

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 032**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06724340 .2**
96 Fecha de presentación: **04.04.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1871901**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.01.2008**

54 Título: **SUCESO ÉLITE A5547-127 Y KITS PARA IDENTIFICAR TAL SUCESO EN MUESTRAS BIOLÓGICAS.**

30 Prioridad:
11.04.2005 EP 05075846
12.04.2005 US 670414 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.11.2011

73 Titular/es:
BAYER BIOSCIENCE N.V.
TECHNOLOGIEPARK 38
9052 GENT, BE

72 Inventor/es:
DE BEUCKELEER, Marc

74 Agente: **Lehmann Novo, Isabel**

ES 2 369 032 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Suceso élite A5547-127 y métodos y kits para identificar tal suceso en muestras biológicas

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a métodos y a kits para identificar en muestras biológicas la presencia de material vegetal que comprende específicamente el suceso de transformación A5547-127, así como plantas de haba de soja transgénicas, material vegetal y semillas que contienen tal suceso. Las plantas de haba de soja de la invención combinan el fenotipo tolerante a herbicidas con un comportamiento agronómico, estabilidad genética y adaptabilidad a diferentes trasfondos genéticos equivalente a la línea de haba de soja no transformada en ausencia de presión de malas hierbas.

10 Antecedentes de la invención

La expresión fenotípica de un transgén en una planta está determinada tanto por la estructura del propio gen como por su localización en el genoma de la planta. Al mismo tiempo, la presencia del transgén (en un ADN extraño) en diferentes localizaciones en el genoma influirá en el fenotipo global de la planta de diferentes maneras. La introducción agronómica o industrialmente con éxito de un rasgo comercialmente interesante en una planta por manipulación genética puede ser un procedimiento laborioso que depende de diferentes factores. La transformación y regeneración reales de plantas transformadas genéticamente son sólo la primera en una serie de etapas de selección, que incluyen caracterización genética amplia, reproducción, y evaluación en pruebas de campo, que conducen finalmente a la selección de un suceso élite.

La identificación inequívoca de un suceso élite está adquiriendo importancia creciente en vista de las discusiones acerca de Nuevos Alimentos y Piensos, segregación de productos GMO y no GMO, y la identificación de material patentado. Idealmente, dicho método de identificación es tanto rápido como simple, sin necesidad de un montaje amplio de laboratorio. Adicionalmente, el método debería proporcionar resultados que permitan la determinación inequívoca del suceso élite sin interpretación de expertos, pero que soporte el escrutinio de expertos en caso necesario.

25 A5547-127 se seleccionó como un suceso élite en el desarrollo de haba de soja (*Glycine max* L.) resistente al herbicida Liberty®, por transformación de haba de soja con un plásmido que comprende el gen pat sintético que codifica la tolerancia a la fosfotricina y se puede vender comercialmente como haba de soja Liberty Link®. Las herramientas para uso en métodos simples e inequívocos a fin de identificar el suceso élite A5547-127 en muestras biológicas se describen en esta memoria.

30 Sumario de la invención

La presente invención se refiere a métodos para identificar el suceso élite A5547-127 en muestras biológicas, métodos que están basados en cebadores o sondas que reconocen específicamente la secuencia flanqueante 5' y/o 3' de A5547-127.

La materia objeto de la presente invención se define por las reivindicaciones.

35 De modo más específico, la invención se refiere a un método que comprende amplificar una secuencia de un ácido nucleico presente en muestras biológicas, usando una reacción en cadena de la polimerasa con al menos dos cebadores, uno de los cuales reconoce la región flanqueante de 5' o 3' de A5547-127, reconociendo el otro una secuencia dentro del ADN extraño, preferiblemente para obtener un fragmento de ADN de un tamaño comprendido entre 100 y 500 pb. Los cebadores pueden reconocer una secuencia en la región flanqueante de 5' de A5547-127 (SEC ID nº 1, desde la posición 1 hasta la posición 311) o en la región flanqueante de 3' de A5547-127 (complemento de SEC ID nº 2, desde la posición 510 hasta la posición 1880), y una secuencia en el ADN extraño (complemento de SEC ID nº 1, desde la posición 312 a 810, o SEC ID nº 2, desde la posición 1 hasta la posición 510), respectivamente. El cebador que reconoce la región flanqueante de 5' puede comprender la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 15, y el cebador que reconoce una secuencia en el ADN extraño puede comprender la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 13 descrita en esta memoria.

La presente invención se refiere más específicamente a un método para identificar el suceso élite A5547-127 en muestras biológicas, método el cual comprende amplificar una secuencia de un ácido nucleico presente en una muestra biológica, usando una reacción en cadena de la polimerasa con dos cebadores que tienen la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 15 y SEC ID nº 13 respectivamente, para obtener un fragmento de ADN de alrededor de 151 pb.

La presente invención se refiere adicionalmente a las secuencias flanqueantes específicas de A5547-127 descritas en esta memoria, que se pueden usar para desarrollar métodos específicos de identificación para A5547-127 en muestras biológicas. Más particularmente, la invención se refiere a las regiones flanqueantes de 5' y/o 3' de A5547-

127 que se pueden usar para el desarrollo de cebadores y sondas específicos como se describe posteriormente aquí. La invención se refiere adicionalmente a métodos de identificación para determinar la presencia de A5547-127 en muestras biológicas basados en el uso de tales cebadores o sondas específicos. Los cebadores puede consistir en una secuencia nucleotídica de 17 a alrededor de 200 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia nucleotídica de SEQ ID n° 1 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 311, o el complemento de la secuencia nucleotídica de SEQ ID 2 desde el nucleótido 510 hasta el nucleótido 1880, combinados con cebadores que consisten en una secuencia nucleotídica de 17 a alrededor de 200 nucleótidos consecutivos seleccionados del complemento de la secuencia nucleotídica de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 312 hasta el nucleótido 810, o la secuencia nucleotídica de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 510. Los cebadores también pueden comprender estas secuencias nucleotídicas localizadas en su extremo 3', y pueden comprender además secuencias no relacionadas o secuencias derivadas de las secuencias nucleotídicas mencionadas, pero que comprenden desemparejamientos.

La invención se refiere adicionalmente a kits para identificar el suceso élite A5547-127 en muestras biológicas, comprendiendo dichos kits al menos un cebador o sonda que reconoce específicamente la región flanqueante de 5' o 3' de A5547-127.

El kit de la invención puede comprender, además de un cebador que reconoce específicamente la región flanqueante de 5' o 3' de A5547-127, un segundo cebador que reconoce específicamente una secuencia dentro del ADN extraño de A5547-127, para uso en un protocolo de identificación mediante PCR. Preferiblemente, el kit de la invención comprende dos cebadores específicos, uno de los cuales reconoce una secuencia dentro de la región flanqueante de 5' de A5547-127, y reconociendo el otro una secuencia en el ADN extraño. Especialmente, el cebador que reconoce la región flanqueante de 5' puede comprender la secuencia nucleotídica de SEC ID n° 14, y el cebador que reconoce el transgén puede comprender la secuencia nucleotídica de SEC ID n° 13 o cualquier otro cebador como se describe en esta memoria.

La invención se refiere adicionalmente a un kit para identificar el suceso élite A5547-127 en muestras biológicas, comprendiendo dicho kit los cebadores de la PCR que tienen la secuencia nucleotídica de SEC ID n° 13 y SEC ID n° 15, para uso en el protocolo de identificación mediante PCR de A5547-127 descrito en esta memoria.

La invención se refiere también a un kit para identificar el suceso élite A5547-127 en muestras biológicas, kit que comprende una sonda específica que tiene una secuencia que corresponde (o es complementaria a) una secuencia que tiene entre 80% y 100% de identidad de secuencia con una región específica de A5547-127. Preferiblemente, la secuencia de la sonda corresponde a una región específica que comprende parte de la región flanqueante de 5' o 3' de A5547-127. Muy preferiblemente, la sonda específica tiene (o es complementaria a) una secuencia que tiene entre 80% y 100% de identidad de secuencia con la secuencia comprendida entre el nucleótido 260 y 360 de SEC ID n° 1, o la secuencia entre el nucleótido 460 y 560 de SEC ID n° 2.

Los métodos y kits se pueden usar para diferentes fines, tales como, pero sin carácter limitante, los siguientes: identificar la presencia o ausencia de A5547-127 en plantas, material vegetal o en productos tales como, pero sin carácter limitante, productos alimentarios o piensos (nuevos o elaborados) que comprenden o derivan de material vegetal; adicional o alternativamente, los métodos y kits de la presente invención se pueden usar para identificar material vegetal transgénico con fines de segregación entre material transgénico y no transgénico; adicional o alternativamente, los métodos y kits de la presente invención se pueden usar para determinar la calidad (es decir, el porcentaje de material puro) de material vegetal que comprende A5547-127.

La descripción se refiere adicionalmente a las regiones flanqueantes de 5' y/o 3' de A5547-127, así como a los cebadores y sondas específicos desarrollados a partir de las secuencias flanqueantes de 5' y/o 3' de A5547-127.

La descripción también se refiere a plantas de haba de soja, sus partes, células, semillas y plantas de progenia que comprenden el suceso elite A5547-127. Tales plantas, sus partes, células, semillas y plantas de progenie se pueden identificar usando los métodos como se describen aquí.

Descripción detallada

La incorporación de una molécula de ADN recombinante en el genoma de una planta resulta típicamente de la transformación de una célula o tejido (o de otra manipulación genética). El sitio particular de incorporación se debe a integración "aleatoria", o se encuentra en una localización predeterminada (si se usa un procedimiento de integración direccionada).

