivos del ADN genómico de soja en el extremo 5' arbitrariamente asignado del ADN insertado, y ciento ochenta y un (181) nucleótidos consecutivos del ADN transgénico insertado adyacente. [8] es representativo de SEQ ID NO:8 correspondiente a mil (1.000) nucleótidos consecutivos de ADN genómico de soja adyacente en el extremo 3' arbitrariamente asignado del ADN insertado y ciento noventa y dos (192) nucleótidos consecutivos del extremo 3' arbitrariamente asignado del ADN insertado. [9] es representativo de SEQ ID NO:9 y es segmento de nucleótidos con longitud completa del ADN transgénico insertado. Las flechas y las etiquetas debajo de cada flecha representan la orientación de la dirección de transcripción y traducción, según corresponda, desde los elementos de expresión aplicables que están posicionados dentro de los dos casetes dentro del ADN insertado. RB y LB representan las posiciones de los bordes derecho e izquierdo del vector de transformación mediado por el doble borde de *Agrobacterium*, la letra P representa las posiciones de los elementos promotores en los respectivos constructos, la letra L representa las posiciones de las secuencias líder (regiones no traducidas 5', 5' UTR) en los respectivos constructos, la letra I representa la posición de la secuencia intrón en el respectivo constructo, la letra T representa las posiciones de las secuencias de terminación de transcripción (regiones no traducidas 3', 3' UTR) en los respectivos constructos. Los elementos desde una P a la T inmediatamente

siguiente representados en la ilustración gráfica en [9] y [10] representan un constructo. El constructo del lado izquierdo de la Figura 1 codifica una Cry1A.2 tóxica para plagas, y el constructo del lado derecho de la Figura 1 codifica una Cry1B.2. Cry1A.2 y Cry1B.2 son toxinas diferentes exclusivas, que exhiben menos de 45% de identidad de secuencia de aminoácidos entre sí, cada una de ellas es tóxica para las plagas de lepidópteros, y cada toxina exhibe un modo de acción diferente en relación con la otra. La posición dentro del ADN transgénico insertado de cada uno de los elementos genéticos involucrados en la expresión de estas toxinas proteicas respectivamente se especifican en la Tabla 1. [11] representa SEQ ID NO:11 e ilustra la posición del ADN genómico de soja que flanquea el extremo 5' del ADN insertado. [12] representa SEQ ID NO:12 e ilustra la posición del ADN genómico de soja que flanquea el extremo 3' del ADN insertado. [14] representa SEQ ID NO:14 o al cebador SQ13805. [15] representa SEQ ID NO:15 o al cebador SQ51400. Están descriptos para su uso en conjunto, como un par de cebadores que se puede aplicar a una muestra que contiene ADN del evento GM\_CSM63770 que, cuando se usa en una reacción de amplificación térmica, produce un amplicón de ciento treinta y cuatro (134) nucleótidos que contiene el extremo 3' de unión inserto/genoma, las flechas muestran la posición aproximada de hibridación [10] y la dirección en la cual prosigue la transcripción durante los ciclos de amplificación. [16] representa SEQ ID NO:16 o la sonda PB4832, que se une (o hibrida) un amplicón producido, por ejemplo, usando juntos el cebador [14] y [15] en una reacción de amplificación con ADN del evento de soja GM\_CSM63770 como molde, para detectar la presencia de ADN del evento de soja GM\_CSM63770 en una muestra. [20] representa SEQ ID NO:20 o el cebador GM\_WT63770F. [20] es un cebador que se une (o hibrida) al ADN genómico de soja que es adyacente 5' al ADN insertado, y cuando se combina con [15] (SEQ ID NO:15, cebador SQ51400) en una reacción de amplificación térmica junto con ADN de soja convencional como molde que carece o está desprovisto de ADN del evento de soja GM\_CSM63770, produce un amplicón de ciento treinta y seis (136) nucleótidos que contiene ADN genómico de soja sin rupturas, y la detección de ese amplicón es representativa de una muestra que no contiene ADN del evento transgénico de soja GM\_CSM63770 en el locus cromosómico. La sonda GM\_WT63770PB (SEQ ID NO:21) es representativa de una sonda que se uniría (o hibridaría) al amplicón producido usando los cebadores [20] y [15], para detectar la falta de un alelo, o la ausencia de ADN del evento GM\_CSM63770. La sonda GM\_WT63770PB hibrida con los 9 nucleótidos del terminal 3' del ADN genómico flanqueante 5', los 14 nucleótidos del ADN alélico de tipo silvestre que se eliminó durante la inserción del ADN-T en el evento de soja

GM\_CSM63770, y a los 2 nucleótidos del terminal 5' del ADN genómico 3' que flanquea el ADN correspondiente al ADN transgénico insertado descrito en la presente como evento GM\_CSM63770.

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS**

**[0026]** SEQ ID NO:1 es una secuencia de 50 nucleótidos que representa la región de unión 5' del ADN genómico de soja y el casete de expresión transgénico integrado (ADN genómico de soja de 25 nucleótidos en el extremo 5' de SEQ ID NO:1, ADN transgénico insertado de 25 nucleótidos en el extremo 3' de SEQ ID NO:1), y se puede identificar dentro de SEQ ID NO:10 en las posiciones de nucleótidos 976-1.025.

**[0027]** SEQ ID NO:2 es una secuencia de 50 nucleótidos que representa la región de unión 3' del casete de expresión transgénico integrado y el ADN genómico de soja (ADN transgénico insertado de 25 nucleótidos en el extremo 5' de SEQ ID NO:2, ADN genómico de soja de 25 nucleótidos en el extremo 3' de SEQ ID NO:2), y se puede identificar dentro de SEQ ID NO:10 en las posiciones de nucleótidos 13.216-13.265.

**[0028]** SEQ ID NO:3 es una secuencia de 100 nucleótidos que representa la región de unión 5' del ADN genómico de soja y el casete de expresión transgénico integrado (ADN genómico de soja de 50 nucleótidos en el extremo 5' de SEQ ID NO:3, ADN transgénico insertado de 50 nucleótidos en el extremo 3' de SEQ ID NO:3), y se puede identificar dentro de SEQ ID NO:10 en las posiciones de nucleótidos 951-1.050.

**[0029]** SEQ ID NO:4 es una secuencia de 100 nucleótidos que representa la región de unión 3' del casete de expresión transgénico integrado y el ADN genómico de soja (ADN transgénico insertado de 50 nucleótidos en el extremo 5' de SEQ ID NO:4, ADN genómico de soja de 50 nucleótidos en el extremo 3' de SEQ ID NO:4), y se puede identificar dentro de SEQ ID NO:10 en las posiciones de nucleótidos 13.191-13.290.

**[0030]** SEQ ID NO:5 es una secuencia de 200 nucleótidos que representa la región de unión 5' del ADN genómico de soja y el casete de expresión transgénico integrado (ADN genómico de soja de 100 nucleótidos en el extremo 5' de SEQ ID NO:5, ADN transgénico insertado de 100 nucleótidos en el extremo 3' de SEQ ID NO:5), y se puede identificar dentro de SEQ ID NO:10 en las posiciones de nucleótidos 901-1.100.

**[0031]** SEQ ID NO:6 es una secuencia de 200 nucleótidos que representa la región de unión 3' del casete de expresión transgénico integrado y el ADN genómico de soja (ADN transgénico insertado de 100 nucleótidos en el extremo 5' de SEQ ID NO:6, ADN genómico de soja de 100

nucleótidos en el extremo 3' de SEQ ID NO:6), y se puede identificar dentro de SEQ ID NO:10 en las posiciones de nucleótidos 13.141-13.340.

**[0032]** SEQ ID NO:7 es una secuencia de 1.181 nucleótidos que representa la región de unión 5' del ADN genómico de soja y el casete de expresión transgénico integrado (ADN transgénico insertado de 1.000 nucleótidos en el extremo 5' de SEQ ID NO:7, ADN genómico de soja de 181 nucleótidos en el extremo 3' de SEQ ID NO:7), y se puede identificar dentro de SEQ ID NO:10 en las posiciones de nucleótidos 1-1, 181.

**[0033]** SEQ ID NO:8 es una secuencia de 1.192 nucleótidos que representa la región de unión 3' del casete de expresión transgénico integrado y el ADN genómico de soja (ADN transgénico insertado de 192 nucleótidos en el extremo 5' de SEQ ID NO:6, ADN genómico de soja de 1.000 nucleótidos en el extremo 3' de SEQ ID NO:6), y se puede identificar dentro de SEQ ID NO:10 en las posiciones de nucleótidos 13.049-14.240.

**[0034]** SEQ ID NO:9 es una secuencia de 12.240 nucleótidos correspondiente al ADN-T transgénico insertado del evento de soja GM\_CSM63770, y se puede identificar dentro de SEQ ID NO:10 en las posiciones de nucleótidos 1.001-13.240.

**[0035]** SEQ ID NO:10 es una secuencia de 14.240 nucleótidos correspondiente a la secuencia de nucleótidos contigua de la secuencia de nucleótidos de ADN genómico flanqueante 5', la secuencia de nucleótidos de ADN-T insertado en el evento GM\_CSM63770, y la secuencia de nucleótidos de ADN genómico flanqueante 3'; e incluye SEQ ID NO:11 (nucleótidos 1-1.000), SEQ ID NO:9 (nucleótidos 1.001-13.240) y SEQ ID NO:12 (nucleótidos 13.241-14.240).

**[0036]** SEQ ID NO:11 es una secuencia de 1.000 nucleótidos que representa el ADN genómico de soja flanqueante 5' hasta el ADN-T insertado, y se puede identificar dentro de SEQ ID NO:10 en las posiciones de nucleótidos 1-1.000.

**[0037]** SEQ ID NO:12 es una secuencia de 1.000 nucleótidos que representa el ADN genómico de soja flanqueante 3' después del ADN-T insertado, y se puede identificar dentro de SEQ ID NO:10 en las posiciones de nucleótidos 13.241-14.240.

**[0038]** SEQ ID NO:13 es una secuencia de 12.629 nucleótidos que representa el casete transgénico comprendido dentro del vector de transformación plasmídico binario usado para transformar soja para producir el evento de soja GM\_CSM63770.

**[0039]** SEQ ID NO:14 es una secuencia de 26 nucleótidos correspondiente a un cebador de amplificación térmica denominado SQ13805 el cual se puede usar para identificar ADN del evento de soja GM\_CSM63770 en una muestra, y es idéntica a la secuencia de nucleótidos correspondiente a las posiciones 13.177-13.202 de SEQ ID NO:10.

**[0040]** SEQ ID NO:15 es una secuencia de 31 nucleótidos correspondiente a un cebador de amplificación térmica denominado SQ51400 el cual se puede usar para identificar ADN del evento de soja GM\_CSM63770 en una muestra, y es idéntica al complemento inverso de la secuencia de nucleótidos correspondiente a las posiciones 13.280-13.310 de SEQ ID NO:10.

**[0041]** SEQ ID NO:16 es una secuencia de 16 nucleótidos correspondiente a un cebador denominado PB4832 usado para identificar ADN del evento de soja GM\_CSM63770 en una muestra, y es idéntica a la secuencia de nucleótidos correspondiente a las posiciones 13.204-13.219 de SEQ ID NO:10.

**[0042]** SEQ ID NO:17 es una secuencia de 20 nucleótidos correspondiente a un cebador de amplificación térmica denominado SQ549 usado como un control interno para el evento y el ensayo de cigosidad del evento de soja GM\_CSM63770 e hibrida con una región del genoma de soja.

**[0043]** SEQ ID NO:18 es una secuencia de 20 nucleótidos correspondiente a un cebador de amplificación térmica denominado SQ546 usado como un control interno para el evento y el ensayo de cigosidad del evento de soja GM\_CSM63770 e hibrida con una región del genoma de soja.

**[0044]** SEQ ID NO:19 es una secuencia de 28 nucleótidos correspondiente a una sonda denominada PB0004 usada como un control interno para el evento y el ensayo de cigosidad del evento de soja GM\_CSM63770 e hibrida con una región del genoma de soja.

**[0045]** SEQ ID NO:20 es una secuencia de 25 nucleótidos correspondiente a un cebador de amplificación térmica denominado GM\_WT63770F usado en el ensayo de cigosidad del evento de soja GM\_CSM63770 e hibrida con el ADN genómico flanqueante 5', y es idéntica a la secuencia de nucleótidos correspondiente a las posiciones 949-971 de SEQ ID NO:10.

**[0046]** SEQ ID NO:21 es una secuencia de 25 nucleótidos correspondiente a una sonda denominada GM\_WT63770PB usada en el ensayo de cigosidad del evento de soja GM\_CSM63770 e hibrida con los 9 últimos nucleótidos del ADN genómico flanqueante 5', los 14 nucleótidos del ADN alélico de tipo silvestre eliminado durante la inserción del ADN-T en el evento de soja GM\_CSM63770, y los 2 primeros nucleótidos del ADN genómico flanqueante 3'.

**[0047]** SEQ ID NO:22 es una secuencia de 27 nucleótidos correspondiente a un sitio de reconocimiento de ARN guía originador (OgRRS), OgRRS\_5-1 que comprende un sitio de motivo adyacente protoespaciador (PAM) para Cas12a operativamente enlazado con un sitio de hibridación de ARN guía.

**[0048]** SEQ ID NO:23 es una secuencia de 27 nucleótidos correspondiente a un OgRRS, OgRRS\_5-2.

**[0049]** SEQ ID NO:24 es una secuencia de 27 nucleótidos correspondiente a un OgRRS, OgRRS\_5-3.

**[0050]** SEQ ID NO:25 es una secuencia de 27 nucleótidos correspondiente a un OgRRS, OgRRS\_3-1.

**[0051]** SEQ ID NO:26 es una secuencia de 27 nucleótidos correspondiente a un OgRRS, OgRRS\_In-1.

**[0052]** SEQ ID NO:27 es una secuencia de 27 nucleótidos correspondiente a un OgRRS, OgRRS\_In-2.

**[0053]** SEQ ID NO:28 es una secuencia de 51 nucleótidos correspondiente a un ARN guía (ARNg), ARNg\_OgRRS\_5-1.

**[0054]** SEQ ID NO:29 es una secuencia de 51 nucleótidos correspondiente a un ARNg, ARNg\_OgRRS\_5-2.

**[0055]** SEQ ID NO:30 es una secuencia de 51 nucleótidos correspondiente a un ARNg, ARNg\_OgRRS\_5-3.

**[0056]** SEQ ID NO:31 es una secuencia de 51 nucleótidos correspondiente a un ARNg, ARNg\_OgRRS\_3-1.

**[0057]** SEQ ID NO:32 es una secuencia de 51 nucleótidos correspondiente a un ARNg, ARNg\_OgRRS\_In-1.

**[0058]** SEQ ID NO:33 es una secuencia de 51 nucleótidos correspondiente a un ARNg, ARNg\_OgRRS\_In-2.

**[0059]** SEQ ID NO:34 es una secuencia de una secuencia codificadora de ADN sintético diseñada para expresión en una célula vegetal que codifica una proteína asociada a CRISPR Cas12a de localización nuclear.

**[0060]** SEQ ID NO:35 es una secuencia de aminoácidos de una proteína asociada a CRISPR Cas12a de localización nuclear.

**[0061]** SEQ ID NO:36 es una secuencia de 5.000 nucleótidos que representa el ADN genómico de soja que flanquea al inserto transgénico en el extremo 5' del inserto. Los nucleótidos 4.001-5.000 de SEQ ID NO:36 son idénticos a los nucleótidos 1-1.000 de SEQ ID NO:11.

**[0062]** SEQ ID NO:37 es una secuencia de 5.000 nucleótidos que representa el ADN genómico de soja que flanquea al inserto transgénico en el extremo 3' del inserto. Los nucleótidos 1-1.000 de SEQ ID NO:99 son idénticos a los nucleótidos 1-1.000 de SEQ ID NO: 12. Los

restantes nucleótidos de SEQ ID NO:99 (nucleótidos 1.001-5.000) están basados en la secuencia genómica del cultivar de soja Williams 82.

**[0063]** SEQ ID NOs:38-117 son una secuencia de 50 nucleótidos adicionales en la secuencia genómica flanqueante 5' del evento GM\_CSM63770 basada en la secuencia genómica del cultivar de soja Williams 82.

**[0064]** SEQ ID NOs:118-137 son una secuencia de 50 nucleótidos en la secuencia genómica flanqueante 5' del evento GM\_CSM63770.

**[0065]** SEQ ID NOs:138-157 son una secuencia de 50 nucleótidos en la secuencia genómica flanqueante 3' del evento GM\_CSM63770.

**[0066]** SEQ ID NOs:158-237 son una secuencia de 50 nucleótidos adicionales en la secuencia genómica flanqueante 3' del evento GM\_CSM63770 basada en la secuencia genómica del cultivar de soja Williams 82.

### DESCRIPCIÓN DETALLADA

**[0067]** La presente invención proporciona un evento de soja transgénico GM\_CSM63770 que logra control insecticida sobre ciertas plagas de larvas de lepidópteros de soja mediante la expresión de toxinas insecticidas Cry1A.2 y Cry1B.2, que están disponibles en los tejidos de las plantas de soja que contienen este evento y se presentan a las plagas de larvas cuando estas consumen los tejidos de la planta. Específicamente, la expresión de las proteínas inhibidoras de insectos Cry1A.2 y Cry1B.2 en el evento de soja GM\_CSM63770 proporciona resistencia a las formas larvales de los insectos lepidópteros plaga gusano elotero de la soja (SPW, *Helicoverpa zea*), gusano falso medidor de la soja (*Chrysodeixis includens*), gusano terciopelo de las leguminosas (*Anticarsia gemmatalis*), oruga militar del sur (*Spodoptera eridania*), oruga militar negra (*Spodoptera cosmioides*), oruga bolillera sudamericana (*Helicoverpa gelotopoeon*), oruga medidora del girasol (*Rachiplusia nu*), polilla del brote del poroto (*Crociosema aporema*), gusano verde del trébol (*Hypena scabra*) y barrenador menor del tallo (*Elasmopalpus lignosellus*). El evento GM\_CSM63770 satisface una necesidad no resuelta en la técnica para el control de estos insectos en el mercado de la soja, dado que las especies lepidópteras han comenzado a desarrollar resistencia ante las proteínas para el control de plagas usadas en versiones anteriores de plantas de soja transgénicas que expresan tales proteínas de protección ante lepidópteros, y los insecticidas químicos no han proporcionado el control adecuado de estos insectos y a veces se requieren múltiples aplicaciones de productos químicos durante la temporada de cultivo, aumentando la incorporación de plaguicidas químicos al

medioambiente, aumentado la huella de carbono con cada aplicación, y agregando un costo significativo a la producción del cultivo de soja.

**[0068]** La protección frente a la infestación por especies lepidópteras que se proporciona con el evento GM\_CSM63770 surge en conexión con la expresión de un segmento de ADN que codifica dos proteínas insecticidas diferentes específicas para lepidópteros que están operativa y covalentemente enlazadas dentro del ADN transgénico insertado que en parte define el evento de soja GM\_CSM63770. Las dos proteínas insecticidas codificadas por el ADN transgénico insertado en el evento de soja GM\_CSM63770 son i) Cry1A.2 (Patente de los EE.UU. 10.494.408, la secuencia de aminoácidos a la que se hace referencia en la presente como SEQ ID NO:4, y la secuencia codificadora como SEQ ID NO:3), y ii) Cry1B.2 (Patente de los EE.UU. 10.669.3017 [sic], la secuencia de aminoácidos a la que se hace referencia en la presente como SEQ ID NO:10, y la secuencia codificadora como SEQ ID NO:9). Estas dos proteínas insecticidas se describen en la presente como estando expresadas por dos casetes de expresión diferentes, pero enlazados, dentro del constructo de ADN transgénico insertado como se establece en la presente en SEQ ID NO:9 y como se ilustra en la Figura 1.

**[0069]** La secuencia de ADN que codifica la proteína Cry1A.2 en el evento de soja GM\_CSM63770 está operativamente enlazada con un promotor de ubiquitina 10 de *Arabidopsis thaliana*, líder, e intrón. La secuencia de ADN que codifica la proteína Cry1B.2 en el evento de soja GM\_CSM63770 está operativamente enlazada con un promotor y líder del gen 13 de una proteína de unión a clorofila a-b de *Cucumis melo* (Patente de los EE.UU. 10.443.066, denominada en la presente SEQ ID NOs:4-6). La expresión (transcripción en los ARNm que codifican las secuencias de aminoácidos de la toxina y la traducción de los ARNm en las toxinas proteicas) de las toxinas proteicas Cry1A.2 y Cry1B.2 desde sus respectivos casetes transgénicos está orientada en la misma dirección (cabeza a cola/cabeza a cola). La Figura 1 muestra las posiciones relativas de cada elemento - promotor (P), UTR 5' o líder (L), intrón (I), secuencia codificadora de toxina u ORF (marco abierto de lectura), y UTR 3' (T), estando el ORF para Cry1A.2, y el ORF para Cry1B.2 comprendidos dentro de SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10, respectivamente.

**[0070]** Como se describe en la presente, se evaluaron numerosos constructos que variaron con respecto al uso de los elementos de expresión, las secuencias codificadoras de toxinas, y la orientación de la transcripción y la traducción. Se emplearon ciento veinticinco (125) constructos, que comprendían uno o más de veintiuna (21) secuencias de codificación de toxinas para insectos diferentes, para generar eventos para ensayo, lo cual condujo a la

selección del evento de soja GM\_CSM63770. El constructo usado para crear el evento de soja GM\_CSM63770, presentado en la presente como SEQ ID NO:13, proporcionó un desempeño superior en relación con otros constructos cuando se evaluó para determinar la resistencia de las correspondientes plantas de soja transgénicas contra la infestación de insectos lepidópteros plaga. Además, el evento de soja GM\_CSM63770 está libre de los marcadores usados para la selección de las células vegetales transformadas como resultado del método de transformación usado que aseguró que los marcadores seleccionables y los rasgos pretendidos se integraran y fueran capaces de segregarse entre sí mediante selección por mejoramiento. El evento de soja GM\_CSM63770 fue transformado con un vector binario de transformación vegetal con dos ADN-T, donde los casetes de selección estaban comprendidos en un ADN-T separado del ADN-T que comprendía los casetes de expresión transgénicos de la toxina insecticida retenidos en el evento de soja GM\_CSM63770. Luego de la autopolinización de las plantas de soja transformadas de la generación R<sub>0</sub>, se seleccionó la progenie R<sub>1</sub> para detectar la presencia del ADN-T que comprendía los casetes de expresión de toxina insecticida y la ausencia del ADN-T usado para la selección del evento de transformación inicial.

**[0071]** Se creó el evento de soja GM\_CSM63770 mediante técnicas de transformación vegetal usadas para insertar ADN heterólogo (también conocido como ADN transgénico) aleatoriamente en un cromosoma del genoma de una célula de soja para producir una célula de soja modificada genéticamente, también denominada célula de soja “transgénica” o “recombinante”. Usando esta técnica, se transforman numerosas células individuales, resultando esta técnica en un “evento transgénico” o “evento” debido a la inserción aleatoria del ADN foráneo en el genoma. Luego, se regenera una planta transgénica a partir de cada célula transgénica individual. Esto resulta en que cada célula de la planta transgénica contiene el evento transgénico insertado exclusivo como una parte estable de su genoma. Esta planta transgénica luego se puede usar para producir semillas las cuales luego se plantan y se cultivan obteniendo plantas de progenie, cada una de las cuales contiene el evento transgénico exclusivo.

**[0072]** El evento de soja GM\_CSM63770 se produjo mediante un proceso de transformación mediado por *Agrobacterium* usando el constructo plasmídico de transformación binario GM\_CSM63770 y explantes de plantas de soja extirpados y secados. Este constructo plasmídico contiene dos regiones, cada una limitada por segmentos de bordes de *Agrobacterium* (segmento de ADN-T). El primer segmento de ADN-T contiene dos casetes de expresión vegetal enlazados, un casete de expresión codifica un marcador seleccionable y un

casete de expresión codifica un marcador puntuable. El segundo segmento de ADN-T contiene dos casetes de expresión vegetal enlazados con los elementos genéticos reguladores necesarios para la expresión en células de plantas de soja de dos proteínas insecticidas diferentes, Cry1A.2 y Cry1B.2. El segmento de ADN-T contiene genes marcadores de selección/puntuables insertados aleatoriamente en el genoma de soja y en un sitio separado del sitio de integración del segmento de ADN-T que contiene los casetes de expresión de Cry1A.2 y Cry1B.2, permitiendo así la segregación de los dos segmentos de ADN-T dentro del genoma de las plantas transformadas durante un proceso de autofertilización y/o retrocruzamiento, por ejemplo, detección de R<sub>1</sub> y generaciones superiores de plantas transgénicas. Las células de soja transformadas fueron regeneradas en plantas de soja intactas y se seleccionaron plantas individuales de la población de plantas que mostraron integridad del segundo segmento de ADN-T que codificaba las proteínas Cry1A.2 y Cry1B.2. En R<sub>1</sub> y en generaciones subsiguientes, se seleccionaron los eventos sobre la base de la integridad, estabilidad e integridad del segmento de ADN-T que codificaba las proteínas Cry1A.2 y Cry1B.2, en ausencia (es decir, segregación) de i) el segmento de ADN-T que codificaba los casetes marcadores seleccionables/puntuables, y ii) cualquier secuencia plasmídica estructural. Se realizó una selección adicional sobre la base de la localización del segmento de ADN-T que codificaba las proteínas Cry1A.2 y Cry1B.2 dentro del genoma de soja y otras características tales como eficacia y características agronómicas. La expresión de las toxinas proteicas insecticidas Cry1A.2 y Cry1B.2 en las células del evento de soja GM\_CSM63770 confiere resistencia a insectos lepidópteros plaga cuando se proporcionan en la dieta de los insectos las células de soja del evento GM\_CSM63770.

**[0073]** El segmento ADN-T que codifica las proteínas Cry1A.2 y Cry1B.2 en el constructo plasmídico pM63770 se presenta como SEQ ID NO:13. Durante la integración, doscientos diecisiete (217) y ciento sesenta y nueve (169) pares de bases (pb) contiguos fueron eliminados de los bordes derecho e izquierdo, respectivamente. Además, durante el proceso de integración, se eliminaron catorce (14) pares de bases (pb) contiguos del ADN genómico de tipo silvestre en el punto de inserción del ADN transgénico.

**[0074]** Como se describe específicamente en la presente, el evento de soja GM\_CSM63770 se produjo mediante un complejo proceso de investigación y desarrollo en el cual: 1) se desarrollaron y transformaron en células de soja más de cien constructos de vectores plasmídicos – que variaron con respecto a las secuencias codificadoras para las proteínas insecticidas, las secuencias codificadoras para los elementos reguladores de transcripción, y el

número y la orientación de los casetes dentro de los constructos – para crear miles de eventos que fueron ensayados y analizados, dando por resultado la selección del constructo usado para generar el evento GM\_CSM63770; 2) se transformaron miles de células de soja con el constructo usado para generar el evento GM\_CSM63770, creando una población de plantas transgénicas en la cual cada planta contenía un evento transgénico exclusivo que fue regenerado y ensayado; 3) el evento final GM\_CSM63770 fue seleccionado luego de rigurosos procesos de selección a lo largo de años, que implicaron el ensayo y análisis de características moleculares, eficacia, expresión de proteínas, y propiedades agronómicas en una variedad de caracterizaciones genéticas de soja. El evento de soja GM\_CSM63770 fue así producido y seleccionado como un evento superior y exclusivo útil a los fines agronómicos de amplia escala.

**[0075]** El ADN transgénico insertado en el genoma del evento de soja GM\_CSM63770 fue caracterizado mediante un detallado análisis molecular. Este análisis incluyó: el número de inserción (número de sitios de integración dentro del genoma de soja), la localización de la inserción genómica (el sitio específico en el genoma de soja donde se produjo la inserción), el número de copias (el número de copias del ADN-T dentro de un locus), y la integridad (ausencia de realineamientos) del ADN transgénico insertado. El análisis molecular detallado demostró que el ADN-T integrado que contenía los casetes de expresión para Cry1A.2 y Cry1B.2 permaneció intacto después de la integración y el ADN-T que comprendía los marcadores seleccionables/puntuables estaba ausente. Como se usa en la presente, un “casete de expresión” o “casete” es una molécula de ADN recombinante que comprende una combinación de elementos distintos que se han de expresar mediante una célula transformada. La Tabla 1 proporciona una lista de los elementos contenidos en SEQ ID NO:10, la secuencia de ADN que corresponde al evento de soja GM\_CSM63770.