El ADN introducido en el genoma vegetal como resultado de la transformación de una célula o tejido vegetal con un ADN recombinante o "ADN transformante", y que se origina a partir de tal ADN transformante, se conoce en esta memoria como "ADN extraño", comprendiendo uno o más "transgenes". "ADN vegetal", en el contexto de la presente invención, hará referencia a ADN que se origina de la planta que se transforma. El ADN vegetal se encontrará habitualmente en el mismo locus genético en la planta de tipo salvaje correspondiente. El ADN extraño puede caracterizarse por la localización y la configuración en el sitio de incorporación de la molécula de ADN recombinante

en el genoma de la planta. El sitio en el genoma vegetal en el que se ha insertado un ADN recombinante se conoce también como el "sitio de inserción" o "sitio diana". La inserción del ADN recombinante en el genoma de la planta puede estar asociada con una supresión de ADN vegetal, denominada como "supresión del sitio diana". Una "región flanqueante" o "secuencia flanqueante", tal como se usa en esta memoria, hace referencia a una secuencia de al menos 20 pb, preferiblemente al menos 50 pb, y hasta 5000 pb del genoma de la planta, que está localizada inmediatamente aguas arriba de y contigua, o inmediatamente aguas abajo de y contigua, al ADN extraño. Los procedimientos de transformación que conducen a integración aleatoria del ADN extraño darán como resultado transformantes con regiones flanqueantes diferentes, que son características y exclusivas de cada transformante. Cuando el ADN recombinante se introduce en una planta por cruzamiento tradicional, su sitio de inserción en el genoma de la planta, o sus regiones flanqueantes, no se modificarán por lo general. Una "región de inserción", tal como se usa en esta memoria, hace referencia a la región correspondiente a la región de al menos 40 pb, preferiblemente al menos 100 pb, y hasta 10000 pb, abarcada por la secuencia que comprende la región flanqueante en dirección 5' y/o en dirección 3' de un ADN extraño en el genoma de la planta. Teniendo en cuenta diferencias menores debidas a mutaciones dentro de una especie, una región de inserción retendrá, después del cruzamiento en una planta de la misma especie, al menos 85%, preferiblemente 90%, más preferiblemente 95%, y muy preferiblemente 100% de identidad de secuencia con la secuencia que comprende las regiones flanqueantes en dirección 5' y en dirección 3' del ADN extraño en la planta obtenida originalmente de la transformación.

Un suceso se define como un locus genético (artificial) que, como resultado de manipulación genética, lleva un transgén que comprende al menos una copia de un gen de interés. Los estados alélicos típicos de un suceso son la presencia o ausencia del ADN extraño. Un suceso se caracteriza fenotípicamente por la expresión del transgén. Al nivel genético, un suceso es parte de la constitución genética de una planta. Al nivel molecular, un suceso puede caracterizarse por el mapa de restricción (v.g. como se determina por transferencia Southern), por las secuencias flanqueantes en dirección 5' y/o en dirección 3' del transgén, la localización de marcadores moleculares y/o la configuración molecular del transgén. Usualmente, la transformación de una planta con un ADN transformante que comprende al menos un gen de interés conduce a una multitud de sucesos, cada uno de los cuales es único.

Un suceso élite, tal como se usa en esta memoria, es un suceso que se selecciona de un grupo de sucesos, obtenidos por transformación con el mismo ADN transformante o por retrocruzamiento con plantas obtenidas por dicha transformación, basado en la expresión y estabilidad del o de los transgenes y su compatibilidad con características agronómicas óptimas de la planta que comprende el mismo. Así pues, los criterios para selección de un suceso élite son uno o más, preferiblemente dos o más, ventajosamente la totalidad de los siguientes:

- a) que la presencia del ADN extraño no ponga en compromiso otras características deseadas de la planta, tales como las que se refieren a la eficiencia agronómica o el valor comercial;
- b) que el suceso se caracterice por una configuración molecular bien definida que es heredada de manera estable y para la cual pueden desarrollarse herramientas apropiadas para el control de identidad;
- c) que el o los genes de interés exhiba(n) una expresión fenotípica correcta, apropiada y estable espacial y temporalmente, tanto en condición heterocigótica (o hemocigótica) como homocigótica del suceso, a un nivel comercialmente aceptable en un intervalo de condiciones ambientales en el que es probable que las plantas portadoras del suceso se vean expuestas durante el uso agronómico normal.

Se prefiere que el ADN extraño esté asociado con una posición en el genoma de la planta que permita la introgresión fácil en los trasfondos genéticos comerciales deseados.

El estado de un suceso como un suceso élite se confirma por introgresión del suceso élite en diferentes trasfondos genéticos relevantes y observando el cumplimiento con uno, dos o la totalidad de los criterios, v.g. a), b) y c) anteriores.

Un "suceso élite" se refiere así a un locus genético que comprende un ADN extraño, que responde a los criterios arriba descritos. Una planta, material vegetal o progenie, tal como semillas, puede comprender uno o más sucesos élite en su genoma.

Las herramientas desarrolladas para identificar un suceso élite o la planta, material vegetal que comprende un suceso élite, o productos que comprenden material vegetal que comprende el suceso élite, están basadas en las características genómicas específicas del suceso élite, tales como un mapa de restricción específico de la región genómica que comprende el ADN extraño, marcadores moleculares, o la secuencia de la o las regiones flanqueantes del ADN extraño.

Una vez que se han secuenciado una o ambas regiones flanqueantes del ADN extraño, pueden desarrollarse cebadores y sondas que reconocen específicamente esta (estas) secuencia(s) en el ácido nucleico (ADN o ARN) de una muestra por una técnica de biología molecular. Por ejemplo, puede desarrollarse un método de PCR para identificar el suceso élite en muestras biológicas (tales como muestras vegetales, material vegetal o productos que comprenden material vegetal). Una PCR de este tipo está basada en al menos dos "cebadores" específicos, uno de

5 los cuales reconoce una secuencia dentro de la región flanqueante de 5' o 3' del suceso élite, reconociendo el otro una secuencia dentro del ADN extraño. Los cebadores tienen preferiblemente una secuencia comprendida entre 15 y 35 nucleótidos que, en condiciones de PCR optimizadas, "reconocen específicamente" una secuencia dentro de la región flanqueante de 5' o 3' del suceso élite y el ADN extraño del suceso élite respectivamente, de tal modo que un fragmento específico ("fragmento de integración" o amplicón discriminante) se amplifica a partir de una muestra de ácido nucleico que comprende el suceso élite. Esto significa que únicamente el fragmento de integración direccionada, y ninguna otra secuencia en el genoma de la planta o ADN extraño, se amplifica en condiciones de PCR optimizadas.

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

- 10 - oligonucleótidos que oscilan en longitud desde 17 nt hasta alrededor de 300 nt, que comprenden una secuencia nucleotídica de al menos 17 nucleótidos consecutivos, preferiblemente 20 nucleótidos consecutivos, seleccionados de la secuencia flanqueante de 5' (SEC ID n° 1 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 311) en su extremo 3' (cebadores que reconocen secuencias flanqueantes de 5'); u
- 15 - oligonucleótidos que oscilan en longitud desde 17 nt hasta alrededor de 300 nt, que comprenden una secuencia nucleotídica de al menos 17 nucleótidos consecutivos, preferiblemente 20 nucleótidos consecutivos, seleccionados de la secuencia flanqueante de 3' (complemento de SEC ID n° 2 desde el nucleótido 510 hasta el nucleótido 1880) en su extremo 3' (cebadores que reconocen las secuencias flanqueantes de 3'); u
- 20 - oligonucleótidos que oscilan en longitud desde 17 nt hasta alrededor de 510 nt, que comprenden una secuencia nucleotídica de al menos 17 nucleótidos consecutivos, preferiblemente 20 nucleótidos, seleccionados de las secuencias de ADN insertadas (complemento de SEC ID n° 1 desde el nucleótido 312 hasta el nucleótido 810) en su extremo 3' (cebadores que reconocen ADN extraño); u
- 25 - oligonucleótidos que oscilan en longitud desde 17 nt hasta alrededor de 300 nt, que comprenden una secuencia nucleotídica de al menos 17 nucleótidos consecutivos, preferiblemente 20 nucleótidos, seleccionados de las secuencias de ADN insertadas (SEC ID n° 2 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 509).

30 Por supuesto, los cebadores pueden ser más largos que los 17 nucleótidos consecutivos mencionados, y pueden tener una longitud de, por ejemplo, 20, 21, 30, 35, 50, 75, 100, 150, 200 nt o incluso mayores. Los cebadores pueden consistir completamente en la secuencia nucleotídica seleccionada de las secuencias nucleotídicas mencionadas de secuencias flanqueantes y secuencias de ADN extraño. Sin embargo, la secuencia nucleotídica de los cebadores en su extremo 5' (es decir, fuera de los 17 nucleótidos consecutivos localizados en 3') es menos crítica. De este modo, la secuencia en 5' de los cebadores puede consistir en una secuencia nucleotídica seleccionada de las secuencias flanqueantes o ADN extraño, según sea apropiado, pero puede contener varios (por ejemplo 1, 2, 5, 10 desemparejamientos). La secuencia en 5' de los cebadores puede consistir incluso completamente en una secuencia nucleotídica no relacionada con las secuencias flanqueantes o el ADN extraño, tal como por ejemplo una secuencia nucleotídica que representa sitios de reconocimiento de enzimas de restricción. Tales secuencias no relacionadas o secuencias de ADN flanqueantes con desemparejamientos no deberían ser preferiblemente mayores que 100, más preferiblemente no mayores que 50 o incluso 25 nucleótidos.

40 Además, los cebadores adecuados pueden comprender o consistir en una secuencia nucleotídica en su extremo 3' que abarca la región de unión entre las secuencias derivadas del ADN vegetal y las secuencias de ADN extraño (localizadas en los nucleótidos 311-312 en SEC ID n° 1, y en los nucleótidos 509-510 en SEC ID n° 2), con tal de que los 17 nucleótidos consecutivos localizados en 3' mencionados no deriven exclusivamente del ADN extraño o de secuencias derivadas de la planta en SEC ID n° 1 ó 2.

De este modo, los cebadores de la PCR adecuados para la invención también pueden ser los siguientes:

- 45 - oligonucleótidos que oscilan en longitud desde 17 nt hasta alrededor de 300 nt, que comprenden una secuencia nucleotídica de al menos 17 nucleótidos consecutivos, preferiblemente 20 nucleótidos consecutivos, seleccionados de SEC ID n° 1 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 325) en su extremo 3'; u
- 50 - oligonucleótidos que oscilan en longitud desde 17 nt hasta alrededor de 300 nt, que comprenden una secuencia nucleotídica de al menos 17 nucleótidos consecutivos, preferiblemente 20 nucleótidos consecutivos, seleccionados del complemento de SEC ID n° 2 desde el nucleótido 495 al nucleótido 1880) en su extremo 3'; u
- 55 - oligonucleótidos que oscilan en longitud desde 17 nt hasta alrededor de 300 nt, que comprenden una secuencia nucleotídica de al menos 17 nucleótidos consecutivos, preferiblemente 20 nucleótidos, seleccionados del complemento de SEC ID n° 1 desde el nucleótido 295 al nucleótido 810) en su extremo 3';

u

- oligonucleótidos que oscilan en longitud desde 17 nt hasta alrededor de 300 nt, que comprenden una secuencia nucleotídica de al menos 17 nucleótidos consecutivos, preferiblemente 20 nucleótidos, seleccionados de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 1 al nucleótido 525).