**Tabla 1. Descripción del evento de soja GM\_CSM63770.**

| Elementos            | Posición en SEQ ID NO:10 | Descripción                                                                                    |
|----------------------|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ADN flanqueante 5'   | 1-1.000                  | Secuencia de ADN que flanquea el extremo 5' del inserto transgénico.                           |
| Región borde derecho | 1.001-1.068              | Región de ADN de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> que contiene la secuencia del borde derecho. |
| P-At.Ubq10-1:1:1     | 1.182-2.010              | El promotor de un gen poliubiquitina (UBQ10) de <i>Arabidopsis thaliana</i> (berro de thale).  |

| Elementos              | Posición en SEQ ID NO:10 | Descripción                                                                                                                                                                        |
|------------------------|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| L-At.Ubq10-1:1:1       | 2.011-2.077              | La región no traducida 5' de un gen poliubiquitina (UBQ10) de <i>Arabidopsis thaliana</i> (berro de thale).                                                                        |
| I-At.Ubq10:3           | 2.078-2.383              | El intrón para un gen poliubiquitina (UBQ10) de <i>Arabidopsis thaliana</i> (berro de thale).                                                                                      |
| Cry1A.2                | 2.393-5.962              | Secuencia codificadora de una toxina insecticida quimérica que comprende el dominio 1 de Cry1Ah, el dominio 2 de Cry1Ac, el dominio 3 de Cry1Ca, y el dominio protoxina de Cry1Ac. |
| T-Mt.Zfp-1:2:1         | 5.971-6.570              | La región no traducida 3' para una proteína putativa dedos de cinc tipo CCCH de <i>Medicago truncatula</i> (trébol barril).                                                        |
| P-CUCme.CipLhcb:1      | 6.673-8.571              | El promotor para una proteína de unión a clorofila a/b LHCII tipo III de <i>Cucumis melo</i> (melón).                                                                              |
| L-CUCme.CipLhcb:1      | 8.572-8.673              | La región no traducida 5' para una proteína de unión a clorofila a/b LHCII tipo III de <i>Cucumis melo</i> (melón).                                                                |
| Cry1B.2                | 8.677-12.240             | Secuencia codificadora de una toxina insecticida quimérica que comprende los dominios 1 de 2 de Cry1Be, el dominio 3 de Cry1Ka, y un dominio protoxina de Cry1Ab.                  |
| T-Mt.Lox-1-1:2:1       | 12.241-12.740            | La región 3' no traducida de un gen lipoxigenasa de <i>Medicago truncatula</i> (trébol barril).                                                                                    |
| Región borde izquierdo | 12.971-13.240            | Región de ADN de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> que contiene la secuencia del borde izquierdo.                                                                                   |
| ADN flanqueante 3'     | 13.241-14.240            | Secuencia de ADN que flanquea el extremo 3' del inserto transgénico.                                                                                                               |

[0076] El evento de soja GM\_CSM63770 está caracterizado como un inserto del ADN transgénico considerado en un locus individual en el genoma de soja, que resulta en dos nuevos loci o secuencias de unión (por ejemplo, secuencias establecidas en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:8) entre el ADN insertado y el ADN genómico de soja de las que se sabe que no aparecen naturalmente en el genoma de soja u otros eventos transgénicos de soja – estas son exclusivas del ADN de soja que contiene el evento GM\_CSM63770. Estas secuencias de unión son útiles para detectar la presencia del evento en células de soja, tejidos de soja, semillas de soja, polen

de soja y óvulos, y plantas de soja o productos de plantas de soja, tales como productos básicos de soja. En la presente se describen las sondas moleculares de ADN y los pares de cebadores que se han desarrollado para usar en la identificación de la presencia de estos diversos segmentos de unión en muestras biológicas que contienen o se sospecha que contienen células de soja, semillas de soja, partes de plantas de soja, polen de soja u óvulos, o tejido de plantas de soja que contienen el evento GM\_CSM63770.

**[0077]** Se considera que una muestra se refiere a una composición que es proteína o ADN de soja sustancialmente puro, o una composición que contiene proteína o ADN de soja. Con respecto a una muestra que contiene ADN, la muestra es una muestra biológica, es decir, contiene materiales biológicos, inclusive, entre otros, ADN obtenido o derivado, ya sea directa o indirectamente, del genoma del evento de soja GM\_CSM63770. “Directamente” se refiere a la capacidad del experto en la técnica para obtener ADN directamente del genoma de soja mediante la fractura de células de soja (o mediante la obtención de muestras de soja que contienen células de soja fracturadas) y la exposición del ADN genómico a los fines de la detección. “Indirectamente” se refiere a la capacidad del experto en la técnica para obtener el ADN específico o diana de referencia, es decir, un segmento de unión novedoso y exclusivo descrito en la presente que es un diagnóstico o una característica de la presencia del evento de soja GM\_CSM63770 en una muestra en particular, por medios distintos de la vía directa fracturando células de soja u obteniendo una muestra de soja que contiene células de soja fracturadas. Dichos medios indirectos incluyen, entre otros, amplificación de un segmento de ADN que contiene la secuencia de ADN de localización para una sonda particular diseñada para unirse con especificidad a la secuencia diana, o amplificación de un segmento de ADN que se puede medir y caracterizar, es decir, medir mediante la separación de otros segmentos de ADN a través de alguna matriz eficiente tal como agarosa o acrilamida en gel o similar, o caracterización mediante análisis directo de secuencias de los amplicones, o clonación del amplicón en un vector y secuenciación directa del amplicón insertado presente dentro de tal vector.

**[0078]** Una muestra de proteína pura de soja o una composición que contiene proteína de soja es una muestra biológica, es decir, contiene materiales biológicos, inclusive, entre otros, proteína obtenida o derivada de tejidos o células del evento de soja GM\_CSM63770. La muestra es contactada con anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a Cry1A.2 y Cry1B.2 en un inmunoensayo. La detección de las proteínas unidas es un diagnóstico o una característica del evento de soja GM\_CSM63770. El método de inmunoensayo puede ser, entre

otros, un ELISA (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas), un radioinmunoensayo, o un ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral. Los ensayos ELISA se realizan generalmente en el laboratorio usando muestras de tejido o células obtenidas de plantas completas, o partes de plantas. Los ensayos ELISA sándwich se usan frecuentemente para detectar y cuantificar proteína de cultivos transgénicos. Para detectar la presencia del evento de soja GM\_CSM63770 en una muestra usando un ensayo ELISA sándwich, se usan anticuerpos monoclonales, un primer anticuerpo monoclonal que se une específicamente a Cry1A.2 y un segundo anticuerpo que se une específicamente a Cry1B.2. Una cantidad conocida de anticuerpo monoclonal se une a una superficie fija. Los sitios no específicos sobre la superficie sólida se bloquean con albúmina de suero bovino, caseína o cualquier otra solución neutra. Se aplica en la placa la muestra que contiene proteína derivada del evento de soja GM\_CSM63770 y es capturada por el anticuerpo. Los antígenos que no se unieron se eliminan mediante lavado con una solución de lavado. Se añade un anticuerpo secundario que también es conjugado con una enzima. Los anticuerpos que no se unieron se eliminan mediante lavado. Se añade un sustrato, y la enzima reacciona con el sustrato y produce un producto, generalmente un pigmento o fotones, que es proporcional a la cantidad de antígeno presente. Se realizan ensayos ELISA separados para cada una de las dos toxinas proteicas en una muestra derivada del evento de soja GM\_CSM63770. Una reacción ELISA positiva es un diagnóstico o una característica del evento de soja GM\_CSM63770.

**[0079]** En el campo en el cual no están disponibles instalaciones de laboratorio para inmunoensayos más complejos, se pueden usar ensayos inmunocromatográficos de flujo lateral, también conocidos como tiras de inmunocromatografía (ICS) o tiras reactivas. La tira de ensayo de inmunocromatografía está compuesta por una almohadilla para la muestra, almohadilla para el conjugado, membrana de nitrocelulosa, almohadilla absorbente, y tarjeta soporte. Un primer anticuerpo monoclonal que se une específicamente a Cry1A.2, un segundo anticuerpo monoclonal que se une específicamente a Cry1B.2 y un anticuerpo IgG que se une a los anticuerpos derivados de las células hospederas del organismo en el cual se derivaron el primer y el segundo anticuerpo monoclonal se transfieren a la membrana de nitrocelulosa para formar la línea de ensayo 1 (Cry1A.2), la línea de ensayo 2 (Cry1B.2) y la línea de control (anticuerpo IgG anti-hospedero). La almohadilla para el conjugado es recubierta con el primer y el segundo anticuerpo monoclonal etiquetados con nanopartículas de oro coloidal. La membrana transferida, la almohadilla para el conjugado, la almohadilla para la muestra y la almohadilla absorbente se ensamblan secuencialmente sobre el tablero plástico de apoyo. Las

proteínas Cry1A.2 y Cry1B.2 presentes en una muestra derivada del evento de soja GM\_CSM63770 se combinarán con sus respectivos anticuerpos monoclonales etiquetados con oro y luego se unirán con anticuerpos de captura con los que se recubrió la línea de ensayo 1 y la línea de ensayo 2. La detección visual de la línea de ensayo 1 y la línea de ensayo 2 es un diagnóstico o una característica del evento de soja GM\_CSM63770.

**[0080]** El análisis molecular detallado también demostró que el evento GM\_CSM63770 contiene una sola inserción de ADN-T con una copia de cada uno de los casetes de expresión de Cry1A.2 y Cry1B.2. No se identificaron en el evento GM\_CSM63770 elementos adicionales del constructo de transformación, más allá de porciones de las regiones de los bordes izquierdo y derecho de *Agrobacterium tumefaciens* usadas para la transferencia de ADN transgénico desde el plásmido para transformación vegetal hacia el genoma de soja. Asimismo, se realizó amplificación térmica para producir amplicones específicos que fueran un diagnóstico o una característica de la presencia del evento GM\_CSM63770 en una muestra y análisis de secuencias de ADN para determinar las uniones entre el inserto y el genoma vegetal 5' y 3' arbitrariamente asignadas, confirmar la organización de los elementos dentro del inserto y determinar la secuencia completa de ADN del ADN transgénico insertado (SEQ ID NO:19). SEQ ID NO:11 es una secuencia que representa los mil (1.000) pares de bases (pb) adyacentes al extremo 5' arbitrariamente asignado del ADN insertado en la secuencia de ADN genómico de la variedad de soja A3555 que flanquea la secuencia de ADN-T insertada. SEQ ID NO:12 es una secuencia que representa los mil (1.000) pb adyacentes al extremo 3' arbitrariamente asignado del ADN insertado en la secuencia de ADN genómico de la variedad de soja A3555 que flanquea la secuencia de ADN-T insertada. SEQ ID NO:7 es SEQ ID NO:11 más ciento ochenta y un (181) pb del extremo 5' de la secuencia de ADN-T insertado sumados al extremo 3' de SEQ ID NO:11. SEQ ID NO:8 es SEQ ID NO:12 más ciento noventa y dos (192) pb del extremo 3' de la secuencia de ADN-T insertado sumados al extremo 5' de SEQ ID NO:12. SEQ ID NO:10 corresponde a la secuencia de ADN que define el evento de soja GM\_CSM63770 y contiene una secuencia contigua (código) que comprende la secuencia flanqueante A3555 5', el inserto transgénico de GM\_CSM63770, y la secuencia flanqueante A3555 3', y por lo tanto, contiene ambas secuencias de unión entre el inserto y el genoma vegetal especificadas como SEQ ID NO:1, 3, 5 y 7 (extremo 5'), y como SEQ ID NO:2, 4, 6 y 8 (extremo 3').

**[0081]** A menos que se indique lo contrario en la presente, los términos se han de entender de conformidad con el uso convencional por parte de aquellos con capacitación normal en la

técnica pertinente. Las definiciones de los términos comunes en biología molecular se pueden hallar en Rieger *et al.*, *Glossary of Genetics: Classical and Molecular*, 5<sup>ta</sup> edición, Springer-Verlag: Nueva York, 1991; y Lewin, *Genes V*, Oxford University Press: Nueva York, 1994, junto con otras fuentes conocidas por aquellos con capacitación normal en la técnica. Como se usa en la presente, la expresión “soja” significa especies pertenecientes al género *Glycine*, preferentemente, *Glycine max* e incluye todas las variedades vegetales que se pueden reproducir con plantas de soja que contienen el evento GM\_CSM63770, inclusive especies de soja silvestres como así también aquellas plantas que pertenecen al género *Glycine* que permiten el mejoramiento entre especies.

**[0082]** El evento GM\_CSM63770 fue transformado con un constructo de ADN que contiene casetes de expresión que expresan cantidades tóxicas de las proteínas insecticidas Cry1A.2 y Cry1B.2. El significado de cantidad tóxica es una cantidad eficaz, una cantidad insecticida, una cantidad insecticidamente eficaz, una cantidad supresora de un insecto diana, una cantidad plaguicida eficaz, una cantidad en la dieta de insectos del orden de los lepidópteros que es insecticida, y otras expresiones similares que se han de entender de acuerdo con el uso convencional por parte de aquellos con conocimientos ordinarios de la técnica pertinente. Las plantas de soja transformadas de acuerdo con los métodos y con el constructo de ADN divulgados en la presente son resistentes a insectos lepidópteros plaga.

**[0083]** Una “planta” transgénica se produce mediante la transformación de una célula vegetal con ADN heterólogo, es decir, un constructo de ácido nucleico que incluye un número de características eficaces de interés, regeneración de una planta obtenida de la inserción del transgén en el genoma de la célula de la planta, y selección de una planta particular caracterizada por la inserción en una localización genómica particular y el número de características eficaces de la planta transgénica regenerada. El término “evento” se refiere a ADN del transformante original que comprende el ADN insertado y las secuencias genómicas flanqueantes inmediatamente adyacentes al ADN insertado. Tal ADN es exclusivo y sería de esperar que se transfiera a una progenie que recibe el ADN insertado, que incluye el transgén de interés, como el resultado de un cruzamiento sexual de línea parental que incluye el ADN insertado (por ejemplo, el transformante original y la progenie resultante de la autofecundación) y una línea parental que no contiene el ADN insertado. La presente invención también proporciona la planta transformante original y la progenie de la transformante que incluye el ADN heterólogo. Dicha progenie se puede producir mediante un cruzamiento sexual entre plantas que comprenden el evento y otra planta donde la progenie incluye el ADN

heterólogo. Inclusive después de retrocruzamiento repetido a un progenitor recurrente, el evento está presente en la progenie del cruzamiento en la misma localización cromosómica. El ADN del evento transgénico, y el genoma en el cual el ADN del evento transgénico es detectable dentro de la célula vegetal, la planta, la semilla y otras partes de la planta, no son pre-existentes en la naturaleza.

**[0084]** Como se usa en la presente, el término “recombinante” se refiere a un ADN, una proteína o un organismo no natural que no se encontraría normalmente en la naturaleza y fue creado por la intervención humana. Una “molécula de ADN recombinante” es una molécula de ADN que comprende una combinación de moléculas de ADN que no se hallarían juntas naturalmente y es el resultado de la intervención humana. Por ejemplo, una molécula de ADN que está comprendida por una combinación de al menos dos moléculas de ADN heterólogas entre sí, tal como una molécula de ADN que comprende un transgén y el ADN genómico de la planta adyacente al transgén, es una molécula de ADN recombinante.

**[0085]** Las expresiones “ADN” y “molécula de ADN” a las que se hace referencia en la presente se refieren a una molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN). Una molécula de ADN puede ser de origen genómico o sintético, y es, por convención, desde el extremo 5’ (corriente arriba) hasta el extremo 3’ (corriente abajo). Como se usa en la presente, la expresión “secuencia de ADN” se refiere a la secuencia de nucleótidos de la molécula de ADN. Por convención, las secuencias de ADN de la invención y sus fragmentos se divulgan con referencia solamente a una hebra de las dos hebras de las secuencias de ADN complementario bicatenario. Explícita e implícitamente, las secuencias complementarias de las secuencias proporcionadas en la presente (las secuencias de la hebra complementaria), también denominadas en la técnica secuencias complementarias inversas, están dentro del alcance de la invención y se consideran explícitamente dentro del alcance del objeto reivindicado.

**[0086]** Como se usa en la presente, el término “fragmento” se refiere a una porción más pequeña que la totalidad. Por ejemplo, los fragmentos de SEQ ID NO:10 incluirían secuencias que son al menos aproximadamente 12 nucleótidos consecutivos, al menos aproximadamente 13 nucleótidos consecutivos, al menos aproximadamente 14 nucleótidos consecutivos, al menos aproximadamente 15 nucleótidos consecutivos, al menos aproximadamente 16 nucleótidos consecutivos, al menos aproximadamente 17 nucleótidos consecutivos, al menos aproximadamente 18 nucleótidos consecutivos, al menos aproximadamente 19 nucleótidos consecutivos, al menos aproximadamente 20 nucleótidos consecutivos, al menos aproximadamente 25 nucleótidos consecutivos, al menos aproximadamente 30 nucleótidos

consecutivos, al menos aproximadamente 35 nucleótidos consecutivos, al menos aproximadamente 40 nucleótidos consecutivos, al menos aproximadamente 45 nucleótidos consecutivos, al menos aproximadamente 50 nucleótidos consecutivos, al menos aproximadamente 60 nucleótidos consecutivos, al menos aproximadamente 70 nucleótidos consecutivos, al menos aproximadamente 80 nucleótidos consecutivos, al menos aproximadamente 90 nucleótidos consecutivos, o al menos aproximadamente 100 nucleótidos consecutivos de la secuencia completa de SEQ ID NO:10.

**[0087]** De modo similar, un fragmento del flanco 5' (SEQ ID NO:11 o SEQ ID NO:36) o del flanco 3' (SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:37) del evento de soja GM\_CSM63770 puede comprender al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 11, al menos aproximadamente 12, al menos aproximadamente 13, al menos aproximadamente 14, al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 16, al menos aproximadamente 17, al menos aproximadamente 18, al menos aproximadamente 19, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 21, al menos aproximadamente 22, al menos aproximadamente 23, al menos aproximadamente 24, al menos aproximadamente 25, al menos aproximadamente 30, al menos aproximadamente 35, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 45, al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 60, al menos aproximadamente 70, al menos aproximadamente 80, al menos aproximadamente 90, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 150, al menos aproximadamente 200, al menos aproximadamente 250, al menos aproximadamente 300, al menos aproximadamente 400, o al menos aproximadamente 500 nucleótidos consecutivos de SEQ ID NO:11 o SEQ ID NO:36; o SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:37. Además, la presente divulgación abarca secuencias de nucleótidos que son al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, al menos 99,1%, al menos 99,2%, al menos 99,3%, al menos 99,4%, al menos 99,5%, al menos 99,6%, al menos 99,7%, al menos 99,8% o al menos 99,9% idénticas a SEQ ID NO:11 o 12, o SEQ ID NO:36 o 37, o a cualquier fragmento de cualquiera de ellas.

**[0088]** Se considera que la referencia en esta divulgación a “molécula aislada de ADN”, o una frase o término equivalente significa que la molécula de ADN está presente sola o en combinación con otras composiciones, pero no dentro de su ambiente natural. Por ejemplo, los elementos de los ácidos nucleicos tales como secuencia codificadora, secuencia de intrones, secuencia líder no traducida, secuencia promotora, secuencia de terminación transcripcional, y similares, que se encuentran naturalmente dentro del ADN del genoma de un organismo no se

consideran “aislados” siempre que el elemento esté dentro del genoma del organismo y en la ubicación dentro del genoma en la cual este se halla naturalmente. No obstante, cada uno de estos elementos, y subpartes de estos elementos, estarían “aislados” dentro del alcance de esta divulgación siempre que el elemento no esté dentro del genoma del organismo y en la ubicación dentro del genoma en la cual este se halla naturalmente. Igualmente, una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína insecticida o cualquier variante insecticida de origen natural de esa proteína sería una secuencia de nucleótidos aislada siempre que la secuencia de nucleótidos no esté dentro del ADN de la bacteria en la cual la secuencia que codifica la proteína se halla naturalmente. Una secuencia de nucleótidos sintética que codifique la secuencia de aminoácidos de la proteína insecticida de origen natural se consideraría aislada a los fines de esta divulgación. A los fines de esta divulgación, cualquier secuencia de nucleótidos transgénica, es decir, la secuencia de nucleótidos del ADN insertada en el genoma de las células de una planta o bacteria, o presente en un vector extracromosómico, se consideraría una secuencia de nucleótidos aislada si esta está presente dentro de la estructura plasmídica o similar usada para transformar las células, dentro del genoma de la planta o bacteria, o está presente en cantidades detectables en tejidos, progenie, muestras biológicas o productos básicos derivados de la planta o bacteria. En cualquier circunstancia, la molécula de ADN aislada es una molécula química, independientemente de si se la denomina un ácido nucleico, una secuencia de ácidos nucleicos, una secuencia de polinucleótidos, o similares. Esta es una molécula novedosa, inventiva que exhibe aplicabilidad industrial tanto cuando está presente en una célula de una planta como en un genoma de una planta, y cuando está presente fuera de una célula de una planta, y por lo tanto, exhibe y se considera que exhibe dicha utilidad independientemente de dónde esté localizada la molécula.

**[0089]** Se considera que la referencia en esta divulgación a “molécula aislada de proteína”, o una frase o término equivalente significa que la molécula de proteína está presente sola o en combinación con otras composiciones, pero no dentro de su ambiente natural. Por ejemplo, las moléculas de proteína insecticida expresada por el evento de soja GM\_CSM63770 no se hallan naturalmente en muestras de plantas de soja nativas. Las proteínas insecticidas Cry1A.2 y Cry1B.2 del evento de soja GM\_CSM63770 son moléculas de proteínas aisladas en tanto que las proteínas insecticidas o sus variantes no estaban dentro de la proteína de la bacteria en la cual la proteína se halla naturalmente.

**[0090]** La secuencia de ADN de la región que abarca la conexión mediante enlace fosfodiéster de un extremo del inserto transgénico al ADN genómico de soja flanqueante se denomina

“unión”. Una unión es el punto de conexión del inserto transgénico y el ADN flanqueante como una molécula contigua. Una unión se halla en el extremo 5’ del inserto transgénico y la otra se halla en el extremo 3’ del inserto transgénico, denominadas en la presente la unión 5’ y 3’, respectivamente. Una “secuencia de unión” se refiere a una secuencia de ADN de cualquier longitud que abarca la unión 5’ o 3’ de un evento. Las secuencias de unión del evento de soja GM\_CSM63770 son evidentes para el experto en la técnica que emplea SEQ ID NO:10. Los ejemplos de secuencias de unión de GM\_CSM63770 se proporcionan como SEQ ID NOs:1-8. La Figura 1 ilustra la disposición física de las secuencias de unión, dispuestas desde 5’ hasta 3’, en relación con SEQ ID NO:10. Las secuencias de unión de GM\_CSM63770 pueden estar presentes como parte del genoma de una planta, semilla o célula que contiene GM\_CSM63770. La identificación de una o más de las secuencias de unión en una muestra de una planta, parte de planta, semilla o célula indica que el ADN se obtuvo de soja que contiene GM\_CSM63770 y es un diagnóstico o una característica de la presencia del evento de soja GM\_CSM63770.

**[0091]** Las secuencias de unión para el evento de soja GM\_CSM63770 pueden estar representadas por una secuencia del grupo que consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8 y SEQ ID NO:10. Por ejemplo, las secuencias de unión pueden estar arbitrariamente representadas por las secuencia de nucleótidos proporcionadas como SEQ ID NO:1 (secuencia de unión 5’) y SEQ ID NO:2 (secuencia de unión 3’). Alternativamente, las secuencias de unión pueden estar arbitrariamente representadas por las secuencia de nucleótidos proporcionadas como SEQ ID NO:3 (secuencia de unión 5’) y SEQ ID NO:4 (secuencia de unión 3’). Alternativamente, las secuencias de unión pueden estar arbitrariamente representadas por las secuencia de nucleótidos proporcionadas como SEQ ID NO:5 (secuencia de unión 5’) y SEQ ID NO:6 (secuencia de unión 3’). Alternativamente, las secuencias de unión pueden estar arbitrariamente representadas por las secuencia de nucleótidos proporcionadas como SEQ ID NO:7 (secuencia de unión 5’) y SEQ ID NO:8 (secuencia de unión 3’). Estas secuencias de nucleótidos están conectadas mediante un enlace fosfodiéster, y en el evento de soja GM\_CSM63770 están presentes como parte del genoma recombinante de la célula de la planta.

**[0092]** Estas secuencias de unión son un diagnóstico o una característica de la presencia del evento de soja GM\_CSM63770, o del constructo comprendido en este. Por lo tanto, la identificación de una o más de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8 y SEQ ID NO:10 en una muestra derivada de una planta de soja, semilla de soja o parte de planta de soja es un diagnóstico de

que el ADN se obtuvo del evento de soja GM\_CSM63770. Por lo tanto, la invención proporciona una molécula de ADN que contiene al menos una de las secuencias de nucleótidos proporcionadas como SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10. Cualquier segmento de ADN derivado del evento de soja transgénico GM\_CSM63770 que sea suficiente para incluir al menos una de las secuencias proporcionadas como SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8 y SEQ ID NO:10 está dentro del alcance de la invención. Además, cualquier polinucleótido que comprenda una secuencia complementaria a cualquiera de las secuencias descriptas dentro de este párrafo está dentro del alcance de la invención.

**[0093]** La invención proporciona moléculas de ADN a modo de ejemplo que se pueden usar ya sea como cebadores o como sondas para detectar la presencia de ADN derivado de una planta de soja que comprende ADN del evento GM\_CSM63770 en una muestra. Tales cebadores o sondas son específicos para una secuencia de ácido nucleico diana y, como tales, son útiles para la identificación de la secuencia de ácido nucleico del evento de soja GM\_CSM63770 mediante los métodos de la invención descriptos en la presente.

**[0094]** Se considera que el uso de la palabra “derivado” significa que una molécula de ADN en particular está en el genoma de la planta de soja o es capaz de ser detectada en el ADN de la planta de soja. “Capaz de ser detectada” se refiere a la capacidad de un segmento de ADN particular de ser amplificado y su tamaño o secuencia caracterizada o elucidada mediante análisis de secuencia de ADN, es decir, el segmento de ADN diana, y la capacidad subsiguiente para detectar la unión de la sonda a la diana. El segmento de ADN particular o el segmento de ADN diana de la presente invención está presente dentro de la soja que contiene la inserción del evento de soja GM\_CSM63770.

**[0095]** Una “sonda” es una molécula de ácido nucleico que es complementaria con una hebra de ácido nucleico diana y es útil en métodos de hibridación. Una sonda puede estar unida a una etiqueta convencional detectable o molécula reportera, por ejemplo, un isótopo radiactivo, ligando, agente quimioluminiscente, o enzima. Tal sonda es complementaria de una hebra de un ácido nucleico diana, y en el caso de la presente invención, de una hebra de ADN de GM\_CSM63770 ya sea de una planta que contiene GM\_CSM63770 o de una muestra que incluye ADN de GM\_CSM63770. Por lo tanto, las sondas para usar en la presente comprende moléculas de ADN o segmentos de polinucleótidos con la longitud suficiente para funcionar bajo condiciones de hibridación rigurosas como se define en la presente para unirse a un

segmento exclusivo particular de ADN presente dentro del evento GM\_CSM63770 y que es un diagnóstico o una característica del evento GM\_CSM63770 en una muestra. Dicha sonda puede ser diseñada para unirse solo a una única unión o a otra secuencia novedosa solamente presente en el evento de soja GM\_CSM63770, o dos o más de tales segmentos de unión individuales. Las sondas de acuerdo con la presente invención incluyen no solo ácidos desoxirribonucleicos o ribonucleicos, sino también poliamidas y otros materiales de sondas que se unen específicamente a una secuencia de ADN diana y se pueden usar para detectar la presencia de esa secuencia de ADN diana. Una secuencia de ADN a modo de ejemplo útil como una sonda para detectar el evento de soja GM\_CSM63770 se proporciona como SEQ ID NO:16 (PB4832).

**[0096]** Un “cebador” es generalmente una molécula de ADN que está diseñada para usar en métodos de apareamiento o hibridación específicos en los que interviene la amplificación térmica. Los cebadores pueden comprender pares de oligonucleótidos o segmentos de polinucleótidos diferentes para usar en una reacción de amplificación térmica que amplifica un segmento en particular de ADN diana. Cada cebador en el par está diseñado para unirse a un segmento de ADN más bien específico dentro o cerca de un segmento de ADN de interés para la amplificación. Los cebadores se unen de forma tal que estos actúan entonces como regiones localizadas de polimerización de secuencias de ácidos nucleicos resultando en la producción de uno o más amplicones (segmentos diana amplificados de ADN). El amplicón producido a partir de tal reacción tendría una secuencia de ADN correspondiente a una secuencia del ADN molde localizado entre los dos sitios donde los cebadores hibridaron con el molde. En ciertas realizaciones, el uso de cebadores diseñados para unirse a segmentos exclusivos del evento de soja GM\_CSM63770 y que amplifican amplicones particulares que contienen una o más de las secuencias de unión descritas en la presente, y la detección y/o caracterización de tales amplicones luego de la compleción o terminación de la reacción de la polimerasa, es un diagnóstico o una característica de la presencia del evento de soja GM\_CSM63770 en una muestra en particular. El experto en la técnica está muy familiarizado con este método de amplificación y no es necesaria la enumeración de los aspectos específicos de la amplificación.

**[0097]** Un cebador está generalmente diseñado para hibridar con una hebra de ADN complementario diana para formar un híbrido entre el cebador y la hebra de ADN diana, y la presencia del cebador es un punto de reconocimiento por una polimerasa para iniciar la extensión del cebador (es decir, polimerización de nucleótidos adicionales en una molécula nucleotídica de alargamiento) usando como molde la hebra de ADN diana. Pares de cebadores

se refiere al uso de dos cebadores que se unen a hebras opuestas de un segmento nucleotídico bicatenario a fines de amplificar linealmente el segmento polinucleotídico entre las posiciones localizadas para unión por los elementos individuales del par de cebadores, generalmente en una reacción de amplificación térmica u otros métodos convencionales de amplificación de ácidos nucleicos. Moléculas de ADN a modo de ejemplo útiles como cebadores se proporcionan como SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18 y SEQ ID NO:20.

**[0098]** Los cebadores del par SEQ ID NO:14 y SEQ ID NO:15 son útiles como una primera molécula de ADN y una segunda molécula de ADN que es diferente de la primera molécula de ADN, y ambas respectivamente tienen la longitud suficiente de nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:10 para funcionar como cebadores de ADN que, cuando se usan juntos en una reacción de amplificación térmica con ADN molde derivado del evento de soja GM\_CSM63770, sirven para producir un amplicón que es un diagnóstico o una característica de ADN del evento de soja GM\_CSM63770 en una muestra. Los cebadores del par SEQ ID NO:17 y SEQ ID NO:18 son útiles como una primera molécula de ADN y una segunda molécula de ADN que es diferente de la primera molécula de ADN, y ambas respectivamente tienen la longitud suficiente de nucleótidos contiguos de un locus dentro del genoma de soja para funcionar como cebadores de ADN que, cuando se usan juntos en una reacción de amplificación térmica con ADN molde derivado del evento de soja GM\_CSM63770, sirven para producir un amplicón que sirve como un control interno tanto para el diagnóstico del evento de soja GM\_CSM63770, como así también de la cigosidad del ADN del evento de soja GM\_CSM63770 en una muestra. Los cebadores del par SEQ ID NO:20 y SEQ ID NO:15 son útiles como una primera molécula de ADN y una segunda molécula de ADN que es diferente de la primera molécula de ADN, y ambas respectivamente tienen la longitud suficiente de nucleótidos contiguos de un locus dentro del genoma de soja para funcionar como cebadores de ADN que, cuando se usan juntos en una reacción de amplificación térmica con ADN molde derivado del evento de soja GM\_CSM63770, sirven para producir un amplicón que es un diagnóstico o una característica de ADN genómico de soja de tipo silvestre no insertado que no comprende el evento GM\_CSM63770. Está dentro de las capacidades de la técnica determinar cualquier parámetro de amplificación deseado en particular, cuáles sondas y cebadores serían óptimos para su inclusión en la reacción de amplificación térmica para detectar la presencia o ausencia del ADN del evento transgénico de la presente invención sobre la base de las secuencias de ADN proporcionadas en el ADN insertado (SEQ ID NO:9) y el segmento completo de ADN

establecido en la presente como SEQ ID NO:10 que define el evento transgénico de soja de esta invención, GM\_CSM63370.

**[0099]** Las sondas de ADN y los cebadores de ADN generalmente tienen una longitud de once (11) polinucleótidos o más, a menudo dieciocho (18) polinucleótidos o más, veinticuatro (24) polinucleótidos o más, o treinta (30) polinucleótidos o más. Tales sondas y cebadores se seleccionan para que tengan la longitud suficiente para hibridar específicamente con una secuencia diana en condiciones de hibridación altamente rigurosas. Preferentemente, las sondas y los cebadores de acuerdo con la presente invención tienen completa similitud de secuencia con la secuencia diana, aunque, mediante métodos convencionales, se pueden diseñar sondas que difieren de la secuencia diana que retienen la capacidad de hibridar con secuencias diana.

**[00100]** Las sondas y los cebadores de ácido nucleico de la presente invención hibridan en condiciones rigurosas con una molécula de ADN diana. Se puede usar cualquier método convencional de hibridación o amplificación de ácido nucleico para identificar la presencia de ADN de una planta transgénica en una muestra. Las moléculas de ácido polinucleico también denominadas segmentos de ácido nucleico o sus fragmentos son capaces de hibridar específicamente con otras moléculas de ácido nucleico en determinadas circunstancias.

**[0100]** Como se usa en la presente, se dice que dos moléculas de ácido polinucleico son capaces de hibridar específicamente entre sí si las dos moléculas son capaces de formar una estructura de ácido nucleico bicatenario anti-paralela. Se dice que una molécula de ácido nucleico es el “complemento” de otra molécula de ácido nucleico si estas exhiben una complementariedad completa. Como se usa en la presente, se dice que las moléculas exhiben “complementariedad completa” cuando cada nucleótido de una de las moléculas es complementario con un nucleótido de la otra. Se dice que dos moléculas son “mínimamente complementarias” si pueden hibridar entre sí con suficiente estabilidad para permitir que permanezcan apareadas entre sí en condiciones convencionales de al menos “baja rigurosidad”. De modo similar, se dice que las moléculas son “complementarias” si pueden hibridar entre sí con suficiente estabilidad para permitir que permanezcan apareadas entre sí en condiciones convencionales de “alta rigurosidad”. Las condiciones de rigurosidad convencionales están descritas por Sambrook *et al.*, 1989, y por Haymes *et al.*, en: *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, DC (1985). Por lo tanto, está permitido el apartamiento de la completa complementariedad, siempre que tales apartamientos no impidan completamente la capacidad de las moléculas para formar una estructura bicatenaria. Para que una molécula de ácido nucleico sirva como un cebador o una sonda solo es necesario que tenga la suficiente

complementariedad de secuencia que le permita formar una estructura bicatenaria estable en las condiciones particulares creadas por las concentraciones de disolvente y sal empleadas.

**[0101]** Como se usa en la presente, una secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia de ácido nucleico que hibridará específicamente con el complemento de la secuencia de ácido nucleico con el cual está siendo comparada en condiciones de alta rigurosidad. Las condiciones de rigurosidad apropiadas que promueven la hibridación del ADN, por ejemplo, solución 6,0x de cloruro/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45 °C, seguida de lavado SSC 2.0x a 50 °C, son conocidas por los expertos en la técnica o se pueden hallar en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Por ejemplo, la concentración de sal en el paso de lavado se puede seleccionar entre una baja rigurosidad de aproximadamente SSC 2,0x a 50 °C y una alta rigurosidad de aproximadamente SSC 0,2x a 50 °C. Además, la temperatura en el paso de lavado se puede aumentar desde condiciones de baja rigurosidad a temperatura ambiente, aproximadamente 22 °C, hasta condiciones de alta rigurosidad de aproximadamente 65 °C. Tanto la temperatura como la sal pueden variar, o tanto la temperatura como la concentración de sal se pueden mantener constantes mientras se cambian otras variables. En una realización preferida, un ácido polinucleico de la presente invención hibridará específicamente con una o más de las moléculas de ácido nucleico establecidas en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:10, o sus complementos o fragmentos de cualquiera de estas en condiciones de moderada rigurosidad, por ejemplo, a aproximadamente SSC 2,0x y aproximadamente 65 °C. En una realización particularmente preferida, un ácido nucleico de la presente invención hibridará específicamente con una o más de las moléculas de ácido nucleico establecidas en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:10, o sus complementos o fragmentos de cualquiera de estas en condiciones de alta rigurosidad. En un aspecto de la presente invención, una molécula de ácido nucleico marcadora preferida de la presente invención tiene la secuencia de ácidos nucleicos establecida en SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:6 o SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:8 o SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:10, o sus complementos o fragmentos de cualquiera de estas. La hibridación de la sonda con la molécula de ADN diana se puede detectar mediante una cantidad de métodos conocidos por los expertos en la técnica, que incluyen, entre otros, marcadores fluorescentes, marcadores radiactivos, marcadores basados en anticuerpos y marcadores quimioluminiscentes.

**[0102]** Con respecto a la amplificación de una secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, mediante PCR) usando un par de cebadores de amplificación en particular, “condiciones rigurosas” son condiciones que permiten que el par de cebadores hibriden solamente con la secuencia de ácido nucleico diana a la que se uniría un cebador que tuviera la correspondiente secuencia de tipo silvestre (o su complemento) y preferentemente para producir un producto de amplificación exclusivo, el amplicón, en una reacción de amplificación térmica de ADN.

**[0103]** La expresión “específico para (una secuencia diana)” indica que una sonda o un cebador hibrida en condiciones de hibridación rigurosas solamente con la secuencia diana en una muestra que comprende la secuencia diana.

**[0104]** Como se usan en la presente, “ADN amplificado” o “amplicón” se refieren al producto del método de amplificación de ácido polinucleico dirigido a una molécula de ácido polinucleico diana que es parte de un molde de ácido polinucleico. Por ejemplo, para determinar si una planta de soja resultante de un cruzamiento sexual contiene ADN genómico de una planta transgénica de una planta de soja que comprende el evento GM\_CSM63770 de la presente invención, se puede someter ADN extraído de una muestra tisular de la planta de soja a un método de amplificación de ácido polinucleico usando un par de cebadores que incluye un primer cebador derivado de una secuencia de ADN genómico en la región que flanquea el ADN heterólogo insertado del evento GM\_CSM63770 y es alargado mediante la polimerasa 5’ a 3’ en la dirección del ADN insertado. El segundo cebador está derivado de la molécula de ADN heterólogo insertado es alargado mediante la polimerasa 5’ a 3’ en dirección del ADN genómico flanqueante del cual deriva el primer cebador. La longitud del amplicón puede oscilar entre la longitud combinada del par de cebadores más un par de bases de nucleótidos, o más aproximadamente cincuenta pares de bases de nucleótidos, o más aproximadamente doscientos cincuenta pares de bases de nucleótidos, o más aproximadamente cuatrocientos cincuenta pares de bases de nucleótidos o más. Alternativamente, un par de cebadores puede derivar de la secuencia genómica a ambos lados del ADN heterólogo insertado para así producir un amplicón que incluye la secuencia de polinucleótidos insertada completa (por ejemplo, un cebador directo aislado de la porción genómica en el extremo 5’ de SEQ ID NO:10 y un cebador inverso aislado de la porción genómica en el extremo 3’ de SEQ ID NO:10 que amplifica una molécula de ADN que comprende la secuencia de ADN insertada (SEQ ID NO:9) identificada en la presente en el genoma del evento GM\_CSM63770). Un elemento de un par de cebadores derivado de la secuencia genómica de la planta adyacente al ADN transgénico insertado está localizado a una distancia de la secuencia del ADN insertado, esta

distancia puede estar comprendida entre un par de bases de nucleótidos y aproximadamente veinte mil pares de bases de nucleótidos. El uso del término “amplicón” excluye específicamente los dímeros de cebador que se pueden formar durante la reacción de amplificación térmica de ADN.

**[0105]** Por razones de practicidad, se deberán diseñar cebadores que produzcan amplicones con un rango de tamaño limitado, por ejemplo, entre 100 y 1.000 bases. Los amplicones de tamaño más pequeño (longitud de polinucleótidos más corta) en general se producen de forma más confiable en reacciones de amplificación térmica, permitiendo ciclos más cortos, y se pueden separar y visualizar fácilmente sobre geles de agarosa o adaptarse para usar en ensayos de criterios de valoración del tipo TAQMAN®. Los amplicones más pequeños se pueden producir y detectar por métodos conocidos en la técnica de la detección de amplicones de ADN. Además, los amplicones producidos usando los pares de cebadores se pueden clonar en vectores, propagar, aislar y secuenciar o se pueden secuenciar directamente con métodos bien conocidos en la técnica. Todos los pares de cebadores derivados de la combinación de SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:9 o la combinación de SEQ ID NO:12 y SEQ ID NO:9 que son útiles en un método de amplificación de ADN para producir un amplicón que es un diagnóstico o una característica del evento de soja GM\_CSM63770 o su progenie, son un aspecto de la invención. Todas las moléculas individuales de cebador de polinucleótido de ADN aisladas que comprenden al menos 15 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:11, o su complemento, que son útiles en un método de amplificación de ADN para producir un amplicón que es un diagnóstico o una característica del evento de soja GM\_CSM63770 o su progenie, son un aspecto de la invención. Todas las moléculas individuales de cebador de polinucleótido de ADN aisladas que comprenden al menos 15 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:12, o su complemento, que son útiles en un método de amplificación de ADN para producir un amplicón que es un diagnóstico o una característica de plantas que comprenden el evento de soja GM\_CSM63770 o su progenie, son un aspecto de la invención. Todas las moléculas individuales de cebador de polinucleótido de ADN aisladas que comprenden al menos 15 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:9, o su complemento, que son útiles en un método de amplificación de ADN para producir un amplicón que es un diagnóstico o una característica del evento de soja GM\_CSM63770 o su progenie, son un aspecto de la invención.

**[0106]** La amplificación de ácido polinucleico se puede lograr por cualquiera de los diversos métodos de amplificación de ácido polinucleico conocidos en la técnica, inclusive, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los métodos de amplificación son conocidos en la técnica

y se describen, *inter alia*, en las Patentes de los EE.UU. nro. 4.683.195 y 4.683.202 y en *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, ed. Innis *et al.*, Academic Press, San Diego, 1990. Se han desarrollado métodos para amplificación mediante PCR para amplificar hasta 22 kb (kilobases) de ADN genómico y hasta 42 kb de ADN bacteriófago (*Cheng et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:5695-5699, 1994). Estos métodos, como así también otros métodos conocidos en la técnica de la amplificación de ADN se pueden usar en la práctica de la presente invención. La secuencia del inserto de ADN heterólogo o la secuencia del ADN genómico flanqueante del evento de soja GM\_CSM63770 se pueden verificar (y corregir de ser necesario) mediante la amplificación de tales moléculas de ADN de semillas de soja que contienen ADN del evento GM\_CSM63770 o plantas de soja cultivadas a partir de semillas de soja que contienen ADN del evento GM\_CSM63770 depositadas en la ATCC con número de acceso PTA-126048, usando cebadores derivados de las secuencias proporcionadas en la presente, seguida de secuenciación de ADN convencional del amplicón PCR o los fragmentos de ADN clonados de este.

**[0107]** El amplicón diagnóstico producido por estos métodos se puede detectar mediante una pluralidad de técnicas. Uno de esos métodos es el Análisis de Bit Genético (Nikiforov, *et al.* Nucleic Acid Res. 22:4167-4175, 1994) donde se diseña un oligonucleótido de ADN que se superpone a ambas, la secuencia del ADN genómico flanqueante adyacente y la secuencia del ADN insertado. El oligonucleótido se inmoviliza en pocillos de una placa de microtitulación. Luego de la PCR de la región de interés (usando un cebador en la secuencia insertada y uno en la secuencia genómica flanqueante adyacente), se puede hibridar un producto de PCR monocatenario con el oligonucleótido inmovilizado y servir como un molde para una reacción de extensión de una sola base usando una ADN polimerasa y marcadores didesoxinucleótidos trifosfato (ddNTP) específicos para la siguiente base esperada. La lectura puede ser fluorescente o estar basada en ELISA. Una señal indica la presencia de la secuencia transgénica/genómica debida al éxito de la amplificación, hibridación y extensión de una sola base.

**[0108]** Otro método es la técnica de pirosecuenciación, descripta por Winge (Innov. Pharma. Tech. 00:18-24, 2000). En este método, se diseña un oligonucleótido que se superpone al ADN genómico adyacente y la unión de ADN insertado. El oligonucleótido hibrida con el producto monocatenario de PCR de la región de interés (un cebador en la secuencia insertada y uno en la secuencia genómica flanqueante) y se incuba en presencia de ADN polimerasa, ATP, sulfurilasa, luciferasa, apirasa, adenosina 5' fosfosulfato y luciferina. Se añaden los dNTP

individualmente y la reacción enzimática de la luciferasa con estos reactivos y sustratos resulta en la liberación de fotones (una señal de luz) que luego es observada y medida. Una señal de luz indica la presencia de la secuencia transgénica/genómica debida al éxito de la amplificación, hibridación y extensión de una sola o múltiples bases.

**[0109]** La polarización fluorescente según la describen Chen, *et al.*, (Genome Res. 9:492-498, 1999) es un método que se puede usar para detectar el amplicón de la presente invención. Usando este método, se diseña un oligonucleótido que se superpone al flanqueante genómico y la unión de ADN insertado. El oligonucleótido hibrida con el producto monocatenario de PCR de la región de interés (un cebador en el ADN insertado y uno en la secuencia de ADN genómico flanqueante) y se incuba en presencia de ADN polimerasa y un ddNTP con marcador fluorescente. La extensión de una sola base resulta en la incorporación del ddNTP. La incorporación se puede medir como un cambio en la polarización usando un fluorómetro. Un cambio en la polarización indica la presencia de la secuencia transgénica/genómica debida al éxito de la amplificación, hibridación y extensión de una sola base.

**[0110]** La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real es la capacidad para monitorear el progreso de la PCR a medida que se produce (es decir, en tiempo real). Los datos se recogen a lo largo del proceso de la PCR, en vez de al final de la PCR. En la PCR en tiempo real, las reacciones se caracterizan por el punto temporal durante el ciclado en que se detecta por primera vez la amplificación de una diana en lugar de la cantidad de dianas acumuladas después de un número fijo de ciclos. En un ensayo PCR en tiempo real, una reacción positiva se detecta por la acumulación de una señal fluorescente. Cuanto más alto es el número de copias de la diana de ácido nucleico al inicio, más rápido se observa un aumento significativo en la fluorescencia. El valor umbral del número de ciclos (valor Ct) se define como el número de ciclos requeridos para que la señal fluorescente cruce el umbral (es decir, exceda el nivel basal). Los niveles Ct son inversamente proporcionales a la cantidad de ácido nucleico diana en la muestra (es decir, cuanto más bajo el valor Ct, mayor es la cantidad del ácido nucleico diana en la muestra).

**[0111]** Taqman<sup>®</sup> (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) es descrito como un método para detectar y cuantificar la presencia de una secuencia de ADN usando PCR en tiempo real y está completamente explicado en las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Brevemente, se diseña una sonda de oligonucleótido FRET que se superpone al flanqueante genómico y la unión de ADN insertado. La sonda FRET y los cebadores PCR (un cebador en la secuencia de ADN insertado y uno en la secuencia genómica flanqueante) se someten a un ciclo en presencia

de una polimerasa termoestable y los dNTP. La hibridación de la sonda FRET resulta en la escisión y liberación de restos fluorescentes alejados del resto inactivador en la sonda FRET. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia transgénica/genómica debida al éxito de la amplificación y la hibridación.

**[0112]** Se ha descrito el uso de balizas moleculares para usar en la detección de secuencias, según se describió en Tyangi, *et al.* (Nature Biotech.14:303-308, 1996). Brevemente, se diseña una sonda de oligonucleótido FRET que se superpone al flanqueante genómico y la unión de ADN insertado. La estructura exclusiva de la sonda FRET resulta en que esta contiene una estructura secundaria que mantiene la fluorescencia e inactiva los restos que están muy próximos. La sonda FRET y los cebadores PCR (un cebador en la secuencia de ADN insertado y uno en la secuencia genómica flanqueante) se someten a un ciclo en presencia de una polimerasa termoestable y los dNTP. Luego de la exitosa amplificación por PCR, la hibridación de la sonda FRET con la secuencia diana resulta en la remoción de la estructura secundaria de la sonda y la separación espacial de los restos fluorescentes e inactivadores. Se obtiene una señal fluorescente. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia flanqueante/transgénica insertada debida al éxito de la amplificación y la hibridación.

**[0113]** Los kits para detección de ADN que están basados en métodos de amplificación del ADN contienen moléculas cebadoras de ADN que hibridan específicamente con un ADN diana y amplifican un amplicón de diagnóstico en las condiciones de reacción adecuadas. El kit puede proporcionar un método de detección basado en gel de agarosa o cualquier otro método conocido en la técnica para detectar el amplicón de diagnóstico. Se pueden desarrollar kits para detección de ADN usando las composiciones divulgadas en la presente y son útiles para la identificación de ADN del evento de soja GM\_CSM63770 en una muestra y se pueden aplicar a métodos para el mejoramiento de plantas de soja que contienen ADN del evento de soja GM\_CSM63770. Un kit que contiene cebadores de ADN que son homólogos o complementarios con cualquier porción de la región genómica de soja como se establece en SEQ ID NO:10 y con cualquier porción del ADN transgénico insertado como se establece en SEQ ID NO:10 es un objeto de la invención. Las moléculas de ADN se pueden usar en métodos de amplificación de ADN (PCR) o como sondas en métodos de hibridación de ácido polinucleótido, es decir, análisis mediante transferencia Southern o Northern.

**[0114]** Las sondas y los cebadores de acuerdo con la invención pueden tener completa identidad de secuencia con la secuencia diana, aunque, mediante métodos convencionales, se pueden diseñar sondas y cebadores que difieren de la secuencia diana que retienen la capacidad

de hibridar preferentemente con secuencias diana. Para que una molécula de ácido nucleico sirva como un cebador o una sonda solo es necesario que tenga la suficiente complementariedad de secuencia que le permita formar una estructura bicatenaria estable en las condiciones particulares creadas por las concentraciones de disolvente y sal empleadas. Se puede usar cualquier método convencional de hibridación o amplificación de ácido nucleico para identificar la presencia de ADN transgénico del evento de soja GM\_CSM63770 en una muestra. Las sondas y los cebadores generalmente tienen una longitud de al menos aproximadamente 11 nucleótidos, al menos aproximadamente 18 nucleótidos, al menos aproximadamente 24 nucleótidos, o al menos aproximadamente 30 nucleótidos o más. Tales sondas y cebadores hibridan específicamente con una secuencia de ADN diana en condiciones de hibridación rigurosas. Las condiciones de rigurosidad convencionales están descritas por Sambrook *et al.*, 1989, y por Haymes *et al.*, en: *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, DC (1985).

[0115] Se puede usar cualquier número de métodos bien conocidos por los expertos en la técnica para aislar y manipular una molécula de ADN, o un fragmento de esta, divulgada en la invención, inclusive métodos de amplificación térmica. Las moléculas de ADN o sus fragmentos, también se pueden obtener por otras técnicas tales como sintetizando directamente el fragmento por medios químicos, y se practica comúnmente mediante el uso de un sintetizador de oligonucleótidos automático.

[0116] Por lo tanto, las moléculas de ADN y las correspondientes secuencias de nucleótidos proporcionadas en la presente resultan útiles, entre otras cosas, para identificar el evento de soja GM\_CSM63770, detectar la presencia de ADN derivado del evento de soja transgénico GM\_CSM63770 en una muestra, y monitorear muestras para detectar la presencia y/o la ausencia del evento de soja GM\_CSM63770 o partes de plantas derivadas de plantas de soja que comprenden el evento GM\_CSM63770.

[0117] Al hacer referencia a la soja se considera que plantas de soja, células de plantas de soja, semillas de soja, polen y óvulos de soja, partes de plantas de soja, plantas de progenie de soja y productos básicos de soja están dentro del alcance de la invención, en tanto que cada realización contenga una cantidad detectable de ADN correspondiente a uno, dos o más de los segmentos descritos en la presente como un diagnóstico o una característica de la presencia del evento GM\_CSM63770 (por ejemplo, tal como un polinucleótido que tenga al menos una de las secuencias proporcionadas como SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 y SEQ ID

NO:10). Las plantas de soja, células de plantas de soja, semillas, polen y/u óvulos, partes de plantas y plantas de progenie de la invención también pueden contener uno o más transgenes adicionales. Tales transgenes adicionales pueden ser cualquier secuencia de nucleótidos que codifica una proteína o molécula de ARN que confiere un rasgo deseado que incluye, entre otros, aumento de resistencia frente a insectos, aumento de eficiencia en el uso del agua, aumento del desempeño del rendimiento, aumento de resistencia a la sequía, aumento de la calidad de la semilla, y/o aumento de la tolerancia a herbicidas.

**[0118]** La invención proporciona plantas de soja, células de plantas de soja, semillas de soja, partes de plantas de soja (tales como polen, óvulos, seda, espícula, antera, mazorca, tejido radicular, tejido del tallo, tejido foliar), plantas de progenie de soja derivadas de una planta de soja transgénica que contiene ADN de GM\_CSM63770. Una muestra representativa de semilla de soja que contiene ADN del evento de soja GM\_CSM63770 se depositó de acuerdo con el Tratado de Budapest en la Colección Estadounidense de Cultivos Tipo (ATCC®). El repositorio de la ATCC adjudicó a la semilla que contiene ADN del evento de soja GM\_CSM63770 la Designación de Depósito de Patente PTA-126048.

**[0119]** Esta invención proporciona plantas de soja, células de plantas, partes de plantas y semillas de plantas que comprenden un constructo de ADN recombinante integrado en el cromosoma 19, donde el constructo de ADN recombinante confiere resistencia contra especies de insectos lepidópteros plaga. El constructo de ADN recombinante está integrado en una posición de dicho cromosoma flanqueada por al menos 50 nucleótidos contiguos de SEQ ID NOs:11 o 36 y 50 nucleótidos contiguos de SEQ ID NOs:12 o 37. Los al menos 50 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:11 o 36 pueden comprender una o más secuencias de nucleótidos seleccionadas de SEQ ID NOs:38-137. Los al menos nucleótidos *[sic]* de SEQ ID NO:12 o 37 pueden comprender una o más secuencias de nucleótidos seleccionadas de SEQ ID NOs:138-237.

**[0120]** La invención proporciona un microorganismo que comprende una molécula de ADN que tiene al menos una secuencia seleccionada entre SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10 presente en su genoma. Un ejemplo de dicho microorganismo es una célula de planta transgénica.

**[0121]** Los microorganismos, tales como una célula de planta de la invención, son útiles en muchas aplicaciones industriales, inclusive, entre otras: i) para usar como herramientas de investigación para consultas científicas o desarrollo industrial; ii) para usar en cultivos para

producir carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos o productos de proteínas o moléculas pequeñas endógenas o recombinantes que se pueden usar para investigación científica posterior o como productos industriales; y iii) para usar con modernas técnicas de cultivo de tejidos vegetales para producir plantas transgénicas o cultivos de tejido vegetal que luego se pueden usar para investigación o producción agrícola. La producción y el uso de microorganismos tales como células de plantas transgénicas emplean modernas técnicas microbiológicas y la intervención humana para producir microorganismos exclusivos, realizados por el hombre. En este proceso, se inserta ADN recombinante en el genoma de la célula de una planta para crear una célula de planta transgénica que es exclusiva y está separada de la células vegetales de origen natural. Esta célula de planta transgénica luego se puede cultivar de manera muy similar a las células de bacterias y levadura usando técnicas modernas de microbiología y puede existir en un estado unicelular, no diferenciado. La nueva composición genética y el fenotipo de la célula de planta transgénica es un efecto técnico creado por la integración del ADN heterólogo en el genoma de la célula. Otro aspecto de la invención es un método para usar un microorganismo de la invención. Los métodos para usar microorganismos de la invención, tales como células de plantas transgénicas, incluyen i) métodos para producir células transgénicas mediante la integración de ADN recombinante en el genoma de la célula y luego usando esa célula para derivar células adicionales que poseen el mismo ADN heterólogo; ii) métodos para cultivar células que contienen ADN recombinante usando modernas técnicas de microbiología; iii) métodos para producir y purificar carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos o productos de proteínas endógenos o recombinantes de células cultivadas; y (iv) métodos para usar modernas técnicas de cultivo de tejido vegetal con células de plantas transgénicas para producir plantas transgénicas o cultivos tisulares de plantas transgénicas.

**[0122]** Las plantas de la invención pueden transmitir ADN del evento de soja GM\_CSM63770, inclusive transgenes insertados en el evento de soja GM\_CSM63770, a la progenie, generalmente a través de técnicas convencionales de mejoramiento y selección. Como se usa en la presente, “progenie” incluye cualquier planta, célula vegetal, semilla y/o parte de planta regenerable que contiene ADN del evento GM\_CSM63770 derivado de una planta ancestral y/o comprende una molécula de ADN que tiene al menos una secuencia seleccionada entre SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10. Las plantas, la progenie y las semillas pueden ser homocigotas o heterocigotas para el transgén del evento GM\_CSM63770. La progenie se puede cultivar a partir de semillas producidas por una planta que contiene el

evento de soja GM\_CSM63770 y/o a partir de una semilla producida por una planta fertilizada con polen de una planta que contiene el evento de soja GM\_CSM63770.

**[0123]** Las plantas de progenie pueden ser auto-polinizadas (también conocido como “autofecundación”) para generar un línea verdadera de mejoramiento vegetal, es decir, plantas homocigotas para el transgén. La autofecundación de la progenie apropiada puede producir plantas que son homocigotas para ambos genes exógenos añadidos.

**[0124]** Alternativamente, las plantas de progenie se pueden halofecundar, por ejemplo, cruzarse con otra planta no relacionada, para producir un varietal o una planta o semilla híbrida. La otra planta no relacionada puede ser transgénica o no transgénica. Un varietal o semilla híbrida o planta de la invención se puede derivar por el cruzamiento sexual de un primer parental que carece del ADN específico y exclusivo del evento de soja GM\_CSM63770 con un segundo parental que comprende el evento de soja GM\_CSM63770, resultando un híbrido que comprende el ADN específico y exclusivo del evento de soja GM\_CSM63770. Cada parental puede ser un híbrido o un endógamo/varietal, siempre que el cruzamiento o el mejoramiento resulte en una planta o semilla de la invención, es decir, una semilla que tiene al menos un alelo que contiene el ADN del evento de soja GM\_CSM63770 y/o una molécula de ADN que tiene al menos una secuencia seleccionada entre SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10. Por lo tanto, se pueden cruzar dos plantas transgénicas diferentes para producir descendencia híbrida que contiene dos genes segregados independientemente, añadidos, exógenos. Por ejemplo, el evento de soja GM\_CSM63770 que contiene Cry1A.2 y Cry1B.2 que confieren a la soja resistencia a insectos se pueden cruzar con otras plantas de soja transgénicas para producir una planta que tiene las características de ambos parentales transgénicos. Un ejemplo de esto sería el cruzamiento del evento de soja GM\_CSM63770 que contiene Cry1A.2 y Cry1B.2, que confieren a la soja resistencia a lepidópteros con una planta que tiene uno o más rasgos adicionales tales como tolerancia a herbicidas, resistencia a insectos, o tolerancia a la sequía, resultando en una planta de progenie o semilla que tiene resistencia a insectos lepidópteros plaga y tiene al menos uno o más rasgos adicionales. También se contemplan el retrocruzamiento con una planta parental y la halofecundación con una planta no transgénica, tal como es la propagación vegetativa. Se pueden hallar descripciones de otros métodos de mejoramiento que se usan comúnmente para diferentes rasgos y cultivos en una de varias referencias, por ejemplo, Fehr, en *Breeding Methods for Cultivar Development*, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison WI (1987).