5 También estará inmediatamente claro para el experto que los pares de cebadores de la PCR apropiadamente seleccionados no deberían tampoco comprender secuencias que son complementarias entre sí.

10 Para los fines de la invención, el "complemento de una secuencia nucleotídica representada en SEC ID nº X" es la secuencia nucleotídica que puede derivar de la secuencia nucleotídica representada sustituyendo los nucleótidos mediante su nucleótido complementario según las reglas de Chargaff ($A \leftrightarrow T$; $G \leftrightarrow C$) y leyendo la secuencia en la dirección 5' a 3', es decir, en dirección opuesta de la secuencia nucleotídica representada.

15 Los ejemplos de cebadores adecuados son las secuencias oligonucleotídicas de SEC ID nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 5 (cebadores que reconocen la secuencia flanqueante de 5') SEC ID nº 6, SEC ID nº 7, SEC ID nº 8, SEC ID nº 9, SEC ID nº 10 (cebadores que reconocen ADN extraño para uso con los cebadores que reconocen la secuencia flanqueante de 5') SEC ID nº 11, SEC ID nº 12, SEC ID nº 13, SEC ID nº 14 (cebadores que reconocen ADN extraño para uso con los cebadores que reconocen la secuencia flanqueante de 3') SEC ID nº 15, SEC ID nº 16 o SEC ID nº 17 (cebadores que reconocen la secuencia flanqueante de 3').

Otros ejemplos de cebadores oligonucleotídicos adecuados comprenden en su extremo 3' las siguientes secuencias o consisten en tales secuencias:

a. cebadores que reconocen la secuencia flanqueante de 5':

- 20
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 45 hasta el nucleótido 64
 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 22 hasta el nucleótido 41
 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 47 hasta el nucleótido 64
 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 183 hasta el nucleótido 202
 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 184 hasta el nucleótido 203

25

 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 301 hasta el nucleótido 320
 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 303 hasta el nucleótido 322
 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 306 hasta el nucleótido 325
 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 36 hasta el nucleótido 55
 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 182 hasta el nucleótido 202

30

 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 183 hasta el nucleótido 203
 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 184 hasta el nucleótido 202
 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 185 hasta el nucleótido 203
 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 185 hasta el nucleótido 204
 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 292 hasta el nucleótido 311

35

 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 295 hasta el nucleótido 314
 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 307 hasta el nucleótido 325
 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 8 hasta el nucleótido 27
 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 10 hasta el nucleótido 29
 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 11 hasta el nucleótido 30

40

 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 13 hasta el nucleótido 32

ES 2 369 032 T3

- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 20 hasta el nucleótido 41
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 35 hasta el nucleótido 54
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 37 hasta el nucleótido 55
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 66 hasta el nucleótido 85
- 5 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 67 hasta el nucleótido 86
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 68 hasta el nucleótido 87
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 181 hasta el nucleótido 202
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 182 hasta el nucleótido 203
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 184 hasta el nucleótido 204
- 10 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 185 hasta el nucleótido 202
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 186 hasta el nucleótido 204
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 186 hasta el nucleótido 203
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 248 hasta el nucleótido 267
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 249 hasta el nucleótido 268
- 15 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 290 hasta el nucleótido 309
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 291 hasta el nucleótido 311
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 293 hasta el nucleótido 311
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 294 hasta el nucleótido 314
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 301 hasta el nucleótido 322
- 20 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 303 hasta el nucleótido 320
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 305 hasta el nucleótido 322
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 308 hasta el nucleótido 325
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 11 hasta el nucleótido 29
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 36 hasta el nucleótido 54
- 25 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 41 hasta el nucleótido 61
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 43 hasta el nucleótido 64
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 66 hasta el nucleótido 86
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 67 hasta el nucleótido 85
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 67 hasta el nucleótido 87
- 30 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 68 hasta el nucleótido 86
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 69 hasta el nucleótido 87
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 180 hasta el nucleótido 197
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 183 hasta el nucleótido 204
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 187 hasta el nucleótido 204
- 35 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 200 hasta el nucleótido 219

ES 2 369 032 T3

- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 246 hasta el nucleótido 263
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 247 hasta el nucleótido 267
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 248 hasta el nucleótido 268
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 249 hasta el nucleótido 267
- 5 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 250 hasta el nucleótido 268
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 290 hasta el nucleótido 311
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 291 hasta el nucleótido 308
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 291 hasta el nucleótido 309
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 293 hasta el nucleótido 214
- 10 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 8 hasta el nucleótido 29
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 11 hasta el nucleótido 32
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 37 hasta el nucleótido 54
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 40 hasta el nucleótido 61
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 64 hasta el nucleótido 85
- 15 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 65 hasta el nucleótido 86
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 66 hasta el nucleótido 87
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 68 hasta el nucleótido 85
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 69 hasta el nucleótido 86
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 197 hasta el nucleótido 218
- 20 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 201 hasta el nucleótido 219
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 201 hasta el nucleótido 218
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 234 hasta el nucleótido 253
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 244 hasta el nucleótido 263
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 246 hasta el nucleótido 267
- 25 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 247 hasta el nucleótido 268
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 250 hasta el nucleótido 267
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 292 hasta el nucleótido 309
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 198 hasta el nucleótido 219
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 202 hasta el nucleótido 219
- 30 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 233 hasta el nucleótido 253
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 235 hasta el nucleótido 254
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 235 hasta el nucleótido 253
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 243 hasta el nucleótido 263
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 232 hasta el nucleótido 253
- 35 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 234 hasta el nucleótido 254

ES 2 369 032 T3

- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 242 hasta el nucleótido 263
 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 233 hasta el nucleótido 254
 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 234 hasta el nucleótido 255
 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 294 hasta el nucleótido 215
 - 5 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 247 hasta el nucleótido 266
 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 248 hasta el nucleótido 266
 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 249 hasta el nucleótido 266
- b. cebadores que reconocen la secuencia de ADN extraño para uso con cebadores que reconocen la secuencia flanqueante de 5':
- 10 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 781 hasta el nucleótido 800
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 301 hasta el nucleótido 320
 - 15 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 303 hasta el nucleótido 322
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 442 hasta el nucleótido 461
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 444 hasta el nucleótido 463
 - 20 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 778 hasta el nucleótido 797
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 781 hasta el nucleótido 799
 - 25 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 788 hasta el nucleótido 807
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 318 hasta el nucleótido 337
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 322 hasta el nucleótido 341
 - 30 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 325 hasta el nucleótido 344
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 329 hasta el nucleótido 348
 - 35 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 353 hasta el nucleótido 372
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 376 hasta el nucleótido 395
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 378 hasta el nucleótido 397
 - 40 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 384 hasta el nucleótido 403
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 440 hasta el nucleótido 459
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 442 hasta el nucleótido

ES 2 369 032 T3

- 460
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 444 hasta el nucleótido 462
- 5
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 442 hasta el nucleótido 462
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 444 hasta el nucleótido 464
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 449 hasta el nucleótido 468
- 10
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 470 hasta el nucleótido 489
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 484 hasta el nucleótido 503
- 15
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 492 hasta el nucleótido 511
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 781 hasta el nucleótido 798
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 778 hasta el nucleótido 798
- 20
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 781 hasta el nucleótido 802
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 788 hasta el nucleótido 806
- 25
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 301 hasta el nucleótido 318
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 303 hasta el nucleótido 320
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 301 hasta el nucleótido 322
- 30
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 318 hasta el nucleótido 336
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 318 hasta el nucleótido 338
- 35
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 320 hasta el nucleótido 339
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 322 hasta el nucleótido 340
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 322 hasta el nucleótido 342
- 40
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 325 hasta el nucleótido 343
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 329 hasta el nucleótido 347
- 45
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 346 hasta el nucleótido 365

ES 2 369 032 T3

- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 348 hasta el nucleótido 367
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 353 hasta el nucleótido 371
- 5 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 378 hasta el nucleótido 396
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 376 hasta el nucleótido 396
- 10 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 382 hasta el nucleótido 400
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 382 hasta el nucleótido 401
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 384 hasta el nucleótido 404
- 15 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 442 hasta el nucleótido 459
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 440 hasta el nucleótido 460
- 20 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 444 hasta el nucleótido 461
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 442 hasta el nucleótido 463
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 444 hasta el nucleótido 465
- 25 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 469 hasta el nucleótido 488
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 470 hasta el nucleótido 488
- 30 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 484 hasta el nucleótido 504
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 490 hasta el nucleótido 509
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 491 hasta el nucleótido 510
- 35 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 492 hasta el nucleótido 512
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 561 hasta el nucleótido 580
- 40 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 563 hasta el nucleótido 582
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 565 hasta el nucleótido 584
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 568 hasta el nucleótido 587
- 45 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 572 hasta el nucleótido

ES 2 369 032 T3

- 591
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 590 hasta el nucleótido 609
 - 5 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 640 hasta el nucleótido 659
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 695 hasta el nucleótido 713
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 782 hasta el nucleótido 799
 - 10 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 778 hasta el nucleótido 799
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 788 hasta el nucleótido 805
 - 15 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 788 hasta el nucleótido 808
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 318 hasta el nucleótido 335
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 315 hasta el nucleótido 336
 - 20 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 320 hasta el nucleótido 338
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 318 hasta el nucleótido 339
 - 25 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 322 hasta el nucleótido 339
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 320 hasta el nucleótido 340
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 325 hasta el nucleótido 342
 - 30 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 322 hasta el nucleótido 343
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 329 hasta el nucleótido 346
 - 35 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 325 hasta el nucleótido 346
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 329 hasta el nucleótido 349
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 346 hasta el nucleótido 364
 - 40 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 348 hasta el nucleótido 366
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 346 hasta el nucleótido 366
 - 45 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 348 hasta el nucleótido 368