**[0125]** Las plantas, la progenie, las semillas, el polen y los óvulos, las células y partes de plantas de la invención también pueden contener uno o más rasgos de soja adicionales o eventos transgénicos, particularmente aquellos introducidos mediante el cruzamiento de una planta de soja que contiene el evento de soja GM\_CSM63770 con otra planta de soja que contiene el o los rasgos adicionales o eventos transgénicos. Tales rasgos o eventos transgénicos incluyen, entre otros, aumento de resistencia a insectos, tolerancia a herbicidas, aumento de eficiencia en el uso de agua, aumento del desempeño del rendimiento, aumento de resistencia a la sequía, aumento de calidad de la semilla, mejoramiento de calidad nutricional, producción de semillas híbridas, o resistencia fúngica y a enfermedades. Los eventos transgénicos de soja son conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el Servicio de Inspección de Sanidad Animal y Vegetal de los EE.UU. (APHIS, por sus siglas en inglés) del Ministerio de Agricultura de los EE.UU. (USDA, por sus siglas en inglés) proporciona una lista de tales rasgos y se la puede encontrar en su sitio web [www.aphis.usda.gov](http://www.aphis.usda.gov) en Internet. Por lo tanto, se pueden combinar dos o más eventos transgénicos en una semilla o planta de progenie mediante el cruzamiento de dos plantas parentales, cada una de las cuales comprende uno o más eventos transgénicos, recolectar la semilla de progenie, y seleccionar semillas o plantas de progenie que contengan los dos o más eventos transgénicos. Estos pasos se pueden repetir hasta lograr la combinación deseada de eventos transgénicos en una progenie. También se contemplan el retrocruzamiento con una planta parental y la halofecundación con una planta no transgénica, y es propagación vegetativa.

**[0126]** También se proporciona una parte de planta que es derivada de plantas de soja que comprenden el evento de soja GM\_CSM63770. Como se usa en la presente, una “parte de planta” se refiere a cualquier parte de una planta que comprende material derivado de una planta de soja que comprende el evento GM\_CSM63770. Las partes de planta incluyen, entre otras, polen, óvulos, vainas, flores, raíces o tejido del tallo, fibras y hojas. Las partes de planta pueden ser viables, no viables, regenerables y/o no regenerables.

**[0127]** Además se proporciona un producto básico que es derivado de plantas de soja que comprenden el evento de soja GM\_CSM63770 y que contiene una cantidad detectable de un ácido nucleico específico para el evento de soja GM\_CSM63770. Como se usa en la presente, un “producto básico” se refiere a cualquier composición o producto que está comprendido por material derivado de una planta de soja, una semilla de soja entera o procesada, o una o más células de plantas y/o partes de plantas que contienen ADN del evento de soja GM\_CSM63770. Los productos básicos no viables incluyen, entre otros, semillas no viables, semillas enteras o

procesadas, partes de semillas, y partes de plantas; alimento para animales que comprende soja, aceite de soja, proteína de soja, soja triturada, harina de soja, hojuelas de soja, salvado de soja, leche de soja, queso de soja, vino de soja, papel que comprende soja, crema que comprende soja, biomasa de soja, y productos combustibles producidos con el uso de soja y partes de soja. Los productos básicos viables incluyen entre otros, semillas, plantas y células de plantas. Por lo tanto, las plantas de soja que comprenden el evento de soja GM\_CSM63770 pueden emplearse para manufacturar cualquier producto básico generalmente obtenido de la soja. Cualquiera de tales productos básicos que es derivado de plantas de soja que comprenden el evento de soja GM\_CSM63770 puede contener al menos una cantidad detectable del ADN específico y exclusivo correspondiente al evento de soja GM\_CSM63770, y específicamente puede contener una cantidad detectable de un polinucleótido que comprende una molécula de ADN que tiene al menos una secuencia seleccionada entre SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10. Se puede usar cualquier método para detección de moléculas de nucleótidos, inclusive los métodos para detección divulgados en la presente. Un producto básico está dentro del alcance de la invención si tiene cualquier cantidad detectable de una molécula de ADN que tiene al menos una secuencia seleccionada entre SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10 en el producto básico.

**[0128]** Las plantas de soja, células de plantas de soja, semillas de soja, partes de plantas de soja (tales como polen, óvulos, seda, espículas, anteras, mazorcas, tejido radicular, tejido del tallo, tejido foliar), plantas de soja de progenie y productos básicos de la invención, por lo tanto, son útiles, entre otras cosas, para cultivar plantas con el fin de producir semillas y/o partes de plantas que comprenden el evento de soja GM\_CSM63770 para fines agrícolas, producir progenie que comprende el evento de soja GM\_CSM63770 para el mejoramiento vegetal y con fines de investigación, para usar con técnicas microbiológicas para aplicaciones industriales y de investigación, y para la venta a consumidores.

**[0129]** Se proporcionan métodos para producir una planta de soja resistente a insectos que comprende las secuencias de ADN específicas y exclusivas del evento GM\_CSM63770 de la invención. Las plantas transgénicas usadas con estos métodos pueden ser homocigotas o heterocigotas para el transgén. Las plantas de progenie producidas por estos métodos pueden ser plantas varietales o híbridas; se pueden cultivar a partir de semillas producidas por una planta que contiene el evento de soja GM\_CSM63770 y/o a partir de una semilla producida

por una planta fertilizada con polen de una planta que contiene el evento de soja GM\_CSM63770; y pueden ser homocigotas o heterocigotas para el transgén. Las plantas de progenie se pueden posteriormente autopolinizar para generar una línea verdadera de mejoramiento vegetal, es decir, plantas homocigotas para el transgén, o alternativamente se pueden halofecundar, por ejemplo, cruzarse con otra planta no relacionada, para producir un varietal o una semilla o planta híbrida.

**[0130]** Se proporcionan métodos para detectar la presencia de ADN derivado de una célula de soja, tejido de soja, semilla de soja o planta de soja que comprende el evento de soja GM\_CSM63770 en una muestra. Un método comprende i) extraer una muestra de ADN de al menos una célula de soja, tejido de soja, semilla de soja o planta de soja; ii) contactar la muestra de ADN con al menos un cebador que es capaz de producir una secuencia de ADN específica para el ADN del evento GM\_CSM63770 en condiciones apropiadas para la secuenciación de ADN; iii) realizar una reacción de secuenciación de ADN; y luego iv) confirmar que la secuencia de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos específica para el evento GM\_CSM63770, del constructo comprendido en la presente, tal como una seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10. Otro método comprende i) extraer una muestra de ADN de al menos una célula de soja, tejido de soja, semilla de soja o planta de soja; ii) contactar la muestra de ADN con un par de cebadores que es capaz de producir un amplicón del ADN del evento GM\_CSM63770 en condiciones apropiadas para la amplificación de ADN; iii) realizar una reacción de amplificación de ADN; y luego iv) detectar la molécula del amplicón y/o confirmar que la secuencia de nucleótidos del amplicón comprende una secuencia de nucleótidos específica para el evento GM\_CSM63770, tal como una seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6. El amplicón deberá ser uno que sea específico para el evento GM\_CSM63770, tal como un amplicón que comprende SEQ ID NO:1, o SEQ ID NO:2, o SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:5, o SEQ ID NO:6. La detección de una secuencia de nucleótidos específica para el evento de soja GM\_CSM63770 en el amplicón determina y/o es un diagnóstico o una característica de la presencia del ADN específico del evento de soja GM\_CSM63770 en la muestra. Un ejemplo de un par de cebadores que es capaz de producir un amplicón a partir de ADN del evento GM\_CSM63770 en condiciones apropiadas para la amplificación del ADN se proporciona como SEQ ID NO:14 y SEQ ID NO:15. El experto en la técnica puede diseñar fácilmente otros pares de cebadores y

produciría un amplicón que comprende SEQ ID NO:1, o SEQ ID NO:2, o SEQ ID NO:3, o SEQ ID NO:4, o SEQ ID NO:5, o SEQ ID NO:6, donde dicho par de cebadores comprende al menos un cebador dentro de la región genómica que flanquea al inserto y un segundo cebador dentro del inserto. Otro método para detectar la presencia de ADN derivado de una célula de soja, tejido de soja, semilla de soja o planta de soja que comprenden el evento de soja GM\_CSM63770 en una muestra comprende i) extraer una muestra de ADN de al menos una célula de soja, tejido de soja, semilla de soja o planta de soja; ii) contactar la muestra de ADN con una sonda de ADN específica para el ADN del evento GM\_CSM63770; iii) permitir que la sonda y la muestra de ADN hibriden en condiciones de hibridación rigurosas; y luego iv) detectar la hibridación entre la sonda y la muestra de ADN diana. Un ejemplo de la secuencia de una sonda de ADN que es específica para el evento GM\_CSM63770 se proporciona como SEQ ID NO:16. El experto en la técnica puede diseñar fácilmente otras sondas y comprenderían al menos un fragmento del ADN genómico que flanquea el inserto y al menos un fragmento del ADN del inserto tal como una secuencia proporcionada en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8 y SEQ ID NO:10. La detección de hibridación de la sonda con la muestra de ADN es un diagnóstico, o una característica de la presencia del ADN específico del evento de soja GM\_CSM63770 en la muestra. La ausencia de hibridación alternativamente es un diagnóstico, o una característica de la ausencia del ADN específico del evento de soja GM\_CSM63770 en la muestra.

**[0131]** Se proporcionan kits para detección de ADN que son útiles para la identificación de ADN del evento de soja GM\_CSM63770 en una muestra y también se pueden aplicar a métodos para el mejoramiento de plantas de soja que contienen el evento apropiado de ADN. Tales kits contienen cebadores y/o sondas de ADN que comprenden fragmentos de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10. Un ejemplo de tal kit comprende al menos una molécula de ADN con la longitud suficiente de nucleótidos continuos de SEQ ID NO:10 para funcionar como una sonda de ADN útil para detectar la presencia y/o ausencia de ADN derivado de plantas de soja transgénicas que comprenden el evento GM\_CSM63770 en una muestra. El ADN derivado de plantas de soja transgénicas que comprenden el evento GM\_CSM63770 comprendería una molécula de ADN que tiene al menos una secuencia seleccionada entre SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10. Una molécula

de ADN suficiente para usar como una sonda de ADN que es útil para determinar, detectar o diagnosticar la presencia y/o ausencia de ADN del evento de soja GM\_CSM63770 en una muestra se proporciona como SEQ ID NO: 16. Un experto en la técnica puede fácilmente diseñar otras sondas y deberán comprender al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24, al menos 25, al menos 26, al menos 27, al menos 28, al menos 29, al menos 30, al menos 31, al menos 32, al menos 33, al menos 34, al menos 35, al menos 36, al menos 37, al menos 38, al menos 39 o al menos 40 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:10 y ser suficientemente exclusivas del ADN del evento de soja GM\_CSM63770 a fin de identificar ADN derivado del evento.

**[0132]** Otro tipo de kit comprende un par de cebadores para producir un amplicón útil para detectar la presencia y/o ausencia de ADN derivado del evento de soja transgénico GM\_CSM63770 en una muestra. Dicho kit emplearía un método que comprende contactar una muestra de ADN diana con un par de cebadores como se describe en la presente, luego realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico suficiente para producir un amplicón que comprende una molécula de ADN que tiene al menos una secuencia seleccionada entre SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10 y luego detectar la presencia y/o ausencia del amplicón. Tal método puede también incluir la secuenciación del amplicón o un fragmento de este, lo cual determinaría, es decir, sería un diagnóstico o una característica de la presencia del ADN específico del evento de soja GM\_CSM63770 en la muestra de ADN diana. Otros pares de cebadores pueden ser fácilmente diseñados por un experto en la técnica y deberán comprender al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24, al menos 25, al menos 26, al menos 27, al menos 28, al menos 29 o al menos 30 nucleótidos contiguos de secuencias proporcionadas, entre otras, en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10, y ser suficientemente exclusivos para el ADN del evento de soja GM\_CSM63770 para identificar ADN derivado del evento.

**[0133]** Los kits y métodos de detección de la invención son útiles, entre otras cosas, para identificar el evento de soja GM\_CSM63770, seleccionar variedades de plantas o híbridos que comprenden el evento de soja GM\_CSM63770, detectar la presencia de ADN derivado de la planta de soja transgénica que comprende el evento GM\_CSM63770 en una muestra, y monitorear muestras para detectar la presencia y/o la ausencia de plantas de soja que

comprenden el evento GM\_CSM63770, o partes de plantas derivadas de plantas de soja que comprenden el evento GM\_CSM63770.

**[0134]** Las secuencias del inserto heterólogo de ADN, las secuencias de unión, o la secuencia flanqueante del evento de soja GM\_CSM63770 se pueden verificar (y corregir si es necesario) mediante la amplificación de tales secuencias del evento usando cebadores derivados de las secuencias proporcionadas en la presente seguida de la secuenciación estándar del ADN del amplicón o del ADN clonado.

**[0135]** Se proporcionan métodos para detectar la cigosidad del alelo transgénico de ADN derivado de una célula de soja, tejido de soja, semilla de soja o planta de soja que comprende el evento de soja GM\_CSM63770 en una muestra. Un método comprende i) extraer una muestra de ADN de al menos una célula de soja, tejido de soja, semilla de soja, o planta de soja; ii) contactar la muestra de ADN con un par de cebadores que es capaz de producir un primer amplicón que es un diagnóstico o una característica del evento de soja GM\_CSM63770; iii) contactar la muestra de ADN con un par de cebadores que es capaz de producir un segundo amplicón que es un diagnóstico o una característica de ADN genómico nativo de soja que no comprende el evento de soja GM\_CSM63770; iv) realizar una reacción de amplificación de ADN; y luego v) detectar los amplicones, donde la presencia del primer amplicón solamente es un diagnóstico de un ADN homocigoto del evento de soja GM\_CSM63770 en la muestra, y la presencia de ambos, el primer amplicón y el segundo amplicón es un diagnóstico de una planta de soja heterocigota para el alelo del evento de soja GM\_CSM63770. Un conjunto a modo de ejemplo de pares de cebadores se presenta como SEQ ID NO:14 y SEQ ID NO:15 que producen un amplicón que es un diagnóstico o una característica del evento GM\_CSM63770; y SEQ ID NO:20 y SEQ ID NO:15 que producen un amplicón que es un diagnóstico o una característica de que el ADN genómico de soja de tipo silvestre no comprende el evento de soja GM\_CSM63770. También se puede incorporar un conjunto de sondas en dicho método de amplificación para ser usado en un formato de PCR en tiempo real usando los conjuntos de pares de cebadores descritos anteriormente. Un conjunto a modo de ejemplo de sondas se presenta como SEQ ID NO:16 (que es un diagnóstico o una característica del amplicón para el evento de soja GM\_CSM63770) y SEQ ID NO:21 (que es un diagnóstico o una característica del amplicón para ADN genómico de soja de tipo silvestre que no comprende el evento de soja GM\_CSM63770).

**[0136]** Otro método para determinar la cigosidad comprende i) extraer una muestra de ADN de al menos una célula de soja, tejido de soja, semilla de soja o planta de soja; ii) contactar la

muestra de ADN con un conjunto de sondas que contiene al menos una primera sonda que hibrida específicamente con ADN del evento GM\_CSM63770 y al menos una segunda sonda que hibrida específicamente con ADN genómico de soja que fue alterado por la inserción del ADN heterólogo del evento de soja GM\_CSM63770 y no hibrida con ADN del evento de soja GM\_CSM63770; iii) hibridar el conjunto de sondas con la muestra en condiciones de hibridación rigurosas, donde la detección de la hibridación de la primera sonda solamente en las condiciones de hibridación es un diagnóstico o una característica de un alelo homocigoto de ADN del evento de soja GM\_CSM63770 en la muestra; y donde la detección de la hibridación de ambas, la primera sonda y la segunda sonda en las condiciones de hibridación es un diagnóstico o una característica de un alelo heterocigoto del evento de soja GM\_CSM63770 en una muestra de ADN.

**[0137]** Inclusive otro método para determinar la cigosidad comprende i) extraer una muestra de ADN de al menos una célula de soja, tejido de soja, semilla de soja o planta de soja, ii) contactar la muestra de ADN con un par de cebadores que es capaz de producir un amplicón que es un diagnóstico o una característica del alelo del evento de soja GM\_CSM63770; iii) contactar la muestra de ADN con un par de cebadores que es capaz de producir un amplicón de un estándar interno del que se sabe que es una copia individual y homocigoto en la planta de soja; iv) contactar la muestra de ADN con un conjunto de sonda que contiene al menos una primera sonda que hibrida específicamente con el alelo del evento GM\_CSM63770, y al menos una segunda sonda que hibrida específicamente con el ADN genómico del estándar interno del que se sabe que es una copia individual y homocigoto en la planta de soja; v) realizar una reacción de amplificación de ADN usando PCR en tiempo real y determinar el valor umbral del número de ciclos (valores Ct) del amplicón correspondiente a la secuencia codificadora de toxina y el estándar interno homocigoto, copia individual; vi) calcular la diferencia ( $\Delta Ct$ ) entre el valor Ct de la copia individual, amplicón estándar interno homocigoto y el valor Ct del amplicón de la secuencia codificadora de toxina; y vii) determinar la cigosidad, donde un  $\Delta Ct$  alrededor de cero (0) indica homocigosidad del ADN-T insertado y un  $\Delta Ct$  alrededor de uno (1) indica heterocigosidad del ADN-T insertado. Los eventos heterocigotos y homocigotos están diferenciados por una unidad de valor  $\Delta Ct$  de aproximadamente uno (1). Dada la variabilidad normal observada en la PCR en tiempo real debido a múltiples factores tales como la eficiencia de la amplificación y las temperaturas ideales de apareamiento, el rango de “aproximadamente uno (1)” se define como un  $\Delta Ct$  de 0,75 a 1,25. Los pares de cebadores y las sondas para el método anterior para determinar la cigosidad pueden amplificar y detectar

amplicones del alelo del evento GM\_CSM63770 y del estándar interno. Los pares de cebadores a modo de ejemplo para detectar los amplicones correspondientes al alelo del evento GM\_CSM63770 y el estándar interno se presentan como SEQ ID NO:14 combinado con SEQ ID NO:15 (alelo del evento GM\_CSM63770) y SEQ ID NO:17 combinado con SEQ ID NO:18 (estándar interno). Las sondas a modo de ejemplo adjuntas se presentan como SEQ ID NO:16 (alelo del evento GM\_CSM63770) y SEQ ID NO:19 (estándar interno).

### **INFORMACIÓN RELATIVA AL DEPÓSITO**

**[0138]** El 21 de agosto de 2019, de acuerdo con el Tratado de Budapest con la Asociación Estadounidense de Cultivos Tipo (ATCC) con domicilio en 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia EE.UU., Código postal 20110, se realizó el depósito de una muestra representativa de la semilla de soja que contiene el evento GM\_CSM63770 a la cual se le asignó el Nro. de Acceso ATCC PTA-126048. El acceso a los depósitos estará disponible a pedido del Comisario de Patentes y Marcas de los EE.UU. y de las personas que el Comisario determine con derecho a tal efecto, mientras se encuentre pendiente la solicitud de patente. Luego de la emisión de la patente, todas las restricciones respecto de la disponibilidad al público serán irrevocablemente eliminadas. El depósito se mantendrá en la ATCC durante un período de treinta (30) años, o cinco (5) años luego de la última solicitud, o durante la vida efectiva de la patente, el que resulte más largo, y se reemplazará según sea necesario durante ese período.

### **EJEMPLOS**

**[0139]** Los Ejemplos a continuación se incluyen para describir la invención de forma más completa. Se sintetiza la construcción y el ensayo de 125 constructos, la producción de 3.343 eventos, y el análisis de cientos de miles de plantas individuales durante 6 años a través de rigurosos ensayos moleculares, agronómicos y de campo requeridos para la creación y selección del evento de soja GM\_CSM63770.

[0140] En vista de la presente divulgación, los expertos en la técnica apreciarán que se pueden realizar numerosos cambios en las realizaciones específicas que se divulgan y aún obtener un resultado similar sin apartarse del espíritu ni del alcance de la invención.

### **EJEMPLO 1**

**Ensayo de casete de expresión, diseño de constructo, selección de constructo, caracterización molecular, ensayo de eficacia, pruebas a campo y selección del Evento.**

[0141] A menudo es necesario crear y cribar un gran número de constructos de expresión génica y eventos de transformación a fin de identificar un constructo, y luego un evento, que demuestre expresión óptima de los genes de interés introducidos, mientras además no se producen desvíos fuera de tipo agronómicos o fenotípicos.

[0142] Por estas razones, el desarrollo de una planta de soja transgénica que comprende proteínas insecticidas que fueran activas frente a lepidópteros sin ningún efecto negativo sobre las características agronómicas, el rendimiento o la viabilidad de apilamiento requirió de extensa investigación, desarrollo y análisis. Específicamente, en un período de 6 años, aproximadamente 3.343 pruebas de concepto y eventos transgénicos comerciales derivados de 125 constructos de vectores plasmídicos fueron desarrollados, ensayados y analizados.

[0143] Este Ejemplo describe el diseño y ensayo en plantas de soja de 125 constructos diferentes, para identificar el constructo preferido para la creación del evento. Cada constructo varió con respecto a las secuencias de codificación para las proteínas insecticidas y los elementos reguladores de transcripción, y estos fueron ensayados para seleccionar el constructo preferido para usar en la expresión de proteínas insecticidas en plantas. Cada constructo tuvo una configuración única, que varió en la composición del casete de expresión (las proteínas insecticidas y los elementos de expresión), la orientación, y si las proteínas estaban o no dirigidas para insertarse en el cloroplasto.

[0144] En una prueba de concepto y etapa de desarrollo inicial, se usaron 121 constructos que comprendían diferentes combinaciones de 29 promotores distintos, 1 potenciador, 16 intrones distintos, y 21 secuencias distintas codificadoras de toxinas insecticidas, y 10 UTR 3' distintas para generar aproximadamente 992 eventos transformados. Se evaluaron estos eventos para determinar desvíos fenotípicos o agronómicos fuera de tipo, el nivel de expresión de las toxinas proteicas insecticidas, y la eficacia contra especies de insectos lepidópteros plaga seleccionadas. Se emplearon la eficacia resultante y los datos de expresión de proteínas, junto con cualquier información respecto desvíos fenotípicos y agronómicos fuera de tipo para

eliminar proteínas ineficaces, elementos de expresión y combinaciones, y se usaron para diseñar un número menor de constructos plasmídicos de transformación comerciales binarios para ser usados en la siguiente fase de desarrollo.

**[0145]** En la fase siguiente de desarrollo se crearon 4 nuevos constructos comerciales. Estos constructos comprendían combinaciones de 2 a 3 casetes de expresión transgénicos de toxinas insecticidas en diferentes orientaciones (convergente o divergente). Uno de los constructos se eliminó antes de la transformación sobre la base de estudios del modo de acción de una de las toxinas proteicas insecticidas expresadas en el constructo. Los 3 restantes, pM63770, Constructo-2 y Constructo-3 se usaron para generar eventos transformados (también denominados “transformantes”). La Tabla 2 a continuación muestra la selección de eventos y procesos de eliminación para los tres eventos transformados de constructos comerciales.

**Tabla 2. Selección de eventos y eliminación de eventos de soja establemente transformados, que llevan a la selección de GM\_CSM63770.**

|                                                       | Constructo pM63770 |                        | Constructo-2      |                        | Constructo-3      |                        |
|-------------------------------------------------------|--------------------|------------------------|-------------------|------------------------|-------------------|------------------------|
| <b>Etapas de análisis</b>                             | <b>Eliminados</b>  | <b>Total remanente</b> | <b>Eliminados</b> | <b>Total remanente</b> | <b>Eliminados</b> | <b>Total remanente</b> |
| Eventos insertados                                    | 3780               |                        | 6911              |                        | 3696              |                        |
| Trasplantados al suelo                                | 2760               | 1020                   | 6509              | 402                    | 2767              | 929                    |
| Descartados, no sobrevivieron                         | 860                | 160                    | 220               | 182                    | 797               | 132                    |
| Molecular y eficacia R <sub>0</sub>                   | 115                | 45                     | 118               | 64                     | 94                | 38                     |
| Molecular R <sub>1</sub>                              | 13                 | 32                     | 19                | 45                     | 12                | 26                     |
| Cigiosidad R <sub>1</sub>                             | 9                  | 23                     | 16                | 29                     | 7                 | 19                     |
| Molecular pre-GSS, desempeño, madurez R <sub>1</sub>  | 13                 | 10                     | 8                 | 21                     | 19                | 0                      |
| Molecular GSS R <sub>2</sub> , con el menor desempeño | 1                  | 9                      | 7                 | 14                     |                   |                        |
| Rendimiento                                           | 1                  | 8                      | 1                 | 13                     |                   |                        |

|                                             | Construto pM63770 |                 | Construto-2 |                 | Construto-3 |                 |
|---------------------------------------------|-------------------|-----------------|-------------|-----------------|-------------|-----------------|
| Etapas de análisis                          | Eliminados        | Total remanente | Eliminados  | Total remanente | Eliminados  | Total remanente |
| Cruzamiento fallido                         | 1                 | 7               | 0           | 13              |             |                 |
| Prueba de campo, molecular, rendimiento     | 5                 | 2               | 12          | 1               |             |                 |
| Molecular eSouthern y secuencia flanqueante | 1                 | 1               |             |                 |             |                 |
| Evento seleccionado                         |                   | GM_CSM63770     |             |                 |             |                 |

[0146] Después de la formación de brotes en cultivo, se seleccionó un subconjunto de los eventos transformados sobre la base de las características visuales y un análisis molecular temprano. Después de la transformación, se transfirieron 12.036 transformantes a placas de cultivo que contenían medio selectivo (también denominados “insertados”). Después de la caracterización molecular inicial fueron eliminados 9.685. De los 2.351 eventos restantes 1.877 fueron eliminados sobre la base de observaciones sobre la salud y supervivencia de las plantas. Los restantes 474 eventos R<sub>0</sub> fueron trasplantados a macetas y se cultivaron en el invernadero (GH) para ensayos ulteriores. Se evaluaron los 474 eventos para determinar características moleculares y eficacia, y sobre la base de estos estudios, se eliminaron 327 eventos.

[0147] Se permitió la autopolinización de los restantes 147 eventos R<sub>0</sub>, produciendo la semilla R<sub>1</sub>. Los eventos R<sub>1</sub> ulteriormente se caracterizaron molecularmente, se evaluaron para determinar cigosidad, desempeño y madurez. A partir de este análisis, se eliminaron 116 eventos. En este punto de la selección, también se observó que los eventos derivados del Construto-3 no satisfacían los criterios para avanzar, y este construto y sus eventos asociados se eliminaron de los ensayos y análisis ulteriores. Los 9 eventos restantes derivados del construto pM63770 y 14 eventos del Construto-2 fueron seleccionados para ulterior caracterización molecular y evaluación en estudios de campo.

**[0148]** Durante la generación R<sub>2</sub>, los eventos fueron evaluados adicionalmente con respecto a las características moleculares y el desempeño. Durante la temporada de cultivo Argentina de 2017 a 2018, se evaluaron 23 eventos (9 eventos derivados del constructo pM63770 y 14 eventos del Constructo-2) para determinar su eficacia en pruebas de invernadero cubierto con mallas y a campo, y características agronómicas en pruebas a campo. Se eliminó 1 evento derivado del constructo pM63770 y 7 eventos derivados del Constructo-2 también fueron eliminados sobre la base de los criterios R<sub>2</sub> (características moleculares y eficacia). Se eliminó 1 evento derivado de cada uno de los dos constructos sobre la base de mediciones de rendimiento. Se eliminó otro evento derivado del constructo pM63770 luego del fracaso del cruzamiento con material germoplasmático de elite.

**[0149]** Los restantes 20 eventos, 7 derivados del constructo pM63770 y 13 derivados del Constructo-2 fueron evaluados para determinar su eficacia en invernadero con mallas y pruebas a campo y pruebas agronómicas a campo. Además, se realizaron estudios moleculares adicionales que incluyeron identificación del locus de inserción del ADN-T para cada evento, genes vecinos, y secuencias repetitivas cercanas al locus de inserción. Después de revisar los datos sobre eficacia y características agronómicas, como así también la caracterización molecular más fina, se eliminaron 5 eventos derivados del constructo pM63770 y 12 eventos derivados del Constructo-2, dejando solo 2 eventos derivados del constructo pM63770 y 1 evento derivado del Constructo-2. 1 evento derivado del constructo pM63770 fue eliminado luego de revisar los detalles de la secuencia flanqueante proporcionados por datos del análisis Southern electrónico (eSouthern). Se seleccionó el evento GM\_CSM63770 derivado del constructo pM63770 como el producto comercial sobre la base de la comparación final de rendimiento, eficacia y características moleculares entre cada evento individual remanente derivado del constructo pM63770 y el Constructo-2.

**[0150]** Por lo tanto, numerosas rondas de ensayos y comparaciones de diversos constructos revelaron que el casete transgénico proporcionado como SEQ ID NO:13, Constructo pM63770, en comparación con eventos producidos con todos los demás constructos evaluados, produjo eventos que exhibieron eficacia superior contra las especies de insectos lepidópteros plaga gusano elotero de la soja (SPW, *Helicoverpa zea*), gusano falso medidor de la soja (*Chrysodeixis includens*), gusano terciopelo de las leguminosas (*Anticarsia gemmatilis*), oruga militar del sur (*Spodoptera eridania*), oruga militar negra (*Spodoptera cosmioides*), oruga bolillera sudamericana (*Helicoverpa gelatopoeon*), oruga medidora del girasol (*Rachiplusia nu*), polilla del brote del poroto (*Crociosema aporema*), gusano verde del trébol (*Hypena*

*scabra*) y barrenador menor del tallo (*Elasmopalpus lignosellus*). El evento de soja GM\_CSM63770 fue seleccionado entre el amplio grupo de eventos generados usando este constructo pM63770, sobre la base de sus características superiores con respecto a la eficacia y al desempeño agronómico en comparación con todos los otros eventos generados usando este constructo.

## EJEMPLO 2

**El evento de soja GM\_CSM63770 demuestra resistencia a los insectos lepidópteros plaga gusano elotero de la soja, gusano falso medidor de la soja, gusano terciopelo de las leguminosas, oruga militar del sur, oruga militar negra, oruga bolillera sudamericana, oruga medidora del girasol, polilla del brote del poroto, gusano verde del trébol y barrenador menor del tallo.**

[0151] Este Ejemplo describe la actividad del evento de soja GM\_CSM63770 contra diversos insectos lepidópteros plaga de la soja. Las toxinas proteicas insecticidas Cry1A.2 y Cry1B.2, cuando se expresan juntas en el evento de soja GM\_CSM63770, proporcionan resistencia frente al gusano elotero de la soja (SPW, *Helicoverpa zea*), gusano falso medidor de la soja (SBL, *Chrysodeixis includens*), gusano terciopelo de las leguminosas (VBC, *Anticarsia gemmatilis*), oruga militar del sur (SAW, *Spodoptera eridania*), oruga militar negra (BLAW, *Spodoptera cosmioides*), oruga bolillera sudamericana (SAPW, *Helicoverpa gelotopoeon*), oruga medidora del girasol (SFL, *Rachiplusia nu*), polilla del brote del poroto (BSM, *Crociosema aporema*), gusano verde del trébol (GCW, *Hypena scabra*) y barrenador menor del tallo (LCSB, *Elasmopalpus lignosellus*).

[0152] Se realizaron pruebas en invernadero cubierto con mallas en tres localizaciones para evaluar la resistencia frente a la oruga militar del sur (SAW, *Spodoptera eridania*), gusano terciopelo de las leguminosas (VBC, *Anticarsia gemmatilis*) y gusano elotero de la soja (SPW, *Helicoverpa zea*). Se evaluó el evento de soja GM\_CSM63770 junto con eventos derivados de transformaciones de constructos, pM63770, Constructo-2, y Constructo-3 usando un diseño aleatorizado de bloque completo. Cada lote de evento se plantó en una fila de 183 cm (6 pies) con aproximadamente 8 semillas cada 30 cm (1 pie). Cada evento tuvo 3 repeticiones; por lo tanto, cada evento estuvo representado en el invernadero cubierto con mallas por 3 lotes separados, ubicados de forma aleatoria dentro del invernadero. Un evento no transformado sirvió como control negativo, a cuyos lotes también se les asignaron aleatoriamente localizaciones dentro del invernadero cubierto con mallas.

**[0153]** La infestación con SPW y VBC se realizó usando polillas adultas. Los insectos se criaron hasta pupas en un insectario en jaulas de emergencia para adultos, mantenidos en incubadoras con clima controlado. Los insectos fueron liberados en el invernadero cubierto con mallas. Se utilizaron para cada liberación en los invernaderos cubiertos con mallas aproximadamente 1.200 a 2.000 adultos. Para SPW, los adultos fueron liberados en el invernadero cada semana desde el estadio R1 a R2 del desarrollo de la soja. Con respecto a VBC, los adultos fueron liberados en el invernadero cada dos semanas entre el desarrollo de los estadios V4 a R3. Se liberaron cada vez en los invernaderos cubiertos con mallas aproximadamente 1.200 a 2.000 adultos. Las polillas adultas requirieron acceso continuo a una solución de sacarosa al 10 por ciento para lograr longevidad y fecundidad normales. Se llenaron contenedores de comida plásticos con algodón absorbente y luego se vertió la solución de azúcar en el contenedor hasta saturar completamente el algodón. La solución de azúcar se repuso diariamente hasta que la actividad adulta se volvió menos intensa, lo cual ocurrió usualmente alrededor de 2 semanas después de la liberación final de adultos.

**[0154]** Para SAW se usó infestación directa con huevos dado que este insecto no deposita sus huevos en la soja de manera preferencial o uniforme. Para cada infestación se utilizaron aproximadamente 250.000 a 320.000 huevos aplicados cada dos semanas desde el estadio R1 a R3 del desarrollo. Se colocaron en las plantas trozos de papel que contenían igual número de huevos SAW plegando el papel sobre un peciolo de hoja firme en la canopia superior y asegurando el papel mediante grapado. Se colocó 1 papel en una planta dentro de los 30 cm (1 pie) del extremo delantero del lote, un segundo papel se colocó en una planta en el medio del lote, y un tercer papel se colocó en una planta dentro de los 30 cm (1 pie) del extremo trasero del lote.

**[0155]** Se evaluó la defoliación por parte de cada uno de los tres insectos dos veces después de cada infestación: una vez aproximadamente 2 semanas después de la infestación y nuevamente aproximadamente cuatro semanas después de la infestación. Luego de cada evaluación se registraron el estadio de crecimiento de planta y el porcentaje de defoliación. Para determinar el porcentaje de defoliación, se dividió la canopia de cada lote en 5 zonas. Se seleccionó una hoja trifoliada de cada zona que exhibía daños representativos de la zona de la cual se seleccionaba. El porcentaje de defoliación se determinó usando una figura con el diagrama de daños proporcionada a cada evaluador. El porcentaje promedio de defoliación se calculó a partir del promedio de una sola hoja trifoliada seleccionada de cada una de las 5 zonas. La producción de vainas y el daño por SPW se determinó cuando las plantas de soja alcanzaron la

madurez. Se seleccionaron cinco plantas al azar de cada lote y se registró en número total de vainas y el número de vainas dañadas en cada planta. A partir del muestreo de las 5 plantas se determinó el número medio de vainas y el porcentaje medio de vainas dañadas. La Tabla 3 a continuación muestra el porcentaje medio de defoliación evaluado para el evento de soja GM\_CSM63770 y el control negativo para los tres insectos, SAW, VBC y SPW. La Tabla 4 a continuación muestra el número medio de vainas y el porcentaje medio de vainas dañadas provocado por SPW.

**Tabla 3. Porcentaje medio de defoliación para el evento de soja GM\_CSM63770 y control negativo infestados con SAW, VBC y SPW en pruebas en invernadero cubierto con mallas en 2017 en EE.UU.**

|            |             | % medio de defoliación |     |     |     |             |           |     | Reducción % |
|------------|-------------|------------------------|-----|-----|-----|-------------|-----------|-----|-------------|
|            | Evento      | R1                     | R2  | R3  | R4  | R5 temprano | R5 tardío | Máx |             |
| <b>SAW</b> | Negativo    | -                      | 2%  | 30% | 45% | 63%         | 58%       | 63% | -           |
|            | GM_CSM63770 | -                      | 0%  | 1%  | 0%  | 0%          | 1%        | 1%  | 98%         |
| <b>VBC</b> | Negativo    | -                      | 30% | 34% | -   | -           | -         | 34% | -           |
|            | GM_CSM63770 | -                      | 0%  | 0%  | -   | -           | -         | 0%  | 100%        |
| <b>SPW</b> | Negativo    | 7%                     | 13% | -   | 26% | 27%         | -         | 27% | -           |
|            | GM_CSM63770 | 1%                     | 3%  | -   | 11% | 10%         | -         | 11% | 60          |

**Tabla 4. Número medio de vainas y porcentaje medio de vainas dañadas para el evento de soja GM\_CSM63770 y control negativo infestados con SPW en pruebas en invernadero cubierto con mallas en 2017 en EE.UU.**

| Evento      | Número medio de vainas | % promedio de dañadas | Reducción % de daño de vainas |
|-------------|------------------------|-----------------------|-------------------------------|
| Negativo    | 25                     | 8%                    | -                             |
| GM_CSM63770 | 47                     | 5%                    | 36%                           |

[0156] Como se puede observar en la Tabla 3 precedente, el evento de soja GM\_CSM63770 proporcionó resistencia superior a SAW, VBC y SPW en comparación con el control negativo. Además, como se puede observar en la Tabla 4, el evento de soja GM\_CSM63770 demostró un porcentaje reducido de vainas dañadas en relación con el control negativo.

[0157] Se realizaron pruebas de eficacia en invernadero cubierto con mallas y a campo. Cada lote en el invernadero comprendía una fila de 42 semillas en una fila de 2 metros. Cada evento estaba representado por 3 repeticiones ubicadas de forma aleatoria dentro del invernadero cubierto con mallas. Las pruebas en invernadero se realizaron contra los insectos lepidópteros plaga gusano terciopelo de las leguminosas (VBC, *Anticarsia gemmatilis*), oruga militar negra (BLAW, *Spodoptera cosmioides*), oruga bolillera sudamericana (SAPW, *Helicoverpa gelotopoeon*), y oruga medidora del girasol (SFL, *Rachiplusia nu*). Se liberaron aproximadamente 500 polillas adultas en el invernadero en cada infestación. Se realizaron dos infestaciones, la primera en el estadio de desarrollo V3 y la segunda en el estadio de desarrollo R2. Las polillas adultas se mantuvieron como se describió anteriormente usando una solución de azúcar al 10 por ciento para saturar algodón absorbente en un recipiente. Se determinó el porcentaje de defoliación como se describió anteriormente. La Tabla 5 a continuación muestra el porcentaje medio de defoliación determinado para el evento de soja GM\_CSM63770 y el control negativo.

**Tabla 5. Porcentaje medio de defoliación para el evento de soja GM\_CSM63770 y control negativo infestados con BLAW, SAPW, SBL y SFL.**

|             |             | % medio de defoliación |     |     |     |      |      | Reducción % |
|-------------|-------------|------------------------|-----|-----|-----|------|------|-------------|
|             | Evento      | V3                     | V4  | V5  | R3  | R5   | Máx  |             |
| <b>BLAW</b> | Negativo    | 9%                     | 28% | -   | 33% | 39%  | 39%  | -           |
|             | GM_CSM63770 | 0%                     | 0%  | -   | 0%  | 0%   | 0%   | 100%        |
| <b>SAPW</b> | Negativo    | -                      | 16% | 29% | 38% | 48 % | 48 % | -           |
|             | GM_CSM63770 | -                      | 1%  | 1%  | 3%  | 2%   | 3%   | 94%         |
| <b>SBL</b>  | Negativo    | 9%                     | 13% | -   | -   | -    | 13%  | -           |
|             | GM_CSM63770 | 0%                     | 0%  | -   | -   | -    | 0%   | 100%        |
| <b>SFL</b>  | Negativo    | -                      | 10% | 17% | 21% | 37%  | 37%  | -           |
|             | GM_CSM63770 | -                      | 0%  | 0%  | 0%  | 0%   | 0%   | 100%        |

**[0158]** Como se puede observar en la Tabla 5 precedente, el evento de soja GM\_CSM63770 demostró muy buena resistencia frente a BLAW, SAPW, SBL y SFL en comparación con el control negativo.

**[0159]** También se realizaron pruebas de eficacia a campo en seis localizaciones diferentes (A-F). Cada lote comprendía filas de 4, 10 metros con 25 semillas por metro separadas aproximadamente por 1 metro. Cada evento tuvo 3 lotes de réplica ubicados aleatoriamente dentro del campo. Se realizó un muestreo en los campos para determinar los tipos de especies lepidópteras y sus respectivos porcentajes en cada campo. Las especies de lepidópteros observadas en el campo fueron gusano terciopelo de las leguminosas (VBC, *Anticarsia gemmatalis*), las especies medidoras (SBL/SFL) gusano falso medidor de la soja (SBL, *Chrysodeixis includens*) oruga medidora del girasol (SFL, *Rachiplusia nu*), Spodoptera spp. (SPO), y oruga bolillera sudamericana (SAPW, *Helicoverpa gelotopoeon*). El monitoreo de los insectos comenzó al inicio del estadio V3 en las filas del borde no transgénico con al menos 10 muestras distribuidas uniformemente alrededor del borde. El muestreo se realizó en las filas del borde cada 7 a 10 días. El monitoreo continuó hasta el estadio R6 en que se completó el relleno de la vaina. La defoliación se determinó de manera similar a las pruebas en invernadero cubierto con mallas. El daño de las vainas también se determinó de manera similar a los experimentos en invernadero. Además, también se registró el número de larvas por metro de una fila de la plantación. Un menor número de larvas de lepidópteros presentes sobre los eventos transformados en comparación con plantas del control negativo es una indicación de resistencia, dado que las plantas resistentes matarán a las larvas jóvenes, dejando que pocas larvas permanezcan sobre la planta. La Tabla 6 a continuación muestra la defoliación máxima, larvas acumuladas por metro de fila, y el porcentaje medio de vainas dañadas. Además, también se proporciona el porcentaje de cada especie de lepidópteros para cada localización.

**[0160]** Como se puede observar en la Tabla 6 a continuación, el evento de soja GM\_CSM63770 demostró resistencia superior a lepidópteros en el campo con infestaciones naturales en comparación con el control negativo. Las principales especies de lepidópteros plaga en la mayoría de los campos fueron VBC y SBL/SFL. Una localización tuvo un gran porcentaje de SAPW y un porcentaje escaso o nulo de VBC. De los resultados a continuación surge que GM\_CSM63770 fue eficaz frente a VBC, SBL/SFL y SAPW y demostró mediante la reducción del porcentaje de defoliación, menores cantidades de larvas acumuladas por metro de fila, y una reducción en el daño de las vainas.

**Tabla 6. Defoliación máxima, acumulación de larvas, y porcentaje medio de daño de vainas para el evento de soja GM\_CSM63770 y control negativo en condiciones naturales de infestación a campo.**

| <b>Ubicación</b> | <b>Insectos</b>                              | <b>Evento</b> | <b>% máx defoliación</b> | <b>Reducción % defoliación</b> | <b>Larvas acumuladas/m de fila</b> | <b>Reducción % de larvas</b> | <b>Nro. medio de vainas por planta</b> |
|------------------|----------------------------------------------|---------------|--------------------------|--------------------------------|------------------------------------|------------------------------|----------------------------------------|
| <b>A</b>         | VBC-64%<br>SBL/SFL-20%<br>SPO-13%<br>SAPW-3% | Negativo      | 13                       | -                              | 9,3                                | -                            | 31,3                                   |
|                  |                                              | GM_CSM63770   | 2                        | 85%                            | 1,2                                | 87%                          | 30,3                                   |
| <b>B</b>         | SBL/SFL-60%<br>SAPW-40%                      | Negativo      | 3                        | -                              | 6,7                                | -                            | 37,2                                   |
|                  |                                              | GM_CSM63770   | 0                        | 100%                           | 0,0                                | 100%                         | 32,6                                   |
| <b>C</b>         | VBC-67%<br>SBL/SFL-23%<br>SPO-9%             | Negativo      | 16                       | -                              | 19,4                               | -                            | 24,0                                   |
|                  |                                              | GM_CSM63770   | 3                        | 81%                            | 3,8                                | 80%                          | 23,3                                   |
| <b>D</b>         | SBL/SFL-67%<br>SAPW-22%<br>SPO-10%<br>VBC-1% | Negativo      | 8                        | -                              | 9,9                                | -                            | 25,3                                   |
|                  |                                              | GM_CSM63770   | 5                        | 37%                            | 0,0                                | 100%                         | 30,7                                   |
| <b>E</b>         | VBC-86%<br>SBL/SFL-11%<br>SPO-3%             | Negativo      | 15                       | -                              | 8,4                                | -                            | 18,8                                   |
|                  |                                              | GM_CSM63770   | 7                        | 53%                            | 0,5                                | 94%                          | 25,2                                   |
| <b>F</b>         | SBL/SFL-62%<br>VBC-23%<br>SPO-8%<br>SAPW-7%  | Negativo      | 15                       | -                              | 6,2                                | -                            | 23,6                                   |
|                  |                                              | GM_CSM63770   | 1                        | 93%                            | 0,3                                | 95%                          | 18,2                                   |

[0161] También se examinaron las plantas en las dos ubicaciones para determinar el daño ocasionado por la polilla del brote del poroto (BSM, *Crociosema aporema*). Se seleccionaron aleatoriamente diez plantas de cada uno de los tres lotes para cada evento. El daño porcentual promedio para los controles en la ubicación 1 y la ubicación 2 fue 6 por ciento y 4,7 por ciento, respectivamente. El evento de soja GM\_CSM63770 no mostró daños en la ubicación 1 y solo 0,3 por ciento de daños en la ubicación 2.

[0162] Se realizaron pruebas de eficacia en invernadero cubierto con mallas en múltiples ubicaciones frente a las especies de insectos lepidópteros plaga oruga militar del sur (SAW, *Spodoptera eridania*) gusano falso medidor de la soja (SBL, *Chrysodeixis includens*) gusano elotero de la soja (SPW, *Helicoverpa zea*), y gusano terciopelo de las leguminosas (VBC, *Anticarsia gemmatilis*). Las infestaciones por SBL, SPW y VBC se realizaron usando polillas adultas según se describió anteriormente. Las infestaciones por SAW se realizaron mediante infestación por huevos según se describió anteriormente. La defoliación se determinó según se describió anteriormente. El tamaño de los lotes y las repeticiones también fueron como se describió anteriormente. La Tabla 7 muestra la frecuencia de infestación, los estadios en los cuales se produjeron las infestaciones, el porcentaje máximo de defoliación, y el porcentaje de reducción de la defoliación correspondiente al evento GM\_CSM63770 en comparación con el control negativo.

**Tabla 7. Frecuencia de infestación y estadios, y porcentaje máximo de defoliación y reducción para el evento de soja GM\_CSM63770 y el control negativo infestados con SAW, SBL, SPW y VBC.**

| Insecto | Ubicación | Evento      | Frecuencia de infestación | Estadios de desarrollo de las infestaciones | % máx defoliación | Reducción % |
|---------|-----------|-------------|---------------------------|---------------------------------------------|-------------------|-------------|
| SAW     | G         | Negativo    | Cada dos semanas          | R1-R3                                       | 80%               | -           |
|         |           | GM_CSM63770 | Cada dos semanas          | R1-R3                                       | 0%                | 100%        |
| SBL     | H         | Negativo    | Cada dos semanas          | V5-R2                                       | 23%               | -           |

| <b>Insecto</b> | <b>Ubicación</b> | <b>Evento</b> | <b>Frecuencia de infestación</b> | <b>Estadios de desarrollo de las infestaciones</b> | <b>% máx defoliación</b> | <b>Reducción %</b> |
|----------------|------------------|---------------|----------------------------------|----------------------------------------------------|--------------------------|--------------------|
|                |                  | GM_CSM63770   | Cada dos semanas                 | V5-R2                                              | 0%                       | 100%               |
|                |                  | Negativo      | Cada dos semanas                 | R3-R5                                              | 41%                      | -                  |
|                |                  | GM_CSM63770   | Cada dos semanas                 | R3-R5                                              | 0%                       | 100%               |
|                | G                | Negativo      | Cada dos semanas                 | V5-R2                                              | 75%                      | -                  |
|                |                  | GM_CSM63770   | Cada dos semanas                 | V5-R2                                              | 1%                       | 99%                |
| <b>SPW</b>     | I                | Negativo      | Semanal                          | R1-R2                                              | 16%                      | -                  |
|                |                  | GM_CSM63770   | Semanal                          | R1-R2                                              | 2%                       | 91%                |
| <b>VBC</b>     | I                | Negativo      | Cada dos semanas 2x              | V5-R2                                              | 20%                      | -                  |
|                |                  | GM_CSM63770   | Cada dos semanas 2x              | V5-R2                                              | 0%                       | 100%               |

**[0163]** Como se puede observar en la Tabla 7 precedente, el evento de soja GM\_CSM63770 fue eficaz frente a SAW, SBL, SPW y VBC como lo demuestra el bajo porcentaje máximo de defoliación y la reducción porcentual de la defoliación en relación con el control negativo. En estos estudios, el evento de soja GM\_CSM63770 proporcionó resistencia frente a oruga militar del sur (SAW, *Spodoptera eridania*), gusano falso medidor de la soja (SBL, *Chrysodeixis includens*), gusano elotero de la soja (SPW, *Helicoverpa zea*) y gusano terciopelo de las leguminosas (VBC, *Anticarsia gemmatilis*).

**[0164]** Se realizaron pruebas de eficacia a campo frente a la presión natural de lepidópteros en cinco ubicaciones diferentes (J-N). Cada lote comprendía aproximadamente 4 filas de 7,62 metros (25 pies) con aproximadamente 8 semillas cada 30 cm (1 pie). Cada evento estuvo representado por 4 lotes ubicados aleatoriamente dentro del campo. Las mediciones de defoliación se realizaron de manera similar a la descrita anteriormente y se realizaron

aproximadamente cada 10 días en los estadios de desarrollo R1 a R6. El daño a las vainas se evaluó luego de la aparición del máximo daño en los controles negativos. Se seleccionaron aleatoriamente 5 plantas por cada evento para evaluar el daño a las vainas. Las evaluaciones de las poblaciones de especies de lepidópteros se realizaron durante los estadios de desarrollo R1 a R6. Se halló que uno o más campos estaban infestados por gusano terciopelo de las leguminosas (VBC, *Anticarsia gemmatilis*), gusano falso medidor de la soja (SBL, *Chrysodeixis includens*), gusano elotero de la soja (SPW, *Helicoverpa zea*), gusano verde del trébol (GCW, *Hypena scabra*), gusano militar de rayas amarillas (YAW, *Spodoptera ornithogalli*) y gusano militar de la remolacha (BAW, *Spodoptera exigua*). También se determinó para cada evento el número de larvas acumuladas por metro de fila. La Tabla 8 a continuación muestra el porcentaje de especies de lepidópteros para cada sitio junto con el porcentaje máximo y la reducción en la defoliación y el número acumulado de larvas por metro de fila y el porcentaje de reducción de larvas.

**Tabla 8. Especies lepidópteras, porcentaje máximo y reducción de defoliación, número acumulado y porcentaje de reducción de larvas para el evento de soja GM\_CSM63770 y control negativo en campos con infestación natural.**

| Ubicación | Insectos                                                  | Evento      | % máx defoliación | Reducción % defoliación | Larvas acumuladas/m de fila | Reducción % de larvas |
|-----------|-----------------------------------------------------------|-------------|-------------------|-------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| J         | VBC-45%<br>SBL-30%<br>GCW-23%<br>YAW-2%                   | Negativo    | 31%               | -                       | 29,8                        | -                     |
|           |                                                           | GM_CSM63770 | 0                 | 100%                    | 0,4                         | 99%                   |
| K         | SBL-85%<br>VBC-1%<br>GCW-2%<br>SPW-8%<br>BAW-2%<br>YAW-1% | Negativo    | 13%               | -                       | 25,9                        | -                     |
|           |                                                           | GM_CSM63770 | 0%                | 100%                    | 0,2                         | 99%                   |
| L         |                                                           | Negativo    | 50%               | -                       | 183,5                       | -                     |

| Ubicación | Insectos                                         | Evento      | % máx defoliación | Reducción % defoliación | Larvas acumuladas/m de fila | Reducción % de larvas |
|-----------|--------------------------------------------------|-------------|-------------------|-------------------------|-----------------------------|-----------------------|
|           | SBL-62%<br>VBC-33%<br>GCW-5%                     | GM_CSM63770 | 1%                | 99%                     | 0,3                         | 100%                  |
| M         | GCW-65%<br>SBL-29%<br>VBC-4%<br>SPW-1%<br>BAW-1% | Negativo    | 5%                | -                       | 21,4                        | -                     |
|           |                                                  |             |                   |                         |                             |                       |
|           |                                                  | GM_CSM63770 | 0%                | 100%                    | 0,0                         | 100%                  |
| N         | SBL-93%<br>SPW-5%<br>SMC-1%<br>GCW-1%            | Negativo    | 34%               | -                       | 26,7                        | -                     |
|           |                                                  |             |                   |                         |                             |                       |
|           |                                                  | GM_CSM63770 | 0%                | 100%                    | 0,0                         | 100%                  |

[0165] Como se puede observar en la Tabla 8 precedente, sobre la base del porcentaje de la especie más prominente de lepidópteros en cada campo, el evento de soja GM\_CSM63770 fue eficaz frente a gusano terciopelo de las leguminosas (VBC, *Anticarsia gemmatalis*), gusano falso medidor de la soja (SBL, *Chrysodeixis includens*) y gusano verde del trébol (GCW *Hypena scabra*) según lo demuestran la reducción porcentual de la defoliación y la reducción porcentual de larvas para el evento de soja GM\_CSM63770 en comparación con el control negativo. Por ejemplo, en la ubicación D, las especies de insectos plagas más predominantes fueron GCW y SBL y representaron el noventa y cuatro por ciento (94%) del total de especies observadas en ese campo. La falta de larvas observada para GM\_CSM63770 respalda que este evento fue altamente resistente a estas dos especies, dado que no se pudo hallar ninguna larva viva en los eventos, mientras que se observaron más de 21 larvas por metro de fila para el control negativo.

[0166] Se evaluó el daño a las vainas en la ubicación M, donde la especie plaga predominante fue SBL. La Tabla 9 muestra el porcentaje medio de vainas dañadas y el porcentaje de reducción del daño de vainas para el evento de soja GM\_CSM63770.

**Tabla 9. Porcentaje medio y reducción del daño de vainas para el evento de soja GM\_CSM63770 y control negativo.**

| Ubicación | Insectos                                                  | Evento      | Nro. medio de vainas por planta | % medio de daño de vainas | Reducción % de daño de vainas |
|-----------|-----------------------------------------------------------|-------------|---------------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| M         | SBL-85%<br>VBC-1%<br>GCW-2%<br>SPW-8%<br>BAW-2%<br>YAW-1% | Negativo    | 45,1                            | 2,60%                     | -                             |
|           |                                                           | GM_CSM63770 | 40,8                            | 0,50%                     | 80%                           |

[0167] Como se puede observar en la Tabla 9 precedente, si bien ambos, el evento de soja GM\_CSM63770 y el control negativo, tuvieron un número similar de vainas por planta, el evento GM\_CSM63770 demostró un 80 por ciento de reducción en el daño de vainas en un campo donde la mayoría de los insectos lepidópteros fue SBL. El evento de soja GM\_CSM63770 demostró resistencia a SBL.

[0168] Sobre la base de las mediciones de defoliación, número de larvas y daño a las vainas en campos infestados naturalmente, el evento de soja GM\_CSM63770 fue eficaz contra los insectos lepidópteros plaga gusano terciopelo de las leguminosas (VBC, *Anticarsia gemmatalis*), gusano falso medidor de la soja (SBL, *Chrysodeixis includens*) y gusano verde del trébol (GCW, *Hypena scabra*).

[0169] Se realizaron estudios de eficacia en invernadero cubierto con mallas y a campo en dos ubicaciones (O-P). Las pruebas en invernadero se plantaron en Acevedo y Fontezuela, en la Provincia de Buenos Aires, y se realizaron contra los insectos lepidópteros plaga gusano terciopelo de las leguminosas (VBC, *Anticarsia gemmatalis*), oruga militar negra (BLAW, *Spodoptera cosmioides*), oruga bolillera sudamericana (SAPW, *Helicoverpa gelotopoeon*), gusano falso medidor de la soja (SBL, *Chrysodeixis includens*) y oruga medidora del girasol (SFL, *Rachiplusia nu*). Se ubicaron aleatoriamente dentro del invernadero tres lotes similares a los descriptos anteriormente para las pruebas en invernadero cubierto con mallas en Argentina en 2017-2018. Cada evento estuvo representado por tres lotes. Cada invernadero fue infestado con polillas adultas y se mantuvieron con una dieta de azúcar como se describió anteriormente. Se realizaron las mediciones de defoliación como se describió anteriormente. La Tabla 10 a continuación muestra los estadios de desarrollo de las plantas en las cuales se produjo la

infestación, el porcentaje máximo y la reducción porcentual de la defoliación para cada una de las especies de insectos de las dos ubicaciones.