ES 2 369 032 T3

- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 353 hasta el nucleótido 370
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 378 hasta el nucleótido 395
- 5 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 376 hasta el nucleótido 397
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 376 hasta el nucleótido 399
- 10 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 384 hasta el nucleótido 401
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 384 hasta el nucleótido 405
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 440 hasta el nucleótido 461
- 15 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 466 hasta el nucleótido 487
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 484 hasta el nucleótido 505
- 20 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 490 hasta el nucleótido 508
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 492 hasta el nucleótido 509
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 491 hasta el nucleótido 509
- 25 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 490 hasta el nucleótido 510
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 491 hasta el nucleótido 511
- 30 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 492 hasta el nucleótido 513
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 561 hasta el nucleótido 579
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 561 hasta el nucleótido 581
- 35 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 563 hasta el nucleótido 581
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 568 hasta el nucleótido 586
- 40 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 572 hasta el nucleótido 590
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 572 hasta el nucleótido 592
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 590 hasta el nucleótido 610
- 45 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 596 hasta el nucleótido

ES 2 369 032 T3

- 613
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 596 hasta el nucleótido 614
 - 5 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 640 hasta el nucleótido 657
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 640 hasta el nucleótido 658
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 640 hasta el nucleótido 660
 - 10 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 695 hasta el nucleótido 712
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 696 hasta el nucleótido 713
 - 15 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 320 hasta el nucleótido 337
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 320 hasta el nucleótido 341
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 329 hasta el nucleótido 350
 - 20 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 346 hasta el nucleótido 363
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 348 hasta el nucleótido 365
 - 25 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 346 hasta el nucleótido 367
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 348 hasta el nucleótido 369
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 354 hasta el nucleótido 371
 - 30 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 382 hasta el nucleótido 403
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 482 hasta el nucleótido 503
 - 35 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 491 hasta el nucleótido 518
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 490 hasta el nucleótido 511
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 491 hasta el nucleótido 512
 - 40 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 563 hasta el nucleótido 580
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 563 hasta el nucleótido 582
 - 45 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 565 hasta el nucleótido 582

ES 2 369 032 T3

- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 563 hasta el nucleótido 584
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 568 hasta el nucleótido 585
- 5 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 562 hasta el nucleótido 589
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 572 hasta el nucleótido 593
- 10 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 584 hasta el nucleótido 605
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 590 hasta el nucleótido 607
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 590 hasta el nucleótido 611
- 15 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 596 hasta el nucleótido 615
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 599 hasta el nucleótido 618
- 20 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 540 hasta el nucleótido 661
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 779 hasta el nucleótido 798
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 788 hasta el nucleótido 809
- 25 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 568 hasta el nucleótido 589
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 596 hasta el nucleótido 616
- 30 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 599 hasta el nucleótido 619
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 745 hasta el nucleótido 762
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 779 hasta el nucleótido 797
- 35 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 779 hasta el nucleótido 799
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 786 hasta el nucleótido 805
- 40 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 596 hasta el nucleótido 617
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 599 hasta el nucleótido 620
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 779 hasta el nucleótido 796
- 45 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 779 hasta el nucleótido

ES 2 369 032 T3

- 800
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 786 hasta el nucleótido 804
- 5
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 314 hasta el nucleótido 335
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 786 hasta el nucleótido 803
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 786 hasta el nucleótido 806
- 10
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 296 hasta el nucleótido 315
- c. cebadores que reconocen la secuencia de ADN extraño para uso con cebadores que reconocen la secuencia flanqueante de 3':
- 15
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 1413 hasta el nucleótido 1432
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 721 hasta el nucleótido 740
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 767 hasta el nucleótido 786
- 20
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 1185 hasta el nucleótido 1204
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 1332 hasta el nucleótido 1351
- 25
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 1413 hasta el nucleótido 1431
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 1413 hasta el nucleótido 1433
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 503 hasta el nucleótido 522
- 30
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 507 hasta el nucleótido 526
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 721 hasta el nucleótido 739
- 35
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 722 hasta el nucleótido 741
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 721 hasta el nucleótido 741
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 770 hasta el nucleótido 789
- 40
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 775 hasta el nucleótido 794
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 1135 hasta el nucleótido 1154
- 45
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 1185 hasta el nucleótido 1202

ES 2 369 032 T3

- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 1185 hasta el nucleótido 1205
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 1191 hasta el nucleótido 1210
- 5 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 1332 hasta el nucleótido 1350
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 1332 hasta el nucleótido 1352
- 10 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 1413 hasta el nucleótido 1430
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 506 hasta el nucleótido 525
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 507 hasta el nucleótido 525
- 15 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 507 hasta el nucleótido 527
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 721 hasta el nucleótido 738
- 20 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 722 hasta el nucleótido 740
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 721 hasta el nucleótido 742
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 775 hasta el nucleótido 793
- 25 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 775 hasta el nucleótido 795
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 1135 hasta el nucleótido 1153
- 30 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 1135 hasta el nucleótido 1155
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 1185 hasta el nucleótido 1206
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 1191 hasta el nucleótido 1209
- 35 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 1316 hasta el nucleótido 1335
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 1325 hasta el nucleótido 1344
- 40 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 1332 hasta el nucleótido 1353
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 1413 hasta el nucleótido 1434
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 507 hasta el nucleótido 528
- 45 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 722 hasta el nucleótido

ES 2 369 032 T3

- 739
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 725 hasta el nucleótido 742
 - 5 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 730 hasta el nucleótido 749
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 770 hasta el nucleótido 787
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 770 hasta el nucleótido 791
 - 10 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 771 hasta el nucleótido 792
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 775 hasta el nucleótido 792
 - 15 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 775 hasta el nucleótido 796
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 1153 hasta el nucleótido 1134
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 1135 hasta el nucleótido 1156
 - 20 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 1187 hasta el nucleótido 1206
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 1191 hasta el nucleótido 1208
 - 25 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 1191 hasta el nucleótido 1212
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 1325 hasta el nucleótido 1343
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 1325 hasta el nucleótido 1345
 - 30 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 1367 hasta el nucleótido 1384
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 1511 hasta el nucleótido 1528
 - 35 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 506 hasta el nucleótido 527
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 730 hasta el nucleótido 750
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 1187 hasta el nucleótido 1204
 - 40 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 1187 hasta el nucleótido 1205
 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 1249 hasta el nucleótido 1266
 - 45 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 1325 hasta el nucleótido 1342

ES 2 369 032 T3

- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 1325 hasta el nucleótido 1346
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 730 hasta el nucleótido 751
- 5 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 1187 hasta el nucleótido 1208
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 1334 hasta el nucleótido 1353
- 10 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 1334 hasta el nucleótido 1352
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 1334 hasta el nucleótido 1354
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 1334 hasta el nucleótido 1351
- 15 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 1334 hasta el nucleótido 1355
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 754 hasta el nucleótido 771
- 20 - el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 842 hasta el nucleótido 863
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 732 hasta el nucleótido 751
- el complemento de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 732 hasta el nucleótido 750
- 25 d. cebadores que reconocen la secuencia flanqueante de 3':
 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 284 hasta el nucleótido 303
 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 285 hasta el nucleótido 305
 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 289 hasta el nucleótido 308
 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 160 hasta el nucleótido 179
 - 30 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 162 hasta el nucleótido 181
 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 283 hasta el nucleótido 303
 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 284 hasta el nucleótido 304
 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 286 hasta el nucleótido 304
 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 287 hasta el nucleótido 306
 - 35 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 288 hasta el nucleótido 308
 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 290 hasta el nucleótido 308
 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 394 hasta el nucleótido 413
 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 398 hasta el nucleótido 417
 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 399 hasta el nucleótido 418
 - 40 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 400 hasta el nucleótido 418

ES 2 369 032 T3

- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 119 hasta el nucleótido 138
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 161 hasta el nucleótido 179
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 161 hasta el nucleótido 181
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 184 hasta el nucleótido 203
- 5 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 192 hasta el nucleótido 211
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 193 hasta el nucleótido 212
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 195 hasta el nucleótido 214
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 241 hasta el nucleótido 260
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 283 hasta el nucleótido 304
- 10 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 286 hasta el nucleótido 303
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 286 hasta el nucleótido 306
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 287 hasta el nucleótido 304
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 287 hasta el nucleótido 308
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 288 hasta el nucleótido 306
- 15 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 366 hasta el nucleótido 385
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 393 hasta el nucleótido 412
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 395 hasta el nucleótido 413
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 398 hasta el nucleótido 418
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 399 hasta el nucleótido 417
- 20 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 400 hasta el nucleótido 417
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 401 hasta el nucleótido 418
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 430 hasta el nucleótido 449
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 81 hasta el nucleótido 100
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 90 hasta el nucleótido 109
- 25 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 159 hasta el nucleótido 179
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 160 hasta el nucleótido 181
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 185 hasta el nucleótido 203
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 191 hasta el nucleótido 211
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 192 hasta el nucleótido 212
- 30 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 193 hasta el nucleótido 211
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 194 hasta el nucleótido 212
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 194 hasta el nucleótido 214
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 196 hasta el nucleótido 215
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 196 hasta el nucleótido 214
- 35 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 219 hasta el nucleótido 238

ES 2 369 032 T3

- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 240 hasta el nucleótido 260
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 242 hasta el nucleótido 261
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 242 hasta el nucleótido 260
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 275 hasta el nucleótido 294
- 5 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 285 hasta el nucleótido 306
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 289 hasta el nucleótido 306
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 315 hasta el nucleótido 334
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 319 hasta el nucleótido 338
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 366 hasta el nucleótido 383
- 10 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 372 hasta el nucleótido 391
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 392 hasta el nucleótido 412
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 392 hasta el nucleótido 413
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 394 hasta el nucleótido 412
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 397 hasta el nucleótido 417
- 15 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 397 hasta el nucleótido 418
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 424 hasta el nucleótido 443
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 429 hasta el nucleótido 449
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 431 hasta el nucleótido 450
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 431 hasta el nucleótido 449
- 20 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 439 hasta el nucleótido 458
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 447 hasta el nucleótido 466
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 481 hasta el nucleótido 500
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 507 hasta el nucleótido 526
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 79 hasta el nucleótido 96
- 25 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 80 hasta el nucleótido 100
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 82 hasta el nucleótido 100
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 89 hasta el nucleótido 109
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 91 hasta el nucleótido 109
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 121 hasta el nucleótido 138
- 30 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 184 hasta el nucleótido 202
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 186 hasta el nucleótido 203
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 190 hasta el nucleótido 211
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 191 hasta el nucleótido 212
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 193 hasta el nucleótido 214
- 35 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 194 hasta el nucleótido 211