**Tabla 10. Porcentaje máximo de defoliación y reducción porcentual de defoliación para el evento de soja GM\_CSM63770 y control negativo.**

| Insecto | Ubicación | Infest-1<br>Infest-2 | Evento      | Defoliación<br>máx. | Reducción %<br>defoliación |
|---------|-----------|----------------------|-------------|---------------------|----------------------------|
| BLAW    | O         | LV                   | Negativo    | 23%                 | -                          |
|         |           | R2                   | GM_CSM63770 | 0%                  | 100%                       |
| SAPW    |           | R1                   | Negativo    | 33%                 | -                          |
|         |           | R2                   | GM_CSM63770 | 2%                  | 94%                        |
| SFL     |           | LV                   | Negativo    | 25%                 | -                          |
|         |           | R2                   | GM_CSM63770 | 0%                  | 100%                       |
| VBC     |           | LV                   | Negativo    | 23%                 | -                          |
|         |           | R2                   | GM_CSM63770 | 0%                  | 100%                       |
| BLAW    | P         | LV                   | Negativo    | 27%                 | -                          |
|         |           | R2                   | GM_CSM63770 | 1%                  | 96%                        |
| SAPW    |           | R1                   | Negativo    | 53%                 | -                          |
|         |           | R2                   | GM_CSM63770 | 2%                  | 96%                        |
| SFL     |           | LV                   | Negativo    | 28%                 | -                          |
|         |           | R2                   | GM_CSM63770 | 0%                  | 100%                       |
| SBL     |           | R3                   | Negativo    | 47%                 | -                          |
|         |           | R5                   | GM_CSM63770 | 0%                  | 100%                       |

[0170] Como se puede observar en la Tabla 10 precedente, el evento de soja GM\_CSM63770 fue eficaz frente al gusano terciopelo de las leguminosas (VBC, *Anticarsia gemmatalis*), oruga militar negra (BLAW, *Spodoptera cosmioides*), oruga bolillera sudamericana (SAPW, *Helicoverpa gelotopoeon*), gusano falso medidor de la soja (SBL, *Chrysodeixis includens*) y oruga medidora del girasol (SFL, *Rachiplusia nu*).

[0171] Pruebas a campo en cinco ubicaciones (Q-U). Se realizó un muestreo en los campos para determinar los tipos de especies lepidópteras y sus respectivos porcentajes en cada campo. Las especies de lepidópteros observadas en el campo fueron gusano terciopelo de las

leguminosas (VBC, *Anticarsia gemmatalis*), las especies medidoras (SBL/SFL) gusano falso medidor de la soja (SBL, *Chrysodeixis includens*) oruga medidora del girasol (SFL, *Rachiplusia nu*), Spodoptera spp. (SPO), y oruga bolillera sudamericana (SAPW, *Helicoverpa gelotopoeon*). Cada lote comprendía 4 filas de 8 metros con 25 semillas por fila. Cada evento estuvo representado por 3 lotes réplica ubicados aleatoriamente dentro del campo. Las mediciones de defoliación, acumulación de larvas y daños a las vainas fueron según se describió anteriormente. La Tabla 11 muestra el porcentaje máximo de defoliación y el porcentaje de reducción de defoliación; la acumulación de larvas por metro de fila y el porcentaje de reducción de larvas; el porcentaje medio de vainas dañadas y el porcentaje de reducción del daño a las vainas para GM\_CSM63770 y el control negativo.

**Tabla 11. Defoliación máxima, acumulación de larvas, y porcentaje medio de daño de vainas para el evento de soja GM\_CSM63770 y control negativo en condiciones naturales de infestación en Argentina durante la temporada de cultivo 2017-2018.**

| Ubicación | Insectos                                      | Evento      | % máx defoliación | Reducción % defoliación | Larvas acumuladas/m de fila | Reducción % de larvas | Nro. medio de vainas por planta |
|-----------|-----------------------------------------------|-------------|-------------------|-------------------------|-----------------------------|-----------------------|---------------------------------|
| Q         | SBL/SFL-47%<br>VBC-30%<br>SPO-11%<br>SAPW-13% | Negativo    | 14%               | -                       | 6,4                         | -                     | 33,2                            |
|           |                                               | GM_CSM63770 | 1%                | 91%                     | 0,1                         | 99%                   | 33,5                            |
| R         | VBC-49%<br>SBL/SFL-30%<br>SPO-19%<br>SAPW-3%  | Negativo    | 9%                | -                       | 12,4                        | -                     | 39,4                            |
|           |                                               | GM_CSM63770 | 2%                | 78%                     | 0,3                         | 98%                   | 33,6                            |
| S         | VBC-81%<br>SBL/SFL-12%<br>SPO-1%<br>SAPW-6%   | Negativo    | 7%                | -                       | 40,6                        | -                     | 33,3                            |
|           |                                               | GM_CSM63770 | 0%                | 97%                     | 0                           | 100%                  | 36,1                            |
| T         |                                               | Negativo    | 6%                | -                       | 18,9                        | -                     | -                               |

| Ubicación | Insectos                                    | Evento      | % máx defoliación | Reducción % defoliación | Larvas acumuladas/m de fila | Reducción % de larvas | Nro. medio de vainas por planta |
|-----------|---------------------------------------------|-------------|-------------------|-------------------------|-----------------------------|-----------------------|---------------------------------|
|           | VBC-92%<br>SBL/SFL-1%<br>SPO-7%<br>SAPW-0%  | GM_CSM63770 | 2%                | 64%                     | 1,6                         | 92%                   | 26,1                            |
| U         | VBC-48%<br>SBL/SFL-41%<br>SPO-8%<br>SAPW-3% | Negativo    | 12%               | -                       | 6,7                         | -                     | 33,7                            |
|           |                                             | GM_CSM63770 | 1%                | 89%                     | 0,1                         | 99%                   | 35,6                            |

[0172] Como se puede observar en la Tabla 11 precedente, el mayor porcentaje de insectos lepidópteros plaga en los campos de la ubicación Q y U fueron VBC y SBL/SFL, mientras que VBC fue el insecto plaga predominante en los campos de la ubicación S. A partir de los resultados precedentes, el evento de soja GM\_CSM63770 fue eficaz frente a VBC y SBL/SFL como lo demuestran la reducción del porcentaje de defoliación, las cantidades menores de acumulación de larvas por metro de fila y la reducción del daño en las vainas.

[0173] El evento de soja GM\_CSM63770 fue ensayado frente a al barrenador menor del tallo (LCSB, *Elasmopalpus lignosellus*) usando un ensayo de disco foliar. Se cultivaron ocho (8) plantas del evento de soja GM\_CSM63770 y un control negativo en el invernadero. Se cosecharon dieciséis discos de hojas de cada planta y se usaron en un ensayo con neonatos de primer estadio larval. Se tomaron mediciones de mortalidad como así también del número de neonatos del primer estadio larval (mortalidad+L1). La Tabla 12 a continuación muestra el porcentaje promedio de Mortalidad+L1 para GM\_CSM63770 y el control negativo.

**Tabla 12. Porcentaje promedio de Mortalidad+L1 para el evento de soja GM\_CSM63770 infestado con LCSB.**

| Evento      | Mortalidad + L1 |
|-------------|-----------------|
| Negativo    | 12,5%           |
| GM_CSM63770 | 100,0%          |

[0174] Como se puede observar en la Tabla 12 precedente, el evento de soja GM\_CSM63770 es muy eficaz frente al barrenador menor del tallo (*Elasmopalpus lignosellus*).

[0175] De los datos presentados anteriormente, se desprende que el evento de soja GM\_CSM63770 proporciona resistencia contra las especies de insectos lepidópteros plaga gusano elotero de la soja (*Helicoverpa zea*), gusano falso medidor de la soja (*Chrysodeixis includens*), gusano terciopelo de las leguminosas (*Anticarsia gemmatilis*), oruga militar del sur (*Spodoptera eridania*), oruga militar negra (*Spodoptera cosmioides*), oruga bolillera sudamericana (*Helicoverpa gelotopoeon*), oruga medidora del girasol (*Rachiplusia nu*), polilla del brote del poroto (*Crociosema aporema*), gusano verde del trébol (*Hypena scabra*) y barrenador menor del tallo (*Elasmopalpus lignosellus*).

### **EJEMPLO 3**

**El evento de soja GM\_CSM63770 proporciona rendimiento consistente y características agronómicas similares a las plantas de soja A3555 no transformadas.**

[0176] Este Ejemplo demuestra que el evento de soja transgénico GM\_CSM63770 proporciona rendimientos consistentes y características agronómicas similares en el campo a las de las plantas de soja A3555.

[0177] Se realizaron ensayos a campo en cuatro temporadas de cultivo separadas para evaluar los rasgos agronómicos y el rendimiento del evento de soja GM\_CSM63770 en comparación con el antecedente de transformación parental en condiciones de campo. Se evaluaron para cada lote datos agronómicos tales como emergencia, fecha de la primera flor, altura de la planta, días hasta la madurez, y rendimiento (rendimiento corregido según la humedad por acre).

[0178] En comparación con su antecedente de transformación A3555, el evento de soja GM\_CSM63770 no mostró ninguna diferencia significativa en otros rasgos agronómicos; emergencia, fecha hasta la floración y la madurez, con excepción de la altura de la planta, donde el evento de soja GM\_CSM63770 fue aproximadamente 2,5 cm (1 pulgada) más alto que el control A3555 de tipo silvestre, lo cual no fue considerado biológicamente significativo. La expresión de las proteínas insecticidas, Cry1A.2 y Cry1B.2 en el evento de soja GM\_CSM63770 no afectó negativamente las características agronómicas ni el desempeño de rendimiento del evento de soja GM\_CSM63770 en comparación con el control no transgénico.

### **EJEMPLO 4**

## **Ensayos TAQMAN® de criterios de valoración específicos de evento con el evento de soja GM\_CSM63770.**

**[0179]** El Ejemplo a continuación describe métodos útiles para identificar la presencia de GM\_CSM63770 en una muestra de soja. Se diseñaron un par de cebadores para PCR y una sonda para identificar la unión exclusiva formada entre el ADN genómico de soja y el ADN insertado de GM\_CSM63770 en una PCR TAQMAN® de criterio de valoración específica de evento. En la Tabla 13 y la Tabla 14 se describen ejemplos de las condiciones utilizadas para identificar la presencia de GM\_CSM63770 en una muestra de soja en una PCR TAQMAN® de criterio de valoración específica de evento.

**[0180]** La secuencia del cebador directo de oligonucleótidos SQ13805 (SEQ ID NO:14) es idéntica a la secuencia de nucleótidos correspondiente a las posiciones 13.177-13.202 de SEQ ID NO: 10. La secuencia del cebador inverso de oligonucleótidos SQ51400 (SEQ ID NO:15) es idéntica al complemento inverso de la secuencia de nucleótidos correspondiente a las posiciones 13.280-13.310 de SEQ ID NO:10. La secuencia de la sonda de oligonucleótidos PB4832 (SEQ ID NO:16) es idéntica a la secuencia de nucleótidos correspondiente a las posiciones 13.204-13.219 de SEQ ID NO:10. Los cebadores SQ13805 (SEQ ID NO:14) y SQ51400 (SEQ ID NO:15) con la sonda PB4832 (SEQ ID NO:16), que puede estar fluorescentemente marcada (por ejemplo, un marcador fluorescente 6-FAM<sup>TM</sup>), se pueden usar en un ensayo PCR TAQMAN® para identificar la presencia de ADN derivado de GM\_CSM63770 en una muestra.

**[0181]** Además de SQ13805 (SEQ ID NO:14), SQ51400 (SEQ ID NO:15), y PB4832 (SEQ ID NO:16), se tornará evidente a las personas expertas en la técnica que se pueden diseñar otros cebadores y/o sondas para amplificar o hibridar con secuencias dentro de SEQ ID NO:10 que son exclusivas y útiles para detectar la presencia de ADN derivado de GM\_CSM63770 en una muestra.

**[0182]** Siguiendo prácticas de laboratorio de biología molecular convencionales, se desarrollaron ensayos de PCR para identificación de eventos para detección de GM\_CSM63770 en una muestra. Los parámetros, tanto de un ensayo convencional de PCR como de un ensayo PCR TAQMAN®, fueron optimizados con cada conjunto de pares de cebadores y sondas (por ejemplo, sondas marcadas con un marcador fluorescente tal como 6-FAM<sup>TM</sup>) usados para detectar la presencia de ADN derivado de GM\_CSM63770 en una muestra. Un control para la reacción PCR incluye cebadores de control interno y una sonda de

control interno (por ejemplo, marcada con VIC<sup>®</sup>) específicos para una región dentro del genoma de soja usada como un control interno, y son los cebadores SQ549 (SEQ ID NO:17), SQ546 (SEQ ID NO:18), y la sonda marcada con VIC<sup>®</sup> PB0004 (SEQ ID NO:19).

**[0183]** Generalmente, los parámetros que fueron optimizados para la detección de GM\_CSM63770 en una muestra incluyeron concentración de cebador y sonda, cantidad de ADN molde, y parámetros de ciclos de amplificación por PCR. Los controles para este análisis incluyen un control positivo de soja que contiene GM\_CSM63770, un control negativo de soja no transgénica, y un control negativo que no contiene ADN molde.

**Tabla 13. Componentes de la reacción PCR TAQMAN® de criterio de valoración específica del evento GM\_CSM63770.**

| Paso | Reactivo                                                                                                                                                                                                                | Concentración solución madre (µM) | Volumen ((µl) | Concentración final (µl) | Comentarios                                        |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|---------------|--------------------------|----------------------------------------------------|
|      | Volumen de reacción                                                                                                                                                                                                     |                                   | 5             |                          |                                                    |
| 1    | Mezcla maestra                                                                                                                                                                                                          |                                   | 2,28          |                          | Concentración final 1X                             |
| 2    | Cebador SQ13805 específico de evento                                                                                                                                                                                    | 100                               | 0,05          | 0,9                      |                                                    |
| 3    | Cebador SQ51400 específico de evento                                                                                                                                                                                    | 100                               | 0,05          | 0,9                      |                                                    |
| 4    | Sonda PB4832 específica de evento 6FAM™                                                                                                                                                                                 | 100                               | 0,01          | 0,2                      | La sonda es fotosensible                           |
| 5    | Cebador de control interno SQ549                                                                                                                                                                                        | 100                               | 0,05          | 0,9                      |                                                    |
| 6    | Cebador de control interno SQ546                                                                                                                                                                                        | 100                               | 0,05          | 0,9                      |                                                    |
| 7    | Sonda de control interno PB0004 VIC®                                                                                                                                                                                    | 100                               | 0,01          | 0,2                      | La sonda es fotosensible                           |
| 8    | ADN extraído (molde):<br>• Muestras de hojas a analizar<br>• Control negativo (ADN no transgénico)<br>• Control de agua negativo (sin control de molde)<br>• Control o controles cualitativos positivos ADN GM_CSM63770 |                                   | 2,5           |                          | Se realizaron reacciones separadas para cada molde |

**Tabla 14. Condiciones termociclador TAQMAN®**

| Nro. de paso | Número de ciclos | Configuración |
|--------------|------------------|---------------|
|--------------|------------------|---------------|

|   |    |                   |
|---|----|-------------------|
| 1 | 1  | 95 °C 20 segundos |
| 2 | 35 | 95 °C 3 segundos  |
|   |    | 60 °C 20 segundos |
| 3 | 1  | 10 °C             |

### EJEMPLO 5

#### Ensayos para determinar la cigosidad del evento de soja GM\_CSM63770 usando TAQMAN®

**[0184]** El Ejemplo a continuación describe métodos útiles para identificar la cigosidad del evento GM\_CSM63770. Se diseñaron pares de cebadores y una sonda para PCR con el fin de identificar propiedades específicas de alelos positivos para la inserción de ADN-T que den origen al evento GM\_CSM63770 y se diseñaron pares de cebadores y una sonda como una sonda de control interno específica para una región dentro del genoma de soja que se usa como una zona de control interno que es representada en el genoma de soja como homocigota.

**[0185]** Los pares de cebadores y la sonda para PCR específicos para el alelo transgénico GM\_CSM63770, descritas en el Ejemplo 4, cebadores PCR SQ13805 (SEQ ID NO:14), SQ51400 (SEQ ID NO:15), y sonda PB4832 marcada 6-FAM™ (SEQ ID NO:16) y los pares de cebadores y sonda PCR específicos para el control interno, cebadores SQ549 (SEQ ID NO:17), SQ546 (SEQ ID NO:18), y sonda PB0004 marcada VIC® (SEQ ID NO:19) se usaron en una reacción PCR en tiempo real tal como la descrita en el Ejemplo 6 precedente.

**[0186]** Después de la amplificación, se determinaron los umbrales del número de ciclos (valores Ct) para el amplicón correspondiente al alelo GM\_CSM63770 insertado y al estándar interno homocigoto, copia individual. Se determinó la diferencia ( $\Delta$ Ct) entre el valor Ct del amplicón copia individual del estándar interno homocigoto, y el valor Ct del amplicón del alelo insertado GM\_CSM63770. Con respecto a la cigosidad, un  $\Delta$ Ct alrededor de cero (0) indica homocigosidad del ADN-T insertado en GM\_CSM63770 y un  $\Delta$ Ct alrededor de uno (1) indica heterocigosidad del ADN-T insertado en GM\_CSM63770. La falta de un amplicón correspondiente al alelo insertado en GM\_CSM63770 indica que la muestra es nula para el ADN-T insertado en GM\_CSM63770. Los valores Ct del método de amplificación térmica TAQMAN® tendrán alguna variabilidad debido a múltiples factores tales como la eficiencia

de amplificación y temperaturas ideales de apareamiento. Por lo tanto, el rango de “aproximadamente uno (1)” se define como un  $\Delta C_t$  de 0,75 a 1,25.

## **EJEMPLO 6**

### **Ensayos para determinar la cigosidad del evento de soja GM\_CSM63770 usando TAQMAN<sup>®</sup>**

**[0187]** El Ejemplo a continuación describe un método útil para identificar la cigosidad del evento GM\_CSM63770 en una muestra de soja.

**[0188]** Se diseñaron pares de cebadores y una sonda para PCR con el fin de identificar propiedades específicas de alelos positivos y negativos para la inserción de ADN-T que da origen al evento GM\_CSM63770. Los ejemplos de las condiciones que se pueden usar en una PCR TAQMAN<sup>®</sup> para determinar la cigosidad específica del evento se proporcionan en las Tablas 15 y 16. Para este ensayo, se mezclaron cuatro cebadores y dos sondas junto con la muestra. Los pares de cebadores de ADN usados en el ensayo de cigosidad son los cebadores SQ13805 (SEQ ID NO:14) y SQ51400 (SEQ ID NO:15); y GM\_WTA3555F (SEQ ID NO:20) y SQ51400 (SEQ ID NO:15). Las sondas usadas en el ensayo de cigosidad son la sonda PB4832 marcada 6FAM<sup>™</sup> (SEQ ID NO:16) y la sonda GM\_WTA3555PB marcada VIC<sup>®</sup> (SEQ ID NO:21). SQ13805 (SEQ ID NO:14) y SQ51400 (SEQ ID NO:15) y la sonda PB4832 marcada 6FAM<sup>™</sup> (SEQ ID NO:16) son un diagnóstico o una característica de ADN del evento de soja GM\_CSM63770. Los cebadores GM\_WTA3555F (SEQ ID NO:20) y SQ51400 (SEQ ID NO:15) y la sonda GM\_WTA3555PB marcada VIC<sup>®</sup> (SEQ ID NO:21) son un diagnóstico cuando no hay una copia del evento de soja GM\_CSM63770; es decir, son un diagnóstico o una característica del alelo de tipo silvestre.

**[0189]** Cuando los tres cebadores y las dos sondas se mezclan entre sí en una reacción PCR con ADN extraído de una planta heterocigota para el evento de soja GM\_CSM63770, existe una señal fluorescente desde ambas, la sonda PB4832 marcada 6FAM<sup>™</sup> (SEQ ID NO:16) y la sonda GM\_WTA3555PB marcada VIC<sup>®</sup> (SEQ ID NO:21) que es indicativa de un diagnóstico o una característica de una planta heterocigota para el evento de soja GM\_CSM63770. Cuando los tres cebadores y las dos sondas se mezclan entre sí en una reacción PCR con ADN extraído de una planta homocigota para GM\_CSM63770, existe una señal fluorescente solo desde la sonda PB4832 marcada 6FAM<sup>™</sup> (SEQ ID NO:16) y no desde la sonda GM\_WTA3555PB marcada VIC<sup>®</sup> (SEQ ID NO:21). Cuando los tres cebadores y las dos sondas se mezclan entre

sí en una reacción PCR con ADN extraído de una planta que es nula para el evento de soja GM\_CSM63770 (es decir, de tipo silvestre), existe una señal fluorescente solo desde la sonda GM\_WTA3555PB marcada VIC® (SEQ ID NO:21). Las muestras de ADN molde y los controles para este análisis son un control positivo de soja que contiene ADN de GM\_CSM63770 (de ambas, una muestra homocigota conocida y una muestra heterocigota conocida), un control negativo de soja no transgénica, y un control negativo que no contiene ADN molde.

**Tabla 15. Cigosis de GM\_CSM63770 PCR TAQMAN®.**

| Paso | Reactivo                                     | Concentración solución madre (μM) | Volumen ((μl) | Concentración final (μl) | Comentarios              |
|------|----------------------------------------------|-----------------------------------|---------------|--------------------------|--------------------------|
|      | Volumen de reacción                          |                                   | 5             |                          |                          |
| 1    | Mezcla maestra                               |                                   | 2,28          |                          | Concentración final 1X   |
| 2    | Cebador SQ13805 específico de evento         | 100                               | 0,05          | 0,9                      |                          |
| 3    | Cebador SQ51400 específico de evento         | 100                               | 0,10          | 1,8                      |                          |
| 4    | Sonda PB4832 específica de evento 6FAM™      | 100                               | 0,01          | 0,2                      | La sonda es fotosensible |
| 5    | Cebador GM_WTA3555F alelo tipo silvestre     | 100                               | 0,05          | 0,9                      |                          |
| 6    | Sonda GM_WTA3555PB VIC® alelo tipo silvestre | 100                               | 0,01          | 0,2                      | La sonda es fotosensible |

| Paso | Reactivo                                                                                                                                                                                                                | Concentración solución madre (µM) | Volumen ((µl) | Concentración final (µl) | Comentarios                                         |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|---------------|--------------------------|-----------------------------------------------------|
| 7    | ADN extraído (molde):<br>• Muestras de hojas a analizar<br>• Control negativo (ADN no transgénico)<br>• Control de agua negativo (sin control de molde)<br>• Control o controles cualitativos positivos ADN GM_CSM63770 |                                   | 2,5           |                          | Se realizaron reacciones separadas para cada molde. |

**Tabla 16. Cigosis - Condiciones termociclador TAQMAN®**

| Nro. de paso | Número de ciclos | Configuración     |
|--------------|------------------|-------------------|
| 1            | 1                | 95 °C 20 segundos |
| 2            | 40               | 95 °C 3 segundos  |
|              |                  | 60 °C 20 segundos |
| 3            | 1                | 10 °C             |

### EJEMPLO 7

#### Identificación del evento de soja GM\_CSM63770 en cualquier evento de mejoramiento GM\_CSM63770.

[0190] El Ejemplo a continuación describe cómo se puede identificar el evento de soja GM\_CSM63770 dentro de la progenie de cualquier actividad de mejoramiento usando el evento de soja GM\_CSM63770. Por ejemplo, el evento de soja GM\_CSM63770 podría apilarse mediante mejoramiento o introgresión de sitio dirigido con otros eventos conocidos en la técnica para controlar plagas de lepidópteros tales como cualquiera de los eventos de soja a continuación que incluyen, entre otros, MON87701, MON87751, DAS81419 (resistencia a lepidópteros y tolerancia a herbicidas). El evento de soja GM\_CSM63770 también podría

apilarse mediante mejoramiento o introgresión de sitio dirigido con otros eventos transgénicos de soja conocidos en la técnica para proporcionar resistencia a herbicidas inclusive, entre otros, con A2704-12 (Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. Nro. US20080320616), A5547-127 (Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. Nro. US2008196127), CV127 (Publicación de Solicitud Internacional de Patente Nro. WO2010080829), DS40278-9 (Publicación de Solicitud Internacional de Patente Nro. WO2011022469, WO2011022470, WO2011022471), DAS44406-6 (Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. Nro. US2014041083), DAS68416-4 (Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. Nro. US20130296170), DAS81419-2 (Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. Nro. US2013338006), DP356043-5 (Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. Nro. US20100184079), FG72 (Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. Nro. US2011162098), GMB151 (Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. Nro. US2019345512), GTS 40-3-2, MON87708 (Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. US [sic], MON87751 (Solicitud de Patente de los EE.UU. Nro. US20140373191), MON89788, SYHT0H2 (Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. Nro. US20140201860), y SYHT04R (Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. Nro. US20140310835). El evento de soja GM\_CSM63770 también podría aplicarse mediante mejoramiento o introgresión de sitio dirigido con otros eventos de soja transgénicos conocidos en la técnica para proporcionar resistencia a herbicidas y aceites modificados, o fotosíntesis mejorada, o tolerancia a la sequía, inclusive, entre otros, DP305423-1 (Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. Nro. US20080312082), MON87705 (Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. Nro. US2014373191), MON87712 (Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. Nro. US2014373191), MON87769 (Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. Nro. US2011067141) y HB4 (Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. Nro. US2022090114).

**[0191]** Los pares de cebadores de ADN se emplean para producir un amplicón que es un diagnóstico o una característica del evento de soja GM\_CSM63770. Un amplicón que es un diagnóstico o una característica del evento de soja GM\_CSM63770 comprende al menos una secuencia de unión. Las secuencias de unión para el evento de soja GM\_CSM63770 son SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6 ([1], [2], [3], [4], [5] y [6], respectivamente en la Figura 1). SEQ ID NO:1 es una secuencia de 50 nucleótidos que representa las regiones de unión 5' del ADN genómico de soja y el casete de expresión transgénico integrado. SEQ ID NO:1 está posicionada en SEQ ID NO:10 en la

posición de nucleótidos 976-1.025. SEQ ID NO:2 es una secuencia de 50 nucleótidos que representa las regiones de unión 3' del ADN genómico de soja y el casete de expresión transgénico integrado. SEQ ID NO:2 está posicionada en SEQ ID NO:10 en la posición de nucleótidos 13.216-13.265. SEQ ID NO:3 es una secuencia de 100 nucleótidos que representa las regiones de unión 5' del ADN genómico de soja y el casete de expresión transgénico integrado. SEQ ID NO:3 está posicionada en SEQ ID NO:10 en la posición de nucleótidos 951-1.050. SEQ ID NO:4 es una secuencia de 100 nucleótidos que representa las regiones de unión 3' del ADN genómico de soja y el casete de expresión transgénico integrado. SEQ ID NO:4 está posicionada en SEQ ID NO:10 en la posición de nucleótidos 13.191-13.290. SEQ ID NO:5 es una secuencia de 200 nucleótidos que representa las regiones de unión 5' del ADN genómico de soja y el casete de expresión transgénico integrado. SEQ ID NO:5 está posicionada en SEQ ID NO:10 en la posición de nucleótidos 901-1.100. SEQ ID NO:6 es una secuencia de 200 nucleótidos que representa las regiones de unión 3' del ADN genómico de soja y el casete de expresión transgénico integrado. SEQ ID NO:6 está posicionada en SEQ ID NO:10 en la posición de nucleótidos 13.141-13.340.

**[0192]** Los pares de cebadores que producirán un amplicón que es un diagnóstico o una característica del evento GM\_CSM63770 incluyen pares de cebadores basados en las secuencias flanqueantes (SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:12) y el ADN-T insertado (SEQ ID NO:9). Para obtener un amplicón diagnóstico en el cual se hallen SEQ ID NO:1, o SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5, debería diseñarse una molécula de cebador directo sobre la base del ADN genómico de soja flanqueante 5' (SEQ ID NO:11) de las bases 1-1.000 y una molécula de cebador inverso sobre la base del ADN-T insertado (SEQ ID NO:9) de las posiciones 1.001-13.240 donde las moléculas del cebador tengan la longitud suficiente de nucleótidos contiguos para hibridar específicamente con SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:9. Para obtener un amplicón diagnóstico en el cual se hallen SEQ ID NO:2, o SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:6, debería diseñarse una molécula de cebador directo sobre la base del ADN-T insertado (SEQ ID NO:9) de las posiciones 1.001-13.240 y una molécula de cebador inverso sobre la base del ADN genómico de soja flanqueante 3' (SEQ ID NO:12) de las posiciones 13.241-14.240 donde las moléculas del cebador tengan la longitud suficiente de nucleótidos contiguos para hibridar específicamente con SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:12.

**[0193]** Por razones de practicidad, se deberán diseñar cebadores que produzcan amplicones con un rango de tamaño limitado, preferentemente, entre 200 y 1.000 bases. Los amplicones de tamaño más pequeño en general se producen de forma más confiable en reacciones PCR,

permitiendo ciclos más cortos, y se pueden separar y visualizar fácilmente sobre geles de agarosa o adaptarse para usar en ensayos de criterios de valoración del tipo TAQMAN®. Además, los amplicones producidos usando dichos pares de cebadores se pueden clonar en vectores, propagar, aislar y secuenciar o se pueden secuenciar directamente con métodos bien conocidos en la técnica. Todos los pares de cebadores derivados de las combinaciones de SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:12 y SEQ ID NO:9 que son útiles en un método de amplificación de ADN para producir un amplicón que es un diagnóstico o una característica del evento de soja GM\_CSM63770 o su progenie, son un aspecto de la presente invención. Todas las moléculas individuales de cebador de polinucleótido de ADN aisladas que comprenden al menos once (11) nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:12 o sus complementos, que son útiles en un método de amplificación de ADN para producir un amplicón que es un diagnóstico o una característica del evento de soja GM\_CSM63770 o su progenie, son un aspecto de la presente invención.