ES 2 369 032 T3

- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 195 hasta el nucleótido 215
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 195 hasta el nucleótido 212
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 218 hasta el nucleótido 238
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 220 hasta el nucleótido 238
- 5 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 221 hasta el nucleótido 238
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 239 hasta el nucleótido 260
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 241 hasta el nucleótido 261
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 277 hasta el nucleótido 294
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 282 hasta el nucleótido 303
- 10 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 314 hasta el nucleótido 334
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 316 hasta el nucleótido 334
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 318 hasta el nucleótido 338
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 320 hasta el nucleótido 338
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 371 hasta el nucleótido 391
- 15 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 391 hasta el nucleótido 412
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 395 hasta el nucleótido 412
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 396 hasta el nucleótido 417
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 423 hasta el nucleótido 443
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 430 hasta el nucleótido 450
- 20 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 432 hasta el nucleótido 449
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 438 hasta el nucleótido 458
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 446 hasta el nucleótido 466
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 448 hasta el nucleótido 466
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 449 hasta el nucleótido 466
- 25 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 481 hasta el nucleótido 498
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 481 hasta el nucleótido 499
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 482 hasta el nucleótido 500
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 508 hasta el nucleótido 526
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 79 hasta el nucleótido 100
- 30 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 83 hasta el nucleótido 100
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 88 hasta el nucleótido 109
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 92 hasta el nucleótido 109
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 185 hasta el nucleótido 202
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 194 hasta el nucleótido 215
- 35 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 217 hasta el nucleótido 238

ES 2 369 032 T3

- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 240 hasta el nucleótido 261
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 241 hasta el nucleótido 262
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 313 hasta el nucleótido 334
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 317 hasta el nucleótido 338
- 5 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 321 hasta el nucleótido 338
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 370 hasta el nucleótido 391
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 422 hasta el nucleótido 443
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 428 hasta el nucleótido 449
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 429 hasta el nucleótido 450
- 10 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 437 hasta el nucleótido 458
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 441 hasta el nucleótido 458
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 445 hasta el nucleótido 466
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 482 hasta el nucleótido 499
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 504 hasta el nucleótido 523
- 15 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 266 hasta el nucleótido 287
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 446 hasta el nucleótido 465
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 156 hasta el nucleótido 175
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 448 hasta el nucleótido 465
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 155 hasta el nucleótido 175
- 20 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 157 hasta el nucleótido 175
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 154 hasta el nucleótido 175
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 312 hasta el nucleótido 329
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 191 hasta el nucleótido 210
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 190 hasta el nucleótido 210
- 25 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 192 hasta el nucleótido 210
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 157 hasta el nucleótido 176
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 189 hasta el nucleótido 210
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 193 hasta el nucleótido 210
- la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 156 hasta el nucleótido 176
- 30 - la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 155 hasta el nucleótido 176

Como se usa aquí, "la secuencia nucleotídica de SEC ID nº Z desde la posición X hasta la posición Y" indica la secuencia nucleotídica incluyendo ambos puntos extremos nucleotídicos.

Preferiblemente, el fragmento de integración tiene una longitud entre 50 y 500 nucleótidos, lo más preferible entre 100 y 350 nucleótidos. Los cebadores específicos pueden tener una secuencia que es entre 80 y 100% idéntica a una secuencia en la región flanqueante de 5' o 3' del suceso elite y el ADN extraño del suceso elite, respectivamente, con la condición de que los desemparejamientos todavía permitan la identificación específica del suceso elite con estos cebadores en condiciones de la PCR optimizadas. Sin embargo, el intervalo de desemparejamientos permisibles se puede determinar fácilmente de forma experimental, y son conocidos por una

ES 2 369 032 T3

persona experta en la técnica.

La siguiente tabla ejemplifica los tamaños de amplicones de ADN esperados (o fragmentos de integración) con pares seleccionados de cebadores de la PCR.

Cebador 1	Desde la posición	Cebador 2	Hasta la posición	Longitud del amplicón
HCA150	8	KVM173	365	
HCA150	8	YTP228	402	
HCA150	8	YTP220	594	
HCA150	8	DPA024	736	
HCA150	8	YTP245	796	
DPA013	66	KVM173	365	
DPA013	66	YTP228	402	
DPA013	66	YTP220	594	
DPA013	66	DPA024	736	
DPA013	66	YTP245	796	
DPA228	292	KVM173	365	
DPA228	292	YTP228	402	110
DPA228	292	YTP220	594	302
DPA228	292	DPA024	736	444
DPA228	292	YTP245	796	504
YTP170	82	MDB687	527	445
YTP170	82	SMO022	724	642
YTP170	82	SMO024	1215	1133
YTP227	237	MDB687	527	290
YTP227	237	SMO022	724	487
YTP227	237	SMO024	1215	978
MDB688	377	MDB687	527	150
MDB688	377	SMO022	724	347
MDB688	377	SMO024	1215	838
KVM175	476	MDB687	527	51
KVM175	476	SMO022	724	248
KVM175	476	SMO024	1215	739

- 5 La detección de los fragmentos de integración se puede producir de diversas maneras, por ejemplo vía estimación del tamaño tras el análisis en gel. Los fragmentos de integración también se pueden secuenciar directamente. Otros métodos específicos de secuencias para la detección de fragmentos de ADN amplificados son también conocidos en la técnica.

Dado que la secuencia de los cebadores y su localización relativa en el genoma son únicos para el suceso élite, la amplificación del fragmento de integración ocurrirá solamente en muestras biológicas que comprendan (el ácido nucleico de) el suceso élite. Preferiblemente, cuando se realiza una PCR para identificar la presencia de A5547-127 en muestras desconocidas, se incluye un control de un conjunto de cebadores con los cuales puede amplificarse un fragmento comprendido dentro de un "gen constitutivo de mantenimiento" de la especie vegetal del suceso. Los genes constitutivos de mantenimiento son genes que se expresan en la mayoría de los tipos de células y que están implicados con las actividades metabólicas básicas comunes a todas las células. Preferiblemente, el fragmento amplificado a partir del gen constitutivo de mantenimiento es un fragmento que es mayor que el fragmento de integración amplificado. Dependiendo de las muestras a analizar, pueden incluirse otros controles.

Los protocolos de PCR estándar se describen en la técnica, por ejemplo en "PCR Applications Manual" (Roche Molecular Biochemicals, 2ª edición, 1999). Las condiciones óptimas para la PCR, incluyendo la secuencia de los cebadores específicos, se especifican en un "Protocolo de identificación mediante PCR" para cada suceso élite. Sin embargo, debe entenderse que puede ser necesario ajustar cierto número de parámetros en el protocolo de identificación mediante PCR a las condiciones específicas del laboratorio, y pueden modificarse ligeramente para obtener resultados similares. Por ejemplo, el uso de un método diferente para la preparación de ADN puede requerir el ajuste de, por ejemplo, la cantidad de cebadores, la polimerasa y las condiciones de hibridación utilizadas. Análogamente, la selección de otros cebadores puede dictar otras condiciones óptimas para el protocolo de identificación mediante PCR. Estos ajustes serán sin embargo evidentes para una persona experta en la técnica, y se detallan adicionalmente en los manuales actuales de la aplicación de la PCR tales como el citado anteriormente.

De modo alternativo, se pueden usar cebadores específicos para amplificar un fragmento de integración que puede ser usado como una "sonda específica" para identificar A5547-127 en muestras biológicas. La puesta en contacto de un ácido nucleico de una muestra biológica con la sonda, en condiciones que permiten la hibridación de la sonda con su fragmento correspondiente en el ácido nucleico, da como resultado la formación de un híbrido ácido nucleico/sonda. La formación de este híbrido puede detectarse (v.g. por marcación del ácido nucleico o la sonda), con lo cual la formación de este híbrido indica la presencia de A5547-127. Tales métodos de identificación basados en hibridación con una sonda específica (sea sobre un soporte en fase sólida o en solución) han sido descritos en la técnica. La sonda específica es preferiblemente una secuencia que, en condiciones optimizadas, se hibrida específicamente a una región dentro de la región flanqueante de 5' o 3' del suceso élite y que comprende también preferiblemente parte del ADN extraño contiguo a la misma (en lo sucesivo referida como "región específica"). Preferiblemente, la sonda específica comprende una secuencia de una longitud comprendida entre 50 y 500 pb, preferiblemente de 100 a 350 pb, que es al menos 80%, preferiblemente entre 80 y 85%, más preferiblemente entre 85 y 90%, de modo especialmente preferible entre 90 y 95%, y muy preferiblemente entre 95 y 100% idéntica (o complementaria) a la secuencia nucleotídica de una región específica. Preferiblemente, la sonda específica comprenderá una secuencia de alrededor de 15 a alrededor de 100 nucleótidos contiguos idénticos (o complementarios) a una región específica del suceso élite.

Un "kit", tal como se usa en esta memoria, hace referencia a un conjunto de reactivos con el fin de llevar a cabo el método de la invención, más particularmente, la identificación del suceso élite A5547-127 en muestras biológicas. Más particularmente, una realización preferida del kit de la invención comprende al menos uno o dos cebadores específicos, como se han descrito anteriormente. Opcionalmente, el kit puede comprender además cualquier otro reactivo descrito en esta memoria en el protocolo de identificación mediante PCR. Alternativamente, de acuerdo con otra realización de esta invención, el kit puede comprender una sonda específica, como se ha descrito anteriormente, que se hibrida específicamente con el ácido nucleico de las muestras biológicas para identificar la presencia de A5547-127 en ellas. Opcionalmente, el kit puede comprender además cualquier otro reactivo (tal como, pero sin carácter limitante, tampón de hibridación, marcador) para la identificación de A5547-127 en muestras biológicas, usando la sonda específica.

El kit de la invención puede usarse, y sus componentes pueden ajustarse específicamente, para los fines de control de calidad (v.g., pureza de lotes de semillas), detección del suceso élite en material vegetal o material que comprende o deriva de material vegetal, tal como, pero sin carácter limitante, productos alimentarios o piensos.

Tal como se usa en esta memoria, "identidad de secuencia", con relación a secuencias nucleotídicas (ADN o ARN), hace referencia al número de posiciones con nucleótidos idénticos dividido entre el número de nucleótidos en la más corta de las dos secuencias. La alineación de las dos secuencias nucleotídicas se realiza mediante el algoritmo de Wilbur y Lipmann (Wilbur y Lipmann, 1983, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 80: 726) usando un tamaño de ventana de 20 nucleótidos, una longitud de palabra de 4 nucleótidos, y una penalización por salto de 4. El análisis asistido por ordenador y la interpretación de los datos de secuencia, incluyendo la alineación de las secuencias como se ha descrito anteriormente, pueden, v.g., realizarse convenientemente usando los programas del Intelligenetics™ Suite (Intelligenetics Inc., CA) o el paquete de software de análisis de secuencias del Genetics Computer Group (GCG, Centro de Biotecnología de la Universidad de Wisconsin). Las secuencias se indican como "esencialmente similares" cuando dichas secuencias tienen una identidad de secuencia de al menos alrededor de 75%, de modo particular al menos alrededor de 80%, de modo más particular al menos alrededor de 85%, de modo muy particular alrededor de 90%, en especial alrededor de 95%, y de modo más especial alrededor de 100%. Está claro que cuando se dice que

las secuencias de ARN son esencialmente similares o tienen cierto grado de identidad de secuencia con secuencias de ADN, la timidina (T) en la secuencia de ADN se considera igual a uracilo (U) en la secuencia de ARN.

5 El término “cebador”, tal como se usa en esta memoria, abarca cualquier ácido nucleico que es capaz de cebar la síntesis de un ácido nucleico naciente en un proceso dependiente de un molde, tal como PCR. Típicamente, los cebadores son oligonucleótidos de 10 a 30 nucleótidos, pero pueden emplearse secuencias más largas. Los cebadores pueden proporcionarse en forma bicatenaria, aunque se prefiere la forma monocatenaria. Las sondas se pueden usar como cebadores, pero están diseñadas para unirse al ADN o ARN diana y no precisan ser usadas en un proceso de amplificación.

10 El término “reconocimiento”, tal como se usa en esta memoria cuando se hace referencia a cebadores específicos, se refiere al hecho de que los cebadores específicos se hibridan específicamente a una secuencia de ácido nucleico en el suceso élite en las condiciones expuestas en el método (tales como las condiciones del protocolo de identificación mediante PCR), con lo que la especificidad está determinada por la presencia de controles positivos y negativos.

15 El término “hibridación”, como se usa en esta memoria cuando se hace referencia a sondas específicas, se refiere al hecho de que la sonda se une a una región específica en la secuencia de ácido nucleico del suceso élite en condiciones de restricción estándar. Condiciones de restricción estándar, tal como se usan en esta memoria, hace referencia a las condiciones para hibridación descritas aquí, o a las condiciones de hibridación convencionales como se han descrito por Sambrook et al., 1989 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY) que, por ejemplo, pueden comprender las etapas siguientes: 1) inmovilizar fragmentos de ADN genómico vegetal en un filtro, 2) prehibridar el filtro durante 1 a 2 horas a 42°C en formamida al 50%, 5X SSPE, 2X reactivo de Denhardt y 0,1% de SDS, o durante 1 a 2 horas a 68°C en 6X SSC, 2X reactivo Denhardt y 0,1% de SDS, 3) añadir la sonda de hibridación que ha sido marcada, 4) incubar durante 16 a 24 horas, 5) lavar el filtro durante 20 min a temperatura ambiente en 1X SSC, 0,1% de SDS, 6) lavar el filtro tres veces durante 20 min, cada una a 68°C en 0,2X SSC, 0,1% de SDS, y 7) exponer el filtro durante 24 a 48 horas a película de rayos X a -70°C con un filtro intensificador.

25 Como se usa en esta memoria, una muestra biológica es una muestra de una planta, material vegetal o productos que comprenden material vegetal. El término “planta” tiene por objeto abarcar tejidos de la planta de haba de soja (*Glycine max*), en cualquier etapa de su madurez, así como cualesquiera células, tejidos u órganos tomados de o derivados de cualquier planta de este tipo, incluyendo sin limitación cualesquiera semillas, hojas, tallos, flores, raíces, células individuales, gametos, cultivos de células, cultivos de tejidos o protoplastos. “Material vegetal”, como se usa en esta memoria, hace referencia a material que se obtiene o se deriva de una planta. Productos que comprenden material vegetal se refieren a alimentos, piensos u otros productos que se producen usando material vegetal o pueden estar contaminados con material vegetal. Se entenderá que, en el contexto de la presente invención, tales muestras biológicas se ensayan para determinar la presencia de ácidos nucleicos específicos para A5547-127, lo que implica la presencia de ácidos nucleicos en las muestras. Así, los métodos a que se hace referencia en esta memoria para identificar el suceso élite A5547-127 en muestras biológicas se refieren a la identificación en muestras biológicas de ácidos nucleicos que comprenden el suceso élite.

35 Tal como se usa en esta memoria, “que comprende” debe interpretarse como especificación de la presencia de las características, entidades completas, etapas, reactivos o componentes indicados a los que se ha hecho referencia, pero no excluye la presencia o adición de una o más características, entidades completas, etapas o componentes, o grupos de los mismos. Así, v.g., un ácido nucleico o proteína que comprende una secuencia de nucleótidos o aminoácidos puede comprender más nucleótidos o aminoácidos que los citados actualmente, es decir, estar incluido(a) en un ácido nucleico o proteína mayor. Un gen quimérico que comprende una secuencia de ADN que está definida funcional o estructuralmente puede comprender secuencias de ADN adicionales, etc.

40 La presente invención también se refiere al desarrollo de un suceso élite A5547-127 en haba de soja para las plantas que comprenden este suceso, la progenie obtenida de estas plantas y a las células vegetales, o material vegetal derivado de este suceso. Las plantas que comprenden el suceso élite A5547-127 se obtuvieron como se describe en el ejemplo 1.

45 Las plantas de haba de soja o material vegetal que comprende A5547-127 se pueden identificar según el protocolo de identificación mediante PCR descrito para A5547-127 en el Ejemplo 2. De forma breve, ADN genómico de haba de soja presente en la muestra biológica se amplifica mediante PCR usando un cebador que reconoce específicamente una secuencia en la secuencia flanqueante de 5' o 3' de A5547-127, tal como el cebador con la secuencia de SEC ID n°:15, y un cebador que reconoce una secuencia en el ADN extraño, tal como el cebador con la secuencia de SEC ID n°: 13. Los cebadores de ADN que amplifican parte de una secuencia endógena de haba de soja se usan como control positivo para la amplificación mediante PCR. Si con la amplificación mediante PCR el material produce un fragmento del tamaño esperado, el material contiene material vegetal procedente de una planta de haba de soja que posee el suceso élite A5547-127.

Las plantas que poseen A5547-127 se caracterizan por su tolerancia a glufosinato, que en el contexto de la presente invención incluyen aquellas plantas que son tolerantes al herbicida Liberty™. La tolerancia a Liberty™ se puede ensayar de diferentes maneras. El método de la pintura de la hoja, como se describe aquí, es el más útil cuando se requiere la discriminación entre plantas resistentes y sensibles, sin exterminar a las sensibles. Como alternativa, la tolerancia se puede ensayar mediante aplicación por pulverización de Liberty™. Para mejores resultados, los tratamientos de pulverización se deberían hacer entre las etapas V3 y V4 de la hoja. Las plantas tolerantes se caracterizan por el hecho de que la pulverización de las plantas con al menos 200 gramos de ingrediente activo/hectárea (g.i.a./ha) preferiblemente 400 g.i.a./ha, y posiblemente hasta 1600 g.i.a./ha (4X la tasa de campo normal), no extermina las plantas. Se debería aplicar una aplicación difundida a una tasa de 28-34 oz de Liberty™. Es mejor aplicar un volumen de 20 galones de agua por acre usando una boquilla de tipo ventilador plano mientras se tiene cuidado de no dirigir directamente aplicaciones de pulverización al verticilo de las plantas para evitar la quemadura del tensioactivo en las hojas. El efecto herbicida debería aparecer en 48 horas, y ser claramente visible en 5-7 días.

Las plantas que poseen A5547-127 se pueden caracterizar además por la presencia en sus células de fosfinotricina acetil transferasa, como se determina mediante un ensayo de PAT (De Block et al, 1987).

Las plantas que poseen A5547-127 también se caracterizan por tener características agronómicas que son comparables a variedades de haba de soja comercialmente disponibles en los Estados Unidos de América, en ausencia de presión de malas hierbas y uso de Liberty™ para el control de malas hierbas. Se ha observado que la presencia de un ADN extraño en la región de inserción del genoma de la planta de haba de soja descrito aquí confiere características fenotípicas y moleculares particularmente interesantes a las plantas que comprenden este suceso. Más específicamente, la presencia del ADN extraño en esta región particular en el genoma de estas plantas da como resultado plantas que presentan una expresión fenotípica estable del gen de interés sin comprometer significativamente ningún aspecto del comportamiento agronómico deseado de las plantas.

Los ejemplos siguientes describen la identificación del desarrollo de herramientas para la identificación del suceso élite A5547-127 en muestras biológicas.

A no ser que se señale de otro modo, todas las técnicas de ADN recombinante se llevan a cabo de acuerdo con protocolos estándar como se describen en Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY, y en los volúmenes 1 y 2 de Ausubel et al. (1994) Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols, USA. Materiales y métodos estándar para el trabajo molecular con plantas se describen en Plant Molecular Biology Labfax (1993) por R.D.D. Croy, publicado por BIOS Scientific Publications Ltd. (Reino Unido) y Blackwell Scientific Publications, Reino Unido.

En la descripción y los ejemplos, se hace referencia a las secuencias siguientes:

- SEC ID nº 1: secuencia nucleotídica que comprende una región flanqueante de 5' de A5547-127
- SEC ID nº 2: secuencia nucleotídica que comprende una región flanqueante de 3' de A5547-127
- SEC ID nº 3: cebador HCA150
- SEC ID nº 4: cebador DPA013
- SEC ID nº 5: cebador DPA228
- SEC ID nº 6: cebador KVM173
- SEC ID nº 7: cebador YTP228
- SEC ID nº 8: cebador YTP220
- SEC ID nº 9: cebador DPA024
- SEC ID nº 10: cebador YTP245
- SEC ID nº 11: cebador YTP170
- SEC ID nº 12: cebador YTP227
- SEC ID nº 13: cebador MDB688
- SEC ID nº 14: cebador KVM175
- SEC ID nº 15: cebador MDB687

SEC ID nº 16:	cebador SMO022
SEC ID nº 17:	cebador SMO024
SEC ID nº 18:	cebador 1 para la amplificación del fragmento de control
SEC ID nº 19:	cebador 2 para la amplificación del fragmento de control

5 Breve descripción de los dibujos

Los Ejemplos siguientes, que no tienen por objeto limitar la invención a las realizaciones específicas descritas, pueden comprenderse en asociación con la Figura adjunta, que se incorpora en esta memoria como referencia, en la cual:

10 Fig. 1: Representación esquemática de la relación entre las secuencias nucleotídicas citadas y los cebadores. Barra negra: ADN extraño; barra clara: ADN de origen vegetal; las cifras bajo las barras representan posiciones nucleotídicas; (c) se refiere al complemento de la secuencia nucleotídica indicada.