**[0194]** En las Tablas 14 y 15 se ilustra un ejemplo de las condiciones de amplificación para este análisis. Cualquier modificación de estos métodos o el uso de cebadores de ADN homólogos o complementarios de SEQ ID NO:11 o SEQ ID NO:12, o secuencias de ADN de los elementos genéticos contenidos en el inserto transgénico (SEQ ID NO:9) de GM\_CSM63770, que producen un amplicón que es un diagnóstico o una característica del evento de soja GM\_CSM63770 está dentro de la técnica. Un amplicón diagnóstico comprende una molécula de ADN homólogo o complementario con al menos un ADN de unión transgénico/genómico o una porción sustancial de esta.

**[0195]** Un análisis de una muestra de tejido vegetal del evento de soja GM\_CSM63770 deberá incluir un control de tejido positivo de una planta que contenga GM\_CSM63770, un control negativo de una planta de soja que no contenga GM\_CSM63770 (por ejemplo, A3555), y un control negativo que no contenga ADN genómico de soja. Un par de cebadores amplificará una molécula de ADN de soja endógena y servirá como un control interno para las condiciones de amplificación del ADN. Los expertos en la técnica de métodos de amplificación de ADN pueden seleccionar secuencias cebadoras adicionales entre SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 9. Las condiciones seleccionadas para la producción de un amplicón mediante los métodos que se muestran en la Tabla 13 y la Tabla 14 pueden diferir pero resultan en un amplicón que es un diagnóstico o una característica del ADN del evento de soja GM\_CSM63770. El uso de secuencias cebadoras de ADN dentro de los métodos de la Tabla 13 y la Tabla 14 o con modificación de estos están dentro del alcance de la invención. Un

amplicón producido mediante al menos una secuencia de ADN cebadora derivada de SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:9 que es un diagnóstico o una característica del evento de soja GM\_CSM63770 es un aspecto de la invención.

**[0196]** Los kits para detección de ADN que contienen al menos un cebador de ADN con la longitud suficiente de nucleótidos contiguos derivados de SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:9 que, cuando se usan en un método de amplificación de ADN, producen un amplicón diagnóstico para GM\_CSM63770 o su progenie, son un aspecto de la invención. Una planta de soja o semilla, donde su genoma producirá un amplicón que es un diagnóstico o una característica del evento de soja GM\_CSM63770, cuando se ensaye en un método de amplificación de ADN es un aspecto de la invención El ensayo del amplicón del evento de soja GM\_CSM63770 se puede realizar usando un sistema PCR System 9700 Applied Biosystems GeneAmp™, Stratagene Robocycler®, Eppendorf® Mastercycler® Gradient Thermocycler o cualquier otro sistema de amplificación que se pueda usar para producir un amplicón que sea un diagnóstico o una característica del evento de soja GM\_CSM63770 como se muestra en la Tabla 15.

## **EJEMPLO 8**

### **Insertión de secuencias en el evento de soja GM\_CSM63770 para facilitar la remoción de la inserción transgénica usando un solo ARN guía.**

**[0197]** El Ejemplo a continuación describe cómo se puede extirpar la inserción transgénica presente en el evento de soja GM\_CSM63770 usando técnicas de edición genómica. Las secuencias útiles para la escisión de casetes de inserción o expresión transgénicos del evento de soja GM\_CSM63770 dentro de SEQ ID NO:10 se pueden introducir a través de edición genómica usando una variedad de métodos, en particular mediante el uso de sistemas de edición de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas (CRISPR, por sus siglas en inglés). La proteína asociada a CRISPR se puede seleccionar entre una proteína asociada a CRISPR Tipo I, una proteína asociada a CRISPR Tipo II, una proteína asociada a CRISPR Tipo III, una proteína asociada a CRISPR Tipo IV, una proteína asociada a CRISPR Tipo V, o una proteína asociada a CRISPR Tipo VI, tales como, entre otras, Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (también conocida como Csn1 y Csx12), Cas10, Cas12a (también conocida como Cpf1), Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2,

Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4, CasX, CasY y Mad7. La proteína asociada a CRISPR y uno o más ARN guía (ARNg) se pueden introducir en una célula vegetal correspondiente al evento de soja GM\_CSM63770 para localizar una secuencia específica dentro del locus de inserción transgénica mediante una vía de reparación de rotura de doble hebra, que puede incluir, por ejemplo, unión de extremos no homólogos (NHEJ), unión de extremos mediada por microhomología (MMEJ), recombinación homóloga, apareamiento de hebras dependiente de síntesis (SDSA), o una combinación de estos, en el sitio genómico diana. Se pueden insertar una o más secuencias dentro del locus de inserción transgénica del evento de soja GM\_CSM63770 que pueden permitir la escisión de la inserción transgénica del evento de soja GM\_CSM63770 o casetes de expresión específicos dentro de SEQ ID NO:10.

**[0198]** Se escanean las secuencias correspondientes a las secuencias genómicas flanqueantes 5' y 3' del evento de soja GM\_CSM63770 (presentadas como SEQ ID NOs:11 y 12), las regiones de unión 5' y 3' (presentadas como SEQ ID NOs:1-6), el ADN-T insertado para determinar potenciales sitios de reconocimiento de ARN guía originador (OgRRS) que comprenden un sitio de motivo adyacente de protoespaciador (PAM) operativamente enlazado con un sitio de hibridación de ARN guía. Los OgRRS pueden estar ubicados dentro de la secuencia genómica flanqueante 5' o 3', o dentro de las regiones de unión 5' o 3', o dentro del ADN-T insertado. Los OgRRS se determinarán sobre la base del sistema de edición CRISPR específico elegido. Por ejemplo, Cas9 reconoce un motivo adyacente de protoespaciador (PAM) rico en G que es 3' de su sitio de unión al ARN guía, mientras que los sistemas Cas12a reconocen un motivo adyacente de protoespaciador (PAM) rico en T que es 5' de su sitio de unión al ARN guía.

**[0199]** La secuencia OgRRS luego se usa para definir un sitio de reconocimiento de ARN guía cognado (CgRRS) que es insertado en el locus de inserción transgénica del evento GM\_CSM63770 usando un sistema de edición CRISPR. El CgRRS comprende la misma secuencia diana de ARNg que el OgRRS seleccionado. El CgRRS es insertado en una región dentro del locus de inserción transgénica del evento GM\_CSM63770 que está en el lado opuesto de la inserción transgénica, en relación con el OgRRS en una manera que permitirá la escisión de un fragmento de ADN correspondiente a la inserción transgénica completa del evento de soja GM\_CSM63770, o un fragmento dentro de la inserción transgénica del evento de soja GM\_CSM63770 tal como un casete de expresión o un elemento genético dentro del casete transgénico, usando un solo ARNg. Por ejemplo, en la medida que el OgRRS está

ubicado dentro de la secuencia genómica flanqueante 3' o la región de unión 3', entonces el CgRRS se insertará dentro de la secuencia genómica flanqueante 5', o la región de unión 5', o dentro del inserto transgénico tal como entre casetes de expresión o elementos genéticos dentro de un casete de expresión. La inserción del CgRRS en el lado opuesto de la inserción transgénica o dentro de la región entre casetes de expresión, en relación con el OgRRS permite la escisión de la inserción transgénica o la escisión de casetes de expresión específicos usando un solo ARNg. Un OgRRS ubicado entre los casetes de expresión del evento GM\_CSM63770 se puede usar para diseñar un CgRRS que se puede insertar en la secuencia genómica flanqueante 5' o 3' para permitir la escisión de uno u otro casete de expresión usando un solo ARNg.

**[0200]** La Tabla 17 a continuación muestra secuencias OgRRS a modo de ejemplo ubicadas dentro de las secuencias genómicas flanqueantes 5' y 3' y entre los dos casetes de expresión del evento de soja GM\_CSM63770 que se pueden usar en un sistema de edición CRISPR que emplea Cas12a, una proteína asociada a CRISPR Tipo V (secuencia de codificación presentada como SEQ ID NO:34; secuencia de proteínas presentada como SEQ ID NO:35).

**Tabla 17. Secuencias OgRRS a modo de ejemplo dentro del evento de soja GM\_CSM63770.**

| OgRRS      | Secuencia                       | SEQ ID NO: | Sitio diana                    |
|------------|---------------------------------|------------|--------------------------------|
| OgRRS_5-1  | TTTAGAGTTTGGAGAATAAAG<br>TACACA | 22         | ADN genómico<br>flanqueante 5' |
| OgRRS_5-2  | TTTGGCATTGGTCGGAGTCTA<br>TGTTTC | 23         | ADN genómico<br>flanqueante 5' |
| OgRRS_5-3  | TTTGGAGGGGAGAGATAACT<br>ACACTAA | 24         | ADN genómico<br>flanqueante 5' |
| OgRRS_3-1  | TTTGGAGAGATTCTTGATAA<br>ATGTAT  | 25         | ADN genómico<br>flanqueante 3' |
| OgRRS_In-1 | TTTAGGGATAATAGCTGTTTG<br>CCAATC | 26         | Entre casetes de<br>expresión  |
| OgRRS_In-2 | TTTCGCAACAGGCACAGCGCT<br>GAGGTA | 27         | Entre casetes de<br>expresión  |

**[0201]** La Tabla 18 a continuación muestra ARNg que incluyen una región de terminación de transcripción poli-T que se puede usar para dirigir la nucleasa Cas12a para realizar un corte dentro de ambas secuencias, OgRRS y CgRRS.

**Tabla 18. ARNg útiles para dirigir nucleasa Cas12a**

| ARNg            | SEQ ID NO: | Secuencia                                               |
|-----------------|------------|---------------------------------------------------------|
| ARNg_OgRRS_5-1  | 28         | GAATTTCTACTAAGTGTAGATGAGTTTGGAGAAT<br>AAAGTACACATTTTTTT |
| ARNg_OgRRS_5-2  | 29         | GAATTTCTACTAAGTGTAGATGCATTGGTCGGAG<br>TCTATGTTTCTTTTTTT |
| ARNg_OgRRS_5-3  | 30         | GAATTTCTACTAAGTGTAGATGAGGGGAGAGAT<br>AACTACACTAATTTTTTT |
| ARNg_OgRRS_3-1  | 31         | GAATTTCTACTAAGTGTAGATGAGAGATTCTTGG<br>ATAAATGTATTTTTTTT |
| ARNg_OgRRS_In-1 | 32         | GAATTTCTACTAAGTGTAGATGGGATAATAGCTG<br>TTTGCCAATCTTTTTTT |
| ARNg_OgRRS_In-2 | 33         | GAATTTCTACTAAGTGTAGATGCAACAGGCACA<br>GCGCTGAGGTATTTTTTT |

**[0202]** Cualquiera de las secuencias OgRRS presentadas en la Tabla 17 precedente se pueden usar alternativamente como un sitio para insertar un CgRRS que fue diseñado usando un OgRRS diferente. Por ejemplo, un CgRRS se puede insertar en una secuencia flanqueante para permitir la escisión de la inserción transgénica completa del evento GM\_CSM63770. Para ilustrar esta estrategia, se selecciona OgRRS\_3-1 como el OgRRS que se usará para diseñar un CgRRS correspondiente que comprende fragmento de ADN, y se selecciona OgRRS\_5-3 como el sitio diana en el cual se inserta el CgRRS que comprende fragmento de ADN. Usando un sistema de edición Cas12a, el sitio OgRRS\_5-3 es localizado usando el ARNg, ARNg\_OgRRS\_5-3 presentado en la Tabla 18 para efectuar un corte dentro del sitio OgRRS\_5-3. El CgRRS que comprende fragmento de ADN que comprende el sitio diana OgRRS\_3-1 luego se inserta dentro del sitio de corte que fue introducido en la secuencia

OgRRS\_5-3 Después de seleccionar el evento transgénico que comprende el sitio CgRRS introducido, el evento se puede introducir en otro germoplasma. Cuando se lo desee, el inserto transgénico del evento de soja GM\_CSM63770 puede ser extirpado de la planta usando un sistema de edición Cas12a y el ARNg, ARNg\_OgRRS\_3-1 como se presenta en la Tabla 18.

**[0203]** Cualquiera de las secuencias presentadas en la Tabla 17 que están dentro de las secuencias genómicas flanqueantes 5' y 3' del evento de soja GM\_CSM63770 se puede usar como un sitio para insertar un CgRRS que comprende fragmento de ADN, que comprende una secuencia OgRRS que está entre casetes de expresión, para permitir la escisión de un casete de expresión específico usando un solo ARNg. Para ilustrar esta estrategia, se selecciona OgRRS\_In-1 como el OgRRS que se usará para diseñar un CgRRS correspondiente que comprende fragmento de ADN, y se selecciona OgRRS\_5-2 como el sitio diana en el cual se inserta el CgRRS que comprende fragmento de ADN. Usando un sistema de edición Cas12a, el sitio OgRRS\_5-2 es localizado usando el ARNg, ARNg\_OgRRS\_5-2 presentado en la Tabla 18 para efectuar un corte dentro del sitio OgRRS\_5-2. El CgRRS que comprende fragmento de ADN que comprende el sitio diana OgRRS\_In-1 luego se inserta dentro del sitio de corte que fue introducido en la secuencia OgRRS\_5-2. Después de seleccionar el evento transgénico que comprende el sitio CgRRS introducido, el evento se puede introducir en otro germoplasma. Cuando se lo desee, el primer casete de expresión que expresa la toxina proteica Cry1A.2 se puede extirpar de la planta usando un sistema de edición Cas12a y el ARNg, ARNg\_OgRRS\_In-1 como se presenta en la Tabla 18.

**[0204]** El CgRRS se puede introducir en el locus de inserción transgénica a través de múltiples métodos usando un sistema CRISPR. Por ejemplo, se puede utilizar un sistema CRISPR para dirigir la inserción 5' de un fragmento de ADN bicatenario con extremos romos en un sitio genómico diana de interés tal como un OgRRS que no es el OgRRS que ha sido seleccionado para el diseño del CgRRS. La actividad endonucleasa mediada por CRISPR puede introducir una rotura de doble hebra (DSB) en el sitio diana genómico seleccionado y reparación de ADN, tal como reparación de ADN mediante unión de extremos no homólogos mediada por microhomología, resultando en la inserción del fragmento de ADN bicatenario con extremos romos en la DSB. Los fragmentos de ADN bicatenario con extremo romo se pueden diseñar con 1-10 pb de microhomología, en ambos extremos 5' y 3' del fragmento de ADN, que corresponden a la secuencia flanqueante 5' y 3' en el sitio de corte del protoespaciador en el sitio genómico diana.

**[0205]** El sistema CRISPR se puede introducir en el evento GM\_CSM63770 por diversos métodos. Se introducen transitoriamente en una célula uno o más casetes de expresión que codifican el ARNg y/o los componentes de proteína asociada a CRISPR de un sistema CRISPR-Cas Tipo I, Tipo II, Tipo III, Tipo IV, Tipo V o Tipo VI. El único o los varios casetes de expresión introducidos que codifican el ARNg y/o la proteína asociada a CRISPR, junto con un fragmento de ADN que comprende el CgRRS se proporcionan en cantidad suficiente para modificar la célula pero no persisten después de transcurrido un lapso determinado o después de una o más divisiones celulares. En tales realizaciones, no se necesitan pasos adicionales para remover o segregar el único o los varios casetes de expresión que codifican el ARNg y/o la proteína asociada a CRISPR de la célula modificada.

**[0206]** Alternativamente, un constructo de expresión que comprende uno o varios casetes de expresión para expresión de un ARNg, y un constructo de expresión que codifica una proteína asociada a CRISPR Tipo I, Tipo II, Tipo III, Tipo IV, Tipo V o Tipo VI es establemente transformado en el evento GM\_CSM63770 para introducir el CgRRS dentro del locus diana deseado. El ARNg dirigirá la nucleasa para cortar dentro del locus diana que puede ser un OgRRS diferente del OgRRS seleccionado. El constructo de expresión también comprendería un fragmento de ADN CgRRS que está flanqueado 5' y 3' con la secuencia PAM/ARNg del locus deseado (es decir, un OgRRS diferente del OgRRS seleccionado) lo cual permitirá la escisión del fragmento de ADN CgRRS que luego se puede introducir en el locus diana mediante una vía de reparación de rotura de doble hebra.

**[0207]** Se pueden hallar otros sitios Cas12a PAM/ARNg dentro de SEQ ID NO:10 que se pueden usar como potenciales secuencias OgRRS, según el resultado deseado después de la edición genómica. La Tabla 19 a continuación muestra las coordenadas de cada una de 418 secuencias OgRRS potenciales dentro de SEQ ID NO:10 y el elemento en el cual pueden hallarse. Las que se indican en negrita fueron previamente presentadas en la Tabla 17.

**Tabla 19. Secuencias OgRRS potenciales dentro de SEQ ID NO:10 y elementos**

| PAM/ARNg | PAM  | Hebra | Coordenadas dentro de SEQ ID NO:10 | Elemento dentro de SEQ ID NO: 10 |
|----------|------|-------|------------------------------------|----------------------------------|
| 1        | TTTA | +     | 28..54                             | ADN flanqueante 5'               |
| 2        | TTTA | +     | 79..105                            | ADN flanqueante 5'               |
| 3        | TTTG | +     | 84..110                            | ADN flanqueante 5'               |
| 4        | TTTA | +     | 111..137                           | ADN flanqueante 5'               |
| 5        | TTTA | +     | 121..147                           | ADN flanqueante 5'               |

| PAM/ARNg  | PAM         | Hebra    | Coordenadas dentro de SEQ ID NO:10 | Elemento dentro de SEQ ID NO: 10              |
|-----------|-------------|----------|------------------------------------|-----------------------------------------------|
| 6         | TTTG        | +        | 129..155                           | ADN flanqueante 5'                            |
| 7         | TTTA        | +        | 170..196                           | ADN flanqueante 5'                            |
| 8         | TTTG        | -        | 182..156                           | ADN flanqueante 5'                            |
| <b>9</b>  | <b>TTTA</b> | <b>-</b> | <b>189..163</b>                    | <b>ADN flanqueante 5'</b>                     |
| 10        | TTTA        | -        | 203..177                           | ADN flanqueante 5'                            |
| 11        | TTTA        | -        | 207..181                           | ADN flanqueante 5'                            |
| 12        | TTTA        | +        | 237..263                           | ADN flanqueante 5'                            |
| 13        | TTTG        | -        | 282..256                           | ADN flanqueante 5'                            |
| 14        | TTTC        | +        | 369..395                           | ADN flanqueante 5'                            |
| 15        | TTTC        | +        | 379..405                           | ADN flanqueante 5'                            |
| 16        | TTTC        | +        | 385..411                           | ADN flanqueante 5'                            |
| 17        | TTTG        | +        | 389..415                           | ADN flanqueante 5'                            |
| 18        | TTTC        | -        | 403..377                           | ADN flanqueante 5'                            |
| <b>19</b> | <b>TTTG</b> | <b>-</b> | <b>426..400</b>                    | <b>ADN flanqueante 5'</b>                     |
| 20        | TTTG        | +        | 430..456                           | ADN flanqueante 5'                            |
| 21        | TTTC        | -        | 494..468                           | ADN flanqueante 5'                            |
| 22        | TTTA        | -        | 503..477                           | ADN flanqueante 5'                            |
| 23        | TTTC        | -        | 507..481                           | ADN flanqueante 5'                            |
| <b>24</b> | <b>TTTG</b> | <b>+</b> | <b>546..572</b>                    | <b>ADN flanqueante 5'</b>                     |
| 25        | TTTG        | -        | 606..580                           | ADN flanqueante 5'                            |
| 26        | TTTA        | +        | 632..658                           | ADN flanqueante 5'                            |
| 27        | TTTA        | -        | 659..633                           | ADN flanqueante 5'                            |
| 28        | TTTA        | +        | 689..715                           | ADN flanqueante 5'                            |
| 29        | TTTA        | +        | 695..721                           | ADN flanqueante 5'                            |
| 30        | TTTC        | +        | 765..791                           | ADN flanqueante 5'                            |
| 31        | TTTA        | +        | 769..795                           | ADN flanqueante 5'                            |
| 32        | TTTC        | -        | 794..768                           | ADN flanqueante 5'                            |
| 33        | TTTA        | -        | 874..848                           | ADN flanqueante 5'                            |
| 34        | TTTA        | +        | 890..916                           | ADN flanqueante 5'                            |
| 35        | TTTG        | -        | 904..878                           | ADN flanqueante 5'                            |
| 36        | TTTA        | -        | 923..897                           | ADN flanqueante 5'                            |
| 37        | TTTC        | +        | 966..992                           | ADN flanqueante 5'                            |
| 38        | TTTA        | -        | 990..964                           | ADN flanqueante 5'                            |
| 39        | TTTG        | -        | 1021..995                          | ADN flanqueante 5'/Región borde derecho       |
| 40        | TTTC        | -        | 1044..1018                         | Región borde derecho                          |
| 41        | TTTG        | +        | 1038..1064                         | Región borde derecho                          |
| 42        | TTTC        | -        | 1051..1025                         | Región borde derecho                          |
| 43        | TTTG        | +        | 1155..1181                         | Entre región borde derecho y P-At.Ubq10-1:1:1 |
| 44        | TTTG        | +        | 1184..1210                         | P-At.Ubq10-1:1:1                              |
| 45        | TTTC        | -        | 1220..1194                         | P-At.Ubq10-1:1:1                              |
| 46        | TTTA        | -        | 1258..1232                         | P-At.Ubq10-1:1:1                              |
| 47        | TTTG        | -        | 1276..1250                         | P-At.Ubq10-1:1:1                              |

| PAM/ARNg | PAM  | Hebra | Coordenadas dentro de SEQ ID NO:10 | Elemento dentro de SEQ ID NO: 10      |
|----------|------|-------|------------------------------------|---------------------------------------|
| 48       | TTTA | -     | 1302..1276                         | P-At.Ubq10-1:1:1                      |
| 49       | TTTG | -     | 1328..1302                         | P-At.Ubq10-1:1:1                      |
| 50       | TTTA | +     | 1341..1367                         | P-At.Ubq10-1:1:1                      |
| 51       | TTTG | -     | 1373..1347                         | P-At.Ubq10-1:1:1                      |
| 52       | TTTG | -     | 1392..1366                         | P-At.Ubq10-1:1:1                      |
| 53       | TTTG | -     | 1408..1382                         | P-At.Ubq10-1:1:1                      |
| 54       | TTTC | +     | 1448..1474                         | P-At.Ubq10-1:1:1                      |
| 55       | TTTA | -     | 1471..1445                         | P-At.Ubq10-1:1:1                      |
| 56       | TTTC | +     | 1481..1507                         | P-At.Ubq10-1:1:1                      |
| 57       | TTTC | -     | 1491..1465                         | P-At.Ubq10-1:1:1                      |
| 58       | TTTA | +     | 1501..1527                         | P-At.Ubq10-1:1:1                      |
| 59       | TTTA | -     | 1527..1501                         | P-At.Ubq10-1:1:1                      |
| 60       | TTTG | -     | 1534..1508                         | P-At.Ubq10-1:1:1                      |
| 61       | TTTC | -     | 1579..1553                         | P-At.Ubq10-1:1:1                      |
| 62       | TTTC | -     | 1587..1561                         | P-At.Ubq10-1:1:1                      |
| 63       | TTTA | -     | 1654..1628                         | P-At.Ubq10-1:1:1                      |
| 64       | TTTA | -     | 1702..1676                         | P-At.Ubq10-1:1:1                      |
| 65       | TTTC | -     | 1737..1711                         | P-At.Ubq10-1:1:1                      |
| 66       | TTTA | -     | 1765..1739                         | P-At.Ubq10-1:1:1                      |
| 67       | TTTG | -     | 1775..1749                         | P-At.Ubq10-1:1:1                      |
| 68       | TTTA | +     | 1805..1831                         | P-At.Ubq10-1:1:1                      |
| 69       | TTTG | -     | 1818..1792                         | P-At.Ubq10-1:1:1                      |
| 70       | TTTG | -     | 1825..1799                         | P-At.Ubq10-1:1:1                      |
| 71       | TTTA | -     | 1844..1818                         | P-At.Ubq10-1:1:1                      |
| 72       | TTTG | +     | 1870..1896                         | P-At.Ubq10-1:1:1                      |
| 73       | TTTA | +     | 1904..1930                         | P-At.Ubq10-1:1:1                      |
| 74       | TTTC | +     | 1936..1962                         | P-At.Ubq10-1:1:1                      |
| 75       | TTTG | -     | 1996..1970                         | P-At.Ubq10-1:1:1                      |
| 76       | TTTG | -     | 2036..2010                         | L-At.Ubq10-1:1:1                      |
| 77       | TTTA | -     | 2044..2018                         | L-At.Ubq10-1:1:1                      |
| 78       | TTTC | +     | 2048..2074                         | L-At.Ubq10-1:1:1                      |
| 79       | TTTA | -     | 2082..2056                         | L-At.Ubq10-1:1:1                      |
| 80       | TTTC | +     | 2083..2109                         | Entre L-At.Ubq10-1:1:1 e I-At.Ubq10:3 |
| 81       | TTTG | -     | 2107..2081                         | I-At.Ubq10:3                          |
| 82       | TTTG | +     | 2117..2143                         | I-At.Ubq10:3                          |
| 83       | TTTC | +     | 2122..2148                         | I-At.Ubq10:3                          |
| 84       | TTTC | +     | 2138..2164                         | I-At.Ubq10:3                          |
| 85       | TTTG | +     | 2152..2178                         | I-At.Ubq10:3                          |
| 86       | TTTA | +     | 2157..2183                         | I-At.Ubq10:3                          |
| 87       | TTTC | +     | 2190..2216                         | I-At.Ubq10:3                          |
| 88       | TTTG | +     | 2198..2224                         | I-At.Ubq10:3                          |
| 89       | TTTC | +     | 2235..2261                         | I-At.Ubq10:3                          |
| 90       | TTTG | +     | 2254..2280                         | I-At.Ubq10:3                          |

| PAM/ARNg | PAM  | Hebra | Coordenadas dentro de SEQ ID NO:10 | Elemento dentro de SEQ ID NO: 10 |
|----------|------|-------|------------------------------------|----------------------------------|
| 91       | TTTG | -     | 2263..2237                         | I-At.Ubq10:3                     |
| 92       | TTTG | +     | 2267..2293                         | I-At.Ubq10:3                     |
| 93       | TTTG | +     | 2274..2300                         | I-At.Ubq10:3                     |
| 94       | TTTG | +     | 2297..2323                         | I-At.Ubq10:3                     |
| 95       | TTTC | +     | 2304..2330                         | I-At.Ubq10:3                     |
| 96       | TTTC | +     | 2327..2353                         | I-At.Ubq10:3                     |
| 97       | TTTG | +     | 2334..2360                         | I-At.Ubq10:3                     |
| 98       | TTTC | +     | 2368..2394                         | Entre I-At.Ubq10:3 y Cry1A.2     |
| 99       | TTTC | +     | 2478..2504                         |                                  |
| 100      | TTTG | +     | 2509..2535                         | Cry1A.2                          |
| 101      | TTTG | +     | 2515..2541                         | Cry1A.2                          |
| 102      | TTTC | +     | 2557..2583                         | Cry1A.2                          |
| 103      | TTTG | +     | 2569..2595                         | Cry1A.2                          |
| 104      | TTTG | +     | 2578..2604                         | Cry1A.2                          |
| 105      | TTTG | +     | 2583..2609                         | Cry1A.2                          |
| 106      | TTTC | +     | 2590..2616                         | Cry1A.2                          |
| 107      | TTTC | +     | 2617..2643                         | Cry1A.2                          |
| 108      | TTTA | +     | 2709..2735                         | Cry1A.2                          |
| 109      | TTTC | +     | 2731..2757                         | Cry1A.2                          |
| 110      | TTTG | +     | 2779..2805                         | Cry1A.2                          |
| 111      | TTTG | -     | 2846..2820                         | Cry1A.2                          |
| 112      | TTTC | +     | 2848..2874                         | Cry1A.2                          |
| 113      | TTTC | +     | 2865..2891                         | Cry1A.2                          |
| 114      | TTTG | -     | 2889..2863                         | Cry1A.2                          |
| 115      | TTTG | +     | 2902..2928                         | Cry1A.2                          |
| 116      | TTTG | +     | 2924..2950                         | Cry1A.2                          |
| 117      | TTTG | -     | 2933..2907                         | Cry1A.2                          |
| 118      | TTTC | +     | 2941..2967                         | Cry1A.2                          |
| 119      | TTTG | +     | 2977..3003                         | Cry1A.2                          |
| 120      | TTTC | +     | 2991..3017                         | Cry1A.2                          |
| 121      | TTTG | +     | 3034..3060                         | Cry1A.2                          |
| 122      | TTTG | +     | 3045..3071                         | Cry1A.2                          |
| 123      | TTTG | +     | 3103..3129                         | Cry1A.2                          |
| 124      | TTTC | +     | 3171..3197                         | Cry1A.2                          |
| 125      | TTTC | -     | 3191..3165                         | Cry1A.2                          |
| 126      | TTTC | +     | 3229..3255                         | Cry1A.2                          |
| 127      | TTTG | -     | 3353..3327                         | Cry1A.2                          |
| 128      | TTTC | +     | 3373..3399                         | Cry1A.2                          |
| 129      | TTTC | +     | 3394..3420                         | Cry1A.2                          |
| 130      | TTTA | +     | 3402..3428                         | Cry1A.2                          |
| 131      | TTTA | +     | 3465..3491                         | Cry1A.2                          |
| 132      | TTTC | +     | 3477..3503                         | Cry1A.2                          |
| 133      | TTTA | +     | 3489..3515                         | Cry1A.2                          |
| 134      | TTTC | +     | 3502..3528                         | Cry1A.2                          |