15 Fig. 2: Protocolo de identificación mediante PCR desarrollado para A5547-127. Secuencia de carga del gel: Línea 1: muestra de ADN procedente de plantas de haba de soja que comprenden el suceso transgénico A5547-127; línea 2: muestra de ADN procedente de una planta de haba de soja transgénica que no comprende el suceso élite A5547-127; línea 3: muestras de ADN de control procedentes de plantas de haba de soja de tipo salvaje; línea 4: sin control de molde; línea 5: marcador de peso molecular.

Ejemplos

1. Identificación de las regiones flanqueantes del suceso élite A5547-127

20 Se desarrolló haba de soja resistente a los herbicidas por transformación de haba de soja con un vector que comprende la secuencia codificante de un gen *pat* que codifica la enzima fosfinotricin-acetil-transferasa, bajo el control del promotor constitutivo 35S del virus del Mosaico de la Coliflor.

El suceso élite A5547-127 se seleccionó basándose en un procedimiento extenso de selección basado en la expresión y estabilidad satisfactorias del gen de resistencia a los herbicidas y su compatibilidad con características agronómicas óptimas.

25 La secuencia de las regiones que flanquean el ADN extraño en el suceso A5547-127 se determinó usando el método térmico asimétrico entrelazado (TAIL-)PCR descrito por Liu et al. (1995), Plant J. 8(3): 457-463). Este método usa tres cebadores anidados en reacciones sucesivas junto con un cebador degenerado arbitrario más corto de tal modo que las eficiencias de la amplificación de los productos específicos e inespecíficos pueden controlarse térmicamente. Los cebadores específicos se seleccionaron para hibridarlos al límite del ADN extraño y basándose en sus condiciones de hibridación. Una pequeña cantidad (5 µl) de productos de la PCR impurificados, secundarios y terciarios, se analizaron en un gel de agarosa al 1%. El producto de la PCR terciario se usó para la amplificación preparativa, se purificó y se secuenció en un secuenciador automático usando el kit de ciclo DyeDeoxy Terminator.

1.1. Región flanqueante derecha (5')

35 El fragmento identificado por comprender la región flanqueante de 5' obtenido por el método de TAIL-PCR se secuenció completamente (SEC ID nº 1). La secuencia entre el nucleótido 1 y 311 corresponde a ADN vegetal, mientras que la secuencia entre el nucleótido 312 y 810 corresponde a ADN extraño.

1.2. Región flanqueante izquierda (3')

40 El fragmento identificado por comprender la región flanqueante de 3' obtenido por el método de TAIL-PCR se secuenció completamente (SEC ID nº 2). La secuencia entre el nucleótido 1 y 509 corresponde a ADN extraño, mientras que la secuencia entre el nucleótido 510 y 1880 corresponde a ADN vegetal.

2. Desarrollo de un protocolo de identificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa

2.1. Cebadores

45 Se desarrollaron cebadores específicos que reconocen secuencias dentro del suceso élite. Más particularmente, se desarrolló un cebador que reconoce una secuencia dentro de la región flanqueante de 5' de A5547-127. Se seleccionó luego un segundo cebador dentro de la secuencia del ADN extraño, de tal modo que los cebadores abarcan una secuencia de alrededor de 150 pb. Se encontró que los siguientes cebadores proporcionan resultados particularmente claros y reproducibles en una reacción de PCR sobre ADN de A5547-127:

MDB687: 5'- TgT.ggT.TAT.ggC.ggT.gCC.ATC -3' (SEC ID nº: 15)
(diana: ADN vegetal)

MDB688: 5'-TgC.TAC.Agg.CAT.CgT.ggT.gTC-3' (SEC ID nº: 13)
(diana: ADN de inserto)

5 En el cóctel de PCR se incluyen preferiblemente cebadores dirigidos a una secuencia endógena. Estos cebadores sirven como control interno en muestras desconocidas y en el control positivo de ADN. Un resultado positivo con el par de cebadores endógenos demuestra que existe abundante ADN de calidad adecuada en la preparación de ADN genómico para generar un producto de la PCR. Se seleccionaron los cebadores endógenos para reconocer un gen constitutivo de mantenimiento en *Glycine max*:

10 SOY01: 5'-gTC.AgC.CAC.ACA.gTg.CCT.AT-3' (SEC ID nº: 20)
(localizado en el gen de actina 1 de *Glycine max* (Acceso J01298))

SOY02: 5'-gTT.ACC.gTA.CAg.gTC.TTT.CC-3' (SEC ID nº: 21)
(localizado en el gen de actina 1 de *Glycine max* (Acceso J01298))

2.2. Fragmentos amplificados

15 Los fragmentos amplificados esperados en la reacción de PCR son:

para el par de cebadores SOY01-SOY02: 413 pb (control endógeno)

para el par de cebadores MDB688-MDB687: 151 pb (suceso élite A5547-127)

2.3. ADN molde

20 Se preparó ADN molde a partir de un bocado de hojas de acuerdo con Edwards et al. (Nucleic Acid Research, 19, p 1349, 1991). Cuando se usa ADN preparado con otros métodos, debe realizarse una prueba de ensayo usando cantidades diferentes de molde. Usualmente 50 ng del ADN genómico de molde proporciona los mejores resultados.

2.4. Controles positivo y negativo asignados

Para evitar resultados positivos o negativo falsos, se determinó que deberían incluirse los controles positivo y negativo siguientes en un experimento de PCR:

- 25 – Control de Mezcla Maestra (control negativo de ADN). Este es una PCR en la cual no se añade cantidad alguna de ADN a la reacción. Cuando se observa el resultado esperado, sin productos de PCR, esto indica que el cóctel de PCR no estaba contaminado con ADN diana.
- Un control positivo de ADN (muestra de ADN genómico que se sabe contiene las secuencias transgénicas). La amplificación con éxito de este control positivo demuestra que la PCR se realizó en condiciones que permiten la amplificación de las secuencias diana.
- 30 – Un control de ADN de tipo salvaje. Este es una PCR en la cual el ADN molde proporcionado es ADN genómico preparado a partir de una planta no transgénica. Cuando se observa el resultado esperado, a saber, ausencia de amplificación de un producto de PCR transgénico pero amplificación del producto de PCR endógeno, esto indica que no existe amplificación de fondo del transgén detectable en una muestra de
- 35 ADN genómico.

2.5. Condiciones de PCR

Se obtuvieron resultados óptimos en las condiciones siguientes:

- la mezcla de PCR para reacciones de 25 µl contiene:
 - 2,5 µl de ADN molde
 - 40 2,5 µl de Tampón de Amplificación 10x (suministrado con Taq polimerasa)
 - 0,5 µl de dNTP's 10 mM
 - 0,5 µl de MDB688 (10 pmoles/µl)

0,5 µl de MDB687 (10 pmoles/µl)
 0,25 µl de SOY01 (10 pmoles/µl)
 0,25 µl de SOY02 (10 pmoles/µl)
 0,1 µl de Taq ADN polimerasa (5 unidades/µl)

5 agua hasta 25 µl;

– el perfil de termociclación a seguir para resultados óptimos es el siguiente:

4 min a 95°C

Seguido de: 1 min a 95°C

1 min a 57°C

10 2 min a 72°C

durante 5 ciclos

Seguido de: 30 s a 92°C

30 s a 57°C

1 min a 72°C

15 durante 25 ciclos

Seguido de: 5 minutos a 72°C

2.6. Análisis en gel de agarosa

20 Para visualizar óptimamente los resultados de la PCR, se determinó que entre 10 y 20 µl de las muestras de PCR deberían aplicarse sobre un gel de agarosa al 1,5% (tampón Tris–borato) con un marcador de peso molecular apropiado (v.g. ladder de 100 pb de PHARMACIA).

2.7. Validación de los resultados

25 Se determinó que los datos procedentes de muestras de ADN de plantas transgénicas dentro de un experimento PCR individual y un cóctel de PCR individual no deberían ser aceptables a no ser que 1) el control positivo de ADN muestre los productos de la PCR esperados (fragmentos transgénicos y endógenos), 2) el control negativo de ADN es negativo para la amplificación de PCR (ausencia de fragmentos), y 3) el control de ADN de tipo salvaje muestra el resultado esperado (amplificación de fragmentos endógenos).

30 Cuando se sigue el Protocolo de Identificación mediante PCR para A5547-127 como se describe anteriormente, las líneas, que muestran cantidades visibles de los productos de PCR transgénicos y endógenos de los tamaños esperados, indican que la planta correspondiente, a partir de la cual se preparó el ADN genómico de molde, ha heredado el suceso élite A5547-127. Las líneas que no muestran cantidades visibles de ninguno de los productos de PCR transgénicos, y que muestran cantidades visibles del producto de PCR endógeno, indican que la planta correspondiente, a partir de la cual se preparó el ADN genómico de molde, no comprende el suceso élite. Las líneas que no muestran cantidades visibles de los productos de PCR endógenos y transgénicos, indican que la calidad y/o cantidad del ADN genómico no permitió la generación de un producto de PCR. Estas plantas no pueden puntuarse.
 35 La preparación del ADN genómico debería repetirse y tiene que realizarse un nuevo experimento de la PCR, con los controles apropiados.

2.8. Uso del protocolo discriminante de PCR para identificar A5547-127

40 Antes de intentar escrutar materiales desconocidos, tiene que realizarse una operación de prueba, con todos los controles apropiados. El protocolo desarrollado podría requerir la optimización para componentes que puedan diferir entre distintos laboratorios (preparación del ADN molde, Taq ADN–polimerasa, calidad de los cebadores, dNTP's, termociclador, etc.).