| <b>PAM/ARNg</b> | <b>PAM</b> | <b>Hebra</b> | <b>Coordenadas dentro de SEQ ID NO:10</b> | <b>Elemento dentro de SEQ ID NO: 10</b> |
|-----------------|------------|--------------|-------------------------------------------|-----------------------------------------|
| 135             | TTTC       | +            | 3531..3557                                | Cry1A.2                                 |
| 136             | TTTG       | -            | 3576..3550                                | Cry1A.2                                 |
| 137             | TTTA       | +            | 3591..3617                                | Cry1A.2                                 |
| 138             | TTTC       | +            | 3681..3707                                | Cry1A.2                                 |
| 139             | TTTC       | +            | 3690..3716                                | Cry1A.2                                 |
| 140             | TTTC       | +            | 3726..3752                                | Cry1A.2                                 |
| 141             | TTTG       | +            | 3837..3863                                | Cry1A.2                                 |
| 142             | TTTC       | +            | 3913..3939                                | Cry1A.2                                 |
| 143             | TTTC       | +            | 3918..3944                                | Cry1A.2                                 |
| 144             | TTTC       | +            | 4109..4135                                | Cry1A.2                                 |
| 145             | TTTC       | +            | 4123..4149                                | Cry1A.2                                 |
| 146             | TTTC       | +            | 4142..4168                                | Cry1A.2                                 |
| 147             | TTTG       | -            | 4152..4126                                | Cry1A.2                                 |
| 148             | TTTG       | +            | 4187..4213                                | Cry1A.2                                 |
| 149             | TTTA       | +            | 4218..4244                                | Cry1A.2                                 |
| 150             | TTTA       | +            | 4310..4336                                | Cry1A.2                                 |
| 151             | TTTC       | -            | 4420..4394                                | Cry1A.2                                 |
| 152             | TTTG       | -            | 4452..4426                                | Cry1A.2                                 |
| 153             | TTTC       | +            | 4492..4518                                | Cry1A.2                                 |
| 154             | TTTA       | +            | 4571..4597                                | Cry1A.2                                 |
| 155             | TTTC       | -            | 4715..4689                                | Cry1A.2                                 |
| 156             | TTTG       | -            | 4740..4714                                | Cry1A.2                                 |
| 157             | TTTG       | -            | 4824..4798                                | Cry1A.2                                 |
| 158             | TTTA       | +            | 4910..4936                                | Cry1A.2                                 |
| 159             | TTTA       | +            | 4973..4999                                | Cry1A.2                                 |
| 160             | TTTC       | +            | 5021..5047                                | Cry1A.2                                 |
| 161             | TTTC       | -            | 5083..5057                                | Cry1A.2                                 |
| 162             | TTTG       | -            | 5095..5069                                | Cry1A.2                                 |
| 163             | TTTC       | -            | 5104..5078                                | Cry1A.2                                 |
| 164             | TTTC       | -            | 5117..5091                                | Cry1A.2                                 |
| 165             | TTTG       | -            | 5121..5095                                | Cry1A.2                                 |
| 166             | TTTG       | -            | 5134..5108                                | Cry1A.2                                 |
| 167             | TTTG       | -            | 5143..5117                                | Cry1A.2                                 |
| 168             | TTTG       | +            | 5162..5188                                | Cry1A.2                                 |
| 169             | TTTG       | -            | 5202..5176                                | Cry1A.2                                 |
| 170             | TTTG       | +            | 5300..5326                                | Cry1A.2                                 |
| 171             | TTTA       | +            | 5333..5359                                | Cry1A.2                                 |
| 172             | TTTC       | -            | 5355..5329                                | Cry1A.2                                 |
| 173             | TTTA       | +            | 5375..5401                                | Cry1A.2                                 |
| 174             | TTTG       | -            | 5407..5381                                | Cry1A.2                                 |
| 175             | TTTC       | -            | 5627..5601                                | Cry1A.2                                 |
| 176             | TTTC       | -            | 5706..5680                                | Cry1A.2                                 |
| 177             | TTTG       | -            | 5856..5830                                | Cry1A.2                                 |
| 178             | TTTC       | -            | 5879..5853                                | Cry1A.2                                 |

| PAM/ARNg   | PAM         | Hebra    | Coordenadas dentro de SEQ ID NO:10 | Elemento dentro de SEQ ID NO: 10 |
|------------|-------------|----------|------------------------------------|----------------------------------|
| 179        | TTTG        | -        | 5887..5861                         | Cry1A.2                          |
| 180        | TTTC        | -        | 5900..5874                         | Cry1A.2                          |
| 181        | TTTC        | -        | 5909..5883                         | Cry1A.2                          |
| 182        | TTTG        | +        | 5979..6005                         | Entre Cry1A.2 y T-Mt.Zfp-1:2:1   |
| 183        | TTTG        | +        | 5988..6014                         | T-Mt.Zfp-1:2:1                   |
| 184        | TTTA        | +        | 6015..6041                         | T-Mt.Zfp-1:2:1                   |
| 185        | TTTA        | +        | 6020..6046                         | T-Mt.Zfp-1:2:1                   |
| 186        | TTTC        | +        | 6025..6051                         | T-Mt.Zfp-1:2:1                   |
| 187        | TTTG        | -        | 6093..6067                         | T-Mt.Zfp-1:2:1                   |
| 188        | TTTC        | +        | 6147..6173                         | T-Mt.Zfp-1:2:1                   |
| 189        | TTTA        | +        | 6155..6181                         | T-Mt.Zfp-1:2:1                   |
| 190        | TTTA        | -        | 6164..6138                         | T-Mt.Zfp-1:2:1                   |
| 191        | TTTA        | -        | 6184..6158                         | T-Mt.Zfp-1:2:1                   |
| 192        | TTTC        | +        | 6191..6217                         | T-Mt.Zfp-1:2:1                   |
| 193        | TTTC        | -        | 6225..6199                         | T-Mt.Zfp-1:2:1                   |
| 194        | TTTG        | -        | 6260..6234                         | T-Mt.Zfp-1:2:1                   |
| 195        | TTTA        | +        | 6283..6309                         | T-Mt.Zfp-1:2:1                   |
| 196        | TTTC        | +        | 6296..6322                         | T-Mt.Zfp-1:2:1                   |
| 197        | TTTC        | +        | 6309..6335                         | T-Mt.Zfp-1:2:1                   |
| 198        | TTTA        | +        | 6341..6367                         | T-Mt.Zfp-1:2:1                   |
| 199        | TTTC        | +        | 6373..6399                         | T-Mt.Zfp-1:2:1                   |
| 200        | TTTA        | +        | 6388..6414                         | T-Mt.Zfp-1:2:1                   |
| 201        | TTTA        | +        | 6406..6432                         | T-Mt.Zfp-1:2:1                   |
| 202        | TTTA        | +        | 6423..6449                         | T-Mt.Zfp-1:2:1                   |
| 203        | TTTA        | +        | 6462..6488                         | T-Mt.Zfp-1:2:1                   |
| 204        | TTTA        | -        | 6504..6478                         | T-Mt.Zfp-1:2:1                   |
| 205        | TTTG        | -        | 6521..6495                         | T-Mt.Zfp-1:2:1                   |
| 206        | TTTC        | +        | 6515..6541                         | T-Mt.Zfp-1:2:1                   |
| 207        | TTTA        | +        | 6534..6560                         | T-Mt.Zfp-1:2:1                   |
| 208        | TTTG        | -        | 6544..6518                         | T-Mt.Zfp-1:2:1                   |
| 209        | TTTG        | -        | 6550..6524                         | T-Mt.Zfp-1:2:1                   |
| <b>210</b> | <b>TTTA</b> | <b>+</b> | <b>6569..6595</b>                  | <b>Entre casetes</b>             |
| 211        | TTTG        | +        | 6586..6612                         | Entre casetes                    |
| <b>212</b> | <b>TTTC</b> | <b>-</b> | <b>6674..6648</b>                  | <b>Entre casetes</b>             |
| 213        | TTTC        | +        | 6703..6729                         | P-CUCme.CipLhcb:1                |
| 214        | TTTC        | +        | 6804..6830                         | P-CUCme.CipLhcb:1                |
| 215        | TTTG        | +        | 6837..6863                         | P-CUCme.CipLhcb:1                |
| 216        | TTTC        | +        | 6882..6908                         | P-CUCme.CipLhcb:1                |
| 217        | TTTC        | +        | 6886..6912                         | P-CUCme.CipLhcb:1                |
| 218        | TTTG        | -        | 6911..6885                         | P-CUCme.CipLhcb:1                |
| 219        | TTTA        | -        | 6917..6891                         | P-CUCme.CipLhcb:1                |
| 220        | TTTG        | +        | 6968..6994                         | P-CUCme.CipLhcb:1                |
| 221        | TTTA        | -        | 6980..6954                         | P-CUCme.CipLhcb:1                |
| 222        | TTTC        | +        | 6973..6999                         | P-CUCme.CipLhcb:1                |

| <b>PAM/ARNg</b> | <b>PAM</b> | <b>Hebra</b> | <b>Coordenadas dentro de SEQ ID NO:10</b> | <b>Elemento dentro de SEQ ID NO: 10</b> |
|-----------------|------------|--------------|-------------------------------------------|-----------------------------------------|
| 223             | TTTA       | -            | 7001..6975                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 224             | TTTA       | +            | 7003..7029                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 225             | TTTC       | -            | 7014..6988                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 226             | TTTA       | -            | 7019..6993                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 227             | TTTA       | -            | 7030..7004                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 228             | TTTA       | -            | 7035..7009                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 229             | TTTC       | +            | 7047..7073                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 230             | TTTA       | +            | 7057..7083                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 231             | TTTG       | +            | 7073..7099                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 232             | TTTG       | +            | 7088..7114                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 233             | TTTG       | -            | 7128..7102                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 234             | TTTG       | -            | 7146..7120                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 235             | TTTC       | +            | 7183..7209                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 236             | TTTG       | +            | 7188..7214                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 237             | TTTA       | +            | 7208..7234                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 238             | TTTC       | +            | 7234..7260                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 239             | TTTG       | +            | 7245..7271                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 240             | TTTC       | -            | 7268..7242                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 241             | TTTG       | +            | 7278..7304                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 242             | TTTC       | +            | 7298..7324                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 243             | TTTA       | +            | 7307..7333                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 244             | TTTC       | -            | 7329..7303                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 245             | TTTC       | -            | 7335..7309                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 246             | TTTA       | -            | 7357..7331                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 247             | TTTA       | +            | 7385..7411                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 248             | TTTA       | +            | 7393..7419                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 249             | TTTA       | -            | 7402..7376                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 250             | TTTG       | -            | 7420..7394                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 251             | TTTG       | +            | 7447..7473                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 252             | TTTC       | +            | 7475..7501                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 253             | TTTG       | -            | 7487..7461                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 254             | TTTA       | +            | 7504..7530                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 255             | TTTA       | +            | 7554..7580                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 256             | TTTA       | -            | 7582..7556                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 257             | TTTA       | +            | 7584..7610                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 258             | TTTG       | +            | 7588..7614                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 259             | TTTA       | +            | 7616..7642                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 260             | TTTG       | +            | 7629..7655                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 261             | TTTA       | -            | 7659..7633                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 262             | TTTA       | +            | 7708..7734                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 263             | TTTA       | +            | 7724..7750                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 264             | TTTG       | -            | 7744..7718                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 265             | TTTC       | -            | 7770..7744                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 266             | TTTC       | -            | 7789..7763                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |

| <b>PAM/ARNg</b> | <b>PAM</b> | <b>Hebra</b> | <b>Coordenadas dentro de SEQ ID NO:10</b> | <b>Elemento dentro de SEQ ID NO: 10</b> |
|-----------------|------------|--------------|-------------------------------------------|-----------------------------------------|
| 267             | TTTC       | +            | 7813..7839                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 268             | TTTA       | +            | 7867..7893                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 269             | TTTC       | +            | 7875..7901                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 270             | TTTG       | +            | 7880..7906                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 271             | TTTA       | +            | 7949..7975                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 272             | TTTA       | +            | 7959..7985                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 273             | TTTG       | +            | 7963..7989                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 274             | TTTA       | -            | 7983..7957                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 275             | TTTA       | +            | 7976..8002                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 276             | TTTG       | +            | 7985..8011                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 277             | TTTC       | -            | 8012..7986                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 278             | TTTC       | +            | 8035..8061                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 279             | TTTA       | -            | 8083..8057                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 280             | TTTA       | -            | 8095..8069                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 281             | TTTA       | -            | 8145..8119                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 282             | TTTG       | +            | 8147..8173                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 283             | TTTA       | +            | 8157..8183                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 284             | TTTG       | -            | 8198..8172                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 285             | TTTA       | +            | 8227..8253                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 286             | TTTA       | -            | 8246..8220                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 287             | TTTA       | +            | 8241..8267                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 288             | TTTA       | +            | 8249..8275                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 289             | TTTG       | +            | 8254..8280                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 290             | TTTG       | -            | 8281..8255                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 291             | TTTA       | +            | 8273..8299                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 292             | TTTG       | -            | 8286..8260                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 293             | TTTG       | +            | 8287..8313                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 294             | TTTG       | -            | 8312..8286                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 295             | TTTA       | -            | 8328..8302                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 296             | TTTA       | +            | 8330..8356                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 297             | TTTC       | -            | 8400..8374                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 298             | TTTA       | -            | 8409..8383                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 299             | TTTA       | -            | 8436..8410                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 300             | TTTC       | -            | 8449..8423                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 301             | TTTG       | -            | 8470..8444                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 302             | TTTA       | +            | 8477..8503                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 303             | TTTG       | -            | 8525..8499                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 304             | TTTC       | +            | 8527..8553                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 305             | TTTC       | +            | 8538..8564                                | P-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 306             | TTTC       | +            | 8637..8663                                | L-CUCme.CipLhcb:1                       |
| 307             | TTTC       | -            | 8693..8667                                | Entre L-CUCme.CipLhcb:1 y Cry1B.2       |
| 308             | TTTG       | -            | 8741..8715                                | Cry1B.2                                 |
| 309             | TTTG       | -            | 8908..8882                                | Cry1B.2                                 |

| <b>PAM/ARNg</b> | <b>PAM</b> | <b>Hebra</b> | <b>Coordenadas dentro de SEQ ID NO:10</b> | <b>Elemento dentro de SEQ ID NO: 10</b> |
|-----------------|------------|--------------|-------------------------------------------|-----------------------------------------|
| 310             | TTTC       | +            | 8916..8942                                | Cry1B.2                                 |
| 311             | TTTC       | -            | 8971..8945                                | Cry1B.2                                 |
| 312             | TTTG       | -            | 9413..9387                                | Cry1B.2                                 |
| 313             | TTTC       | +            | 9627..9653                                | Cry1B.2                                 |
| 314             | TTTC       | +            | 9675..9701                                | Cry1B.2                                 |
| 315             | TTTA       | +            | 9841..9867                                | Cry1B.2                                 |
| 316             | TTTA       | +            | 9857..9883                                | Cry1B.2                                 |
| 317             | TTTC       | +            | 10100..10126                              | Cry1B.2                                 |
| 318             | TTTG       | +            | 10326..10352                              | Cry1B.2                                 |
| 319             | TTTC       | +            | 10501..10527                              | Cry1B.2                                 |
| 320             | TTTC       | +            | 10575..10601                              | Cry1B.2                                 |
| 321             | TTTG       | -            | 10788..10762                              | Cry1B.2                                 |
| 322             | TTTG       | +            | 10948..10974                              | Cry1B.2                                 |
| 323             | TTTC       | -            | 10998..10972                              | Cry1B.2                                 |
| 324             | TTTA       | -            | 11085..11059                              | Cry1B.2                                 |
| 325             | TTTC       | -            | 11301..11275                              | Cry1B.2                                 |
| 326             | TTTC       | -            | 11413..11387                              | Cry1B.2                                 |
| 327             | TTTA       | -            | 11555..11529                              | Cry1B.2                                 |
| 328             | TTTC       | +            | 11640..11666                              | Cry1B.2                                 |
| 329             | TTTG       | -            | 12134..12108                              | Cry1B.2                                 |
| 330             | TTTC       | +            | 12147..12173                              | Cry1B.2                                 |
| 331             | TTTC       | -            | 12178..12152                              | Cry1B.2                                 |
| 332             | TTTC       | -            | 12244..12218                              | Cry1B.2                                 |
| 333             | TTTA       | +            | 12253..12279                              | T-Mt.Lox-1-1:2:1                        |
| 334             | TTTA       | +            | 12257..12283                              | T-Mt.Lox-1-1:2:1                        |
| 335             | TTTC       | +            | 12278..12304                              | T-Mt.Lox-1-1:2:1                        |
| 336             | TTTA       | -            | 12287..12261                              | T-Mt.Lox-1-1:2:1                        |
| 337             | TTTG       | -            | 12308..12282                              | T-Mt.Lox-1-1:2:1                        |
| 338             | TTTC       | +            | 12370..12396                              | T-Mt.Lox-1-1:2:1                        |
| 339             | TTTA       | +            | 12381..12407                              | T-Mt.Lox-1-1:2:1                        |
| 340             | TTTG       | +            | 12385..12411                              | T-Mt.Lox-1-1:2:1                        |
| 341             | TTTA       | -            | 12407..12381                              | T-Mt.Lox-1-1:2:1                        |
| 342             | TTTA       | +            | 12402..12428                              | T-Mt.Lox-1-1:2:1                        |
| 343             | TTTG       | +            | 12410..12436                              | T-Mt.Lox-1-1:2:1                        |
| 344             | TTTG       | +            | 12417..12443                              | T-Mt.Lox-1-1:2:1                        |
| 345             | TTTG       | -            | 12430..12404                              | T-Mt.Lox-1-1:2:1                        |
| 346             | TTTG       | -            | 12448..12422                              | T-Mt.Lox-1-1:2:1                        |
| 347             | TTTG       | +            | 12467..12493                              | T-Mt.Lox-1-1:2:1                        |
| 348             | TTTA       | +            | 12475..12501                              | T-Mt.Lox-1-1:2:1                        |
| 349             | TTTA       | +            | 12523..12549                              | T-Mt.Lox-1-1:2:1                        |
| 350             | TTTG       | +            | 12527..12553                              | T-Mt.Lox-1-1:2:1                        |
| 351             | TTTA       | -            | 12537..12511                              | T-Mt.Lox-1-1:2:1                        |
| 352             | TTTA       | +            | 12554..12580                              | T-Mt.Lox-1-1:2:1                        |
| 353             | TTTG       | +            | 12604..12630                              | T-Mt.Lox-1-1:2:1                        |

| <b>PAM/ARNg</b> | <b>PAM</b> | <b>Hebra</b> | <b>Coordenadas dentro de SEQ ID NO:10</b> | <b>Elemento dentro de SEQ ID NO: 10</b>            |
|-----------------|------------|--------------|-------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| 354             | TTTC       | -            | 12647..12621                              | T-Mt.Lox-1-1:2:1                                   |
| 355             | TTTG       | -            | 12703..12677                              | T-Mt.Lox-1-1:2:1                                   |
| 356             | TTTC       | +            | 12695..12721                              | T-Mt.Lox-1-1:2:1                                   |
| 357             | TTTC       | +            | 12714..12740                              | T-Mt.Lox-1-1:2:1                                   |
| 358             | TTTC       | +            | 12718..12744                              | T-Mt.Lox-1-1:2:1                                   |
| 359             | TTTA       | -            | 12818..12792                              | T-Mt.Lox-1-1:2:1                                   |
| 360             | TTTA       | +            | 12813..12839                              | T-Mt.Lox-1-1:2:1                                   |
| 361             | TTTG       | -            | 12854..12828                              | T-Mt.Lox-1-1:2:1                                   |
| 362             | TTTA       | -            | 12873..12847                              | Entre T-Mt.Lox-1-1:2:1 y Región de borde izquierdo |
| 363             | TTTA       | +            | 12868..12894                              | Entre T-Mt.Lox-1-1:2:1 y Región de borde izquierdo |
| 364             | TTTG       | +            | 12888..12914                              | Entre T-Mt.Lox-1-1:2:1 y Región de borde izquierdo |
| 365             | TTTG       | -            | 12906..12880                              | Entre T-Mt.Lox-1-1:2:1 y Región de borde izquierdo |
| 366             | TTTG       | +            | 12987..13013                              | Entre T-Mt.Lox-1-1:2:1 y Región de borde izquierdo |
| 367             | TTTC       | -            | 13014..12988                              | Entre T-Mt.Lox-1-1:2:1 y Región de borde izquierdo |
| 368             | TTTA       | -            | 13018..12992                              | Entre T-Mt.Lox-1-1:2:1 y Región de borde izquierdo |
| 369             | TTTC       | +            | 13021..13047                              | Región borde izquierdo                             |
| 370             | TTTG       | +            | 13038..13064                              | Región borde izquierdo                             |
| 371             | TTTA       | +            | 13042..13068                              | Región borde izquierdo                             |
| 372             | TTTC       | +            | 13050..13076                              | Región borde izquierdo                             |
| 373             | TTTA       | -            | 13062..13036                              | Región borde izquierdo                             |
| 374             | TTTG       | +            | 13078..13104                              | Región borde izquierdo                             |
| 375             | TTTG       | -            | 13094..13068                              | Región borde izquierdo                             |
| 376             | TTTA       | +            | 13086..13112                              | Región borde izquierdo                             |
| 377             | TTTC       | +            | 13101..13127                              | Región borde izquierdo                             |
| 378             | TTTA       | +            | 13107..13133                              | Región borde izquierdo                             |
| 379             | TTTC       | +            | 13172..13198                              | Región borde izquierdo                             |
| 380             | TTTC       | +            | 13215..13241                              | Región borde izquierdo                             |
| 381             | TTTA       | +            | 13234..13260                              | Región borde derecho/ADN flanqueante 3'            |
| 382             | TTTG       | -            | 13266..13240                              | ADN flanqueante 3'                                 |
| 383             | TTTA       | +            | 13279..13305                              | ADN flanqueante 3'                                 |
| 384             | TTTC       | -            | 13298..13272                              | ADN flanqueante 3'                                 |
| 385             | TTTC       | +            | 13325..13351                              | ADN flanqueante 3'                                 |
| 386             | TTTA       | +            | 13335..13361                              | ADN flanqueante 3'                                 |
| 387             | TTTG       | +            | 13339..13365                              | ADN flanqueante 3'                                 |
| 388             | TTTC       | +            | 13343..13369                              | ADN flanqueante 3'                                 |
| 389             | TTTA       | +            | 13375..13401                              | ADN flanqueante 3'                                 |
| 390             | TTTA       | -            | 13513..13487                              | ADN flanqueante 3'                                 |

| PAM/ARNg   | PAM         | Hebra    | Coordenadas dentro de SEQ ID NO:10 | Elemento dentro de SEQ ID NO: 10 |
|------------|-------------|----------|------------------------------------|----------------------------------|
| 391        | TTTG        | +        | 13590..13616                       | ADN flanqueante 3'               |
| 392        | TTTG        | +        | 13636..13662                       | ADN flanqueante 3'               |
| 393        | TTTC        | +        | 13662..13688                       | ADN flanqueante 3'               |
| 394        | TTTG        | -        | 13715..13689                       | ADN flanqueante 3'               |
| 395        | TTTG        | +        | 13746..13720                       | ADN flanqueante 3'               |
| 396        | TTTG        | -        | 13733..13707                       | ADN flanqueante 3'               |
| 397        | TTTG        | +        | 13741..13767                       | ADN flanqueante 3'               |
| 398        | TTTA        | +        | 13796..13822                       | ADN flanqueante 3'               |
| 399        | TTTG        | +        | 13802..13828                       | ADN flanqueante 3'               |
| 400        | TTTG        | -        | 13823..13797                       | ADN flanqueante 3'               |
| 401        | TTTC        | +        | 13854..13880                       | ADN flanqueante 3'               |
| 402        | TTTA        | -        | 13865..13839                       | ADN flanqueante 3'               |
| 403        | TTTA        | +        | 13860..13886                       | ADN flanqueante 3'               |
| 404        | TTTA        | -        | 13885..13859                       | ADN flanqueante 3'               |
| 405        | TTTA        | -        | 13921..13895                       | ADN flanqueante 3'               |
| 406        | TTTC        | -        | 13933..13907                       | ADN flanqueante 3'               |
| 407        | TTTG        | +        | 13991..14017                       | ADN flanqueante 3'               |
| 408        | TTTC        | +        | 14005..14031                       | ADN flanqueante 3'               |
| 409        | TTTG        | -        | 14026..14000                       | ADN flanqueante 3'               |
| 410        | TTTG        | +        | 14027..14053                       | ADN flanqueante 3'               |
| <b>411</b> | <b>TTTG</b> | <b>+</b> | <b>14039..14065</b>                | <b>ADN flanqueante 3'</b>        |
| 412        | TTTA        | -        | 14060..14034                       | ADN flanqueante 3'               |
| 413        | TTTC        | +        | 14072..14098                       | ADN flanqueante 3'               |
| 414        | TTTG        | +        | 14097..14123                       | ADN flanqueante 3'               |
| 415        | TTTA        | -        | 14112..14086                       | ADN flanqueante 3'               |
| 416        | TTTG        | +        | 14122..14148                       | ADN flanqueante 3'               |
| 417        | TTTA        | +        | 14130..14156                       | ADN flanqueante 3'               |
| 418        | TTTG        | +        | 14184..14210                       | ADN flanqueante 3'               |

### EJEMPLO 9

#### Modificación del evento de soja GM\_CSM63770 para facilitar las técnicas de edición genómica usando dos ARN guía.

[0208] Este ejemplo describe la escisión de la totalidad o una parte del ADN transgénico insertado o un casete de expresión dentro del ADN transgénico insertado que define y está presente en el evento de soja GM\_CSM63770, usando sistemas de edición CRISPR que comprenden dos ARN guía mediante métodos de edición genómica. La escisión de la inserción del evento transgénico GM\_CSM63770 o de casetes de expresión dentro de SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:10 se puede realizar a través de edición genómica usando una variedad de métodos. En una realización, se pueden usar para la escisión dirigida sistemas de edición de repeticiones

palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas (CRISPR) que comprenden una proteína asociada CRISPR y dos ARN guía cognados. La proteína asociada a CRISPR es una nucleasa guiada por ARN y se puede seleccionar entre una proteína asociada a CRISPR Tipo I, una proteína asociada a CRISPR Tipo II, una proteína asociada a CRISPR Tipo III, una proteína asociada a CRISPR Tipo IV, una proteína asociada a CRISPR Tipo V, o una proteína asociada a CRISPR Tipo VI, tales como, entre otras, Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (también conocida como Csn1 y Csx12), Cas10, Cas12a (también conocida como Cpf1), Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4, CasX, CasY y Mad7. Se pueden introducir la proteína asociada a CRISPR y dos ARN guía (ARNg) en una célula de una planta que comprende el evento de soja GM\_CSM63770 para dirigir una secuencia específica dentro del locus de inserción transgénica. En una realización, el sistema de nucleasa CRISPR escinde dos sitios distintos de hibridación de ARN guía por lo cual permite la escisión de la secuencia interviniente. Luego de la escisión del ADN, la secuencia genómica se puede reparar mediante una vía de reparación de rotura de doble hebra, que puede incluir, por ejemplo, unión de extremos no homólogos (NHEJ), unión de extremos mediada por microhomología (MMEJ), recombinación homóloga, apareamiento de hebras dependiente de síntesis (SDSA), o una combinación de estos, en el sitio genómico diana.

**[0209]** Los ARN guía presentados en la Tabla 18 del Ejemplo 8 se usan para extirpar el casete transgénico completo, o alternativamente, se usan para remover uno de los dos casetes de expresión en el evento de soja GM\_CSM63770. Por ejemplo, se usan el ARNg seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOs:28-30 y el ARNg presentado como SEQ ID NO:31 para guiar una nucleasa Cas12a para efectuar un corte dentro de regiones de la secuencia genómica flanqueante 5' y 3' del evento de soja GM\_CSM63770 provocando la escisión del inserto transgénico completo. Alternativamente, para extirpar el casete de expresión Cry1A.2 del evento de soja GM\_CSM63770 se selecciona un ARNg del grupo que consiste en SEQ ID NOs:28-30 y se selecciona un ARNg del grupo que consiste en SEQ ID NOs:32 y 33 y se usa para guiar una nucleasa Cas12a para efectuar un corte dentro de la región de la secuencia genómica flanqueante 5' y una región entre los dos casetes transgénicos provocando la escisión del casete de expresión Cry1A.2. De igual manera, para extirpar el casete de expresión Cry1B.2 del evento de soja GM\_CSM63770 se selecciona un ARNg del grupo que consiste en SEQ ID NOs:32 y 33 y el ARNg que se presentó como SEQ ID NO:31 se usa para guiar una nucleasa

Cas12a para efectuar un corte dentro de la región entre los dos casetes transgénicos y con la región de la secuencia genómica flanqueante 3' que provoca la escisión del casete de expresión Cry1B.2.

**[0210]** Todas las publicaciones y documentos de patentes publicados citados en esta memoria descriptiva, y que son esenciales para la invención, se incorporan a la presente a modo de referencia con el mismo alcance que si se indicara que cada publicación o solicitud de patente individual se incorporara específica e individualmente a modo de referencia.

**[0211]** Habiendo ilustrado y descrito los principios de la presente invención, se tornará evidente a los expertos en la técnica que la invención se puede modificar en disposición y en detalle sin apartarse de tales principios. Se reivindican todas las modificaciones que están dentro del espíritu y del alcance de las reivindicaciones adjuntas.