45 La amplificación de la secuencia endógena juega un papel fundamental en el protocolo. Es preciso alcanzar condiciones de PCR y de termociclación que amplifiquen cantidades equimolares tanto de la secuencia endógena como de la transgénica en un molde de ADN genómico transgénico conocido. Siempre que no se amplifique el fragmento endógeno direccionado, o siempre que las secuencias seleccionadas como dianas no se amplifiquen con

las mismas intensidades de tinción con bromuro de etidio, tal como se juzga por la electroforesis en gel de agarosa, puede ser necesaria la optimización de las condiciones de la PCR.

5 Se ensayó material de hojas de *Glycine max* de varias plantas, algunas de las cuales comprendían A5547-127, de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente. Las muestras procedentes del suceso élite A5547-127 y procedentes de *Glycine max* de tipo salvaje se tomaron como controles positivo y negativo, respectivamente.

10 La Figura 2 ilustra el resultado obtenido con el protocolo de identificación mediante PCR del suceso élite para A5547-127 sobre varias muestras de plantas de haba de soja (líneas 1 a 14). Se encontró que las muestras en las línea 1 contenían el suceso élite, dado que se detectó la banda de 185 pb, mientras que las muestras en las líneas 2, 3 y 4 no comprenden A5547-127. La línea 2 comprende otro suceso élite de haba de soja, la línea 3 representa un control de *Glycine max* no transgénico; la línea 4 representa la muestra de control negativo (agua), y la línea 5 representa el marcador de peso molecular (100 pb).

3. Uso de un fragmento de integración específico como sonda para la detección de material que comprende A5547-127

15 Se obtiene un fragmento de integración específico de A5547-127 por amplificación de PCR usando los cebadores específicos MDB687 (SEC ID nº 15) y MDB688 (SEC ID nº 13), o mediante síntesis química, y se marca. Este fragmento de integración se usa como sonda específica para la detección de A5547-127 en muestras biológicas. Se extrae el ácido nucleico de las muestras de acuerdo con procedimientos estándar. Este ácido nucleico se pone luego en contacto con la sonda específica en condiciones de hibridación que están optimizadas para permitir la formación de un híbrido. La formación del híbrido se detecta luego para indicar la presencia del ácido nucleico de A5547-127 en la muestra. Opcionalmente, el ácido nucleico existente en las muestras se amplifica usando los cebadores específicos antes de la puesta en contacto con la sonda específica. Alternativamente, el ácido nucleico se marca antes de la puesta en contacto con la sonda específica, en lugar del fragmento de integración. Opcionalmente, la sonda específica se fija a un soporte sólido (tal como, pero sin carácter limitante, a un filtro, una tira o perlas), antes del contacto con las muestras.

25 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Bayer BioScience N.V. Marc, De Beuckeleer

<120> Suceso élite A5547-127 y métodos y kits para identificar tal suceso en muestras biológicas

<130> BCS 05-2009

<150> EP05075846.5

30 <151> 2005-04-11

<150> US60/670.414

<151> 2005-04-12

<160> 19

<170> PatentIn version 3.3

35 <210> 1

<211> 810

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

40 <223> secuencia nucleotídica que comprende una región flanqueante de 5' de A5547-127

<220>

<221> característica diversa

<222> (1)..(311)

<223> secuencia flanqueante de 5'

ES 2 369 032 T3

- <220>
- <221> característica diversa
- <222> (312)..(810)
- 5 <223> secuencia de ADN insertada
- <400> 1
- | | | |
|----|--|-----|
| | gtcatcgtcg tcgcgctgga gttctgtgg tgccgctggt cgcactggag tttgggtgt | 60 |
| | gttgttcatg cttgcgctgc taatcccctt ttgtatgca aaatcgggtt tgggtcgggt | 120 |
| 10 | cgggtcagcc caacacgacc taatttgtg tacgaaaatt tcaacaaaa aaaaaagta | 180 |
| | tctccgccca ttatgccat tccgccacga tcattaaggc tatggcggcc gcaatggcgc | 240 |
| | cgccatatga aaccgcaat gccatcgcta ttggtggca ttttccaaa aaccgcaat | 300 |
| | gtcatacctg catcgttgc agaagtaagt tgccgcagt gttatcactc atggtatgg | 360 |
| | cagcactgca taattctct actgtcatgc catccgtaag atgctttct gtgactggtg | 420 |
| 15 | agtactcaac caagtcattc tgagaatagt gtagcggcg accgagttgc tctgcccgg | 480 |
| | cgtaatacgg ggataatacc gcgccacata gcagaactt aaaagtgtc atcattggaa | 540 |
| | aacgttcttc gggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgatg | 600 |
| | aaccactcgc tgcaccaac tgatcttcag catctttac ttcaccagc gtttctgggt | 660 |
| | gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa aaaaggaat aacgccaggg tttcccagt | 720 |
| 20 | cacgacgttg taaaacgacg gccagtgaat tccatggag taaagattc aaatagagga | 780 |
| | cctaacagaa ctcgccgtaa agactggcga | 810 |
- <210> 2
- <211> 1880
- <212> ADN
- 25 <213> Artificial
- <220>
- <223> secuencia nucleotídica que comprende una región flanqueante de 3' de A5547-127
- <220>
- <221> característica diversa
- 30 <222> (1)..(509)
- <223> secuencias de ADN insertada
- <220>
- <221> características misc.
- <222> (510)..(1880)
- 35 <223> secuencias de ADN flanqueante de 3'

ES 2 369 032 T3

<400> 2

	ctttaaatt aaaaatgaag ttttaaatca atctaaagta tatatgagta aacttggtct	60
	gacagtacc aatgcttaat cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct atttcgtca	120
	tccatagttg cctgactccc cgctgtgtag ataactacga tacgggaggg cttaccatct	180
5	ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac ccacgctcac cggctccaga tttatcagca	240
	ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc	300
	atccagtcta ttaattgttg ccgggaagct agagtaagta gttcgccagt taatagttg	360
	cgcaacgttg ttgcattgc tacaggcatc gtgggtcac gctcgtcgtt tggatggct	420
	tcattcagct ccggttcca acgatcaagg cgagttacat gatccccat gttgtgcaaa	480
10	aaagcggta gtcctctcg tctctccgat gcaccgcat aaccacaatt taacaacttt	540
	ataaatgact tagtatatta gcaattatc ttgtcacatg cacatattt ataactataa	600
	taggagttg agttaaatg atgtaatgaa ttttgattg catgttgtt tgactatat	660
	tggtagcttt ttcaatgaa gtgttaaatt tgtattttc atattcaggg tcacgtttga	720
	ccttctctag tcactgcct aattaagccc ttctcttgc actcttgat cttactaac	780
15	ctgggcatca ggcatatgta atgttatcaa tcaaatatc acgtttcatg cattattaa	840
	tcttcattga tgccttgc tcgctctgc ccttttcc aatttatgct tcaaatctt	900
	gacatgttc atgtcctat tcttttctc tgtaactgtt cattttcgtt atgaacctg	960
	aagataaact actattgta aagtctcgg tcaaatftaa ctttctgct tttcccata	1020
	taattgaata agactggtc gtggtgttc tcatgcata tacctttatt atatgcatag	1080
20	aagtgtatt ttgctaac ttgtacatt tttatggca gtgatganga ttagagagg	1140
	cttatcgagc ttgtgaagg aatttctgc aagattaatc taatctcatt caatccgac	1200
	agtgatcat tctcaaacc aaccaaata gaaaggatga tgaattccg aaatacattg	1260
	gctggggcag gattgatagt attttaaga ctagtagag gtgatgatca attggcttc	1320
	tgtgtcaat tgggtaagcc tggcaccatt caagctccat ttctctgtg accagagcaa	1380
25	ttcaaatgg caattggaag tcaactga tctttgtgg aggttctgtg gcaaattgat	1440
	cttacagta ttaacgaaga attatatagg aacttctgtg tggggtagc tagggatgac	1500
	ttcactatga caatcaaga ccaagagcta aattagggg atgtctgtct gtttcatat	1560
	tgtactttc cattttacag ttaattgata tttttttt tattaatgtg acggatccag	1620
	attacttact ggctaagaaa taagaataa aatgattta aatatattt tagtcaagt	1680
30	ctgtatttt tagttcca aaftaaaatt tgcattttt aatctctcat ttataaaatg	1740
	ccttttaag ttctcttag ctgattttg gcaacttga tgcacaatgt gcaactatc	1800
	taacaatatt ttcttgaaa tttaaagaga ctaaaatata tgtttacca taacactcat	1860
	gtagtaaaa ccattattg	1880

<210> 3

35 <211> 21

<212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador HCA150
 5 <400> 3
 tcgtcgcgct ggagttcttg t 21
 <210> 4
 <211> 21
 <212> ADN
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador DPA013
 <400> 4
 tcatgcttgc gctgctaac c 21
 15 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 20 <223> cebador DPA228
 <400> 5
 acccgcaatg tcataccgctc 20
 <210> 6
 <211> 21
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador KVM173
 <400> 6
 30 tgctgccata accatgagtg a 21
 <210> 7
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>

<223> cebador YTP228
<400> 7
atcttacgga tggcatgaca g 21
<210> 8
5 <211> 27
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> cebador YTP220
10 <400> 8
aactggatct caacagcggg aagatcc 27
<210> 9
<211> 21
<212> ADN
15 <213> Artificial
<220>
<223> cebador DPA024
<400> 9
gtttacaac gtcgtgactg g 21
20 <210> 10
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
25 <223> cebador YTP245
<400> 10
ggcaggttct gtaggtcct c 21
<210> 11
<211> 21
30 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> cebador YTP170
<400> 11
35 agtgaggcac ctatctcagc g 21

<210> 12
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial
5 <220>
<223> cebador YTP227
<400> 12
agcaataaac cagccagccg g 21
<210> 13
10 <211> 21
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> cebador MDB688
15 <400> 13
tgctacaggc atcgtggtg c 21
<210> 14
<211> 21
<212> ADN
20 <213> Artificial
<220>
<223> cebador KVM175
<400> 14
gcaaaaaagc ggtagctcc t 21
25 <210> 15
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
30 <223> cebador MDB687
<400> 15
tgtggtatg gcggtgcat c 21
<210> 16
<211> 20
35 <212> ADN

ES 2 369 032 T3

<213> Artificial
<220>
<223> cebador SMO022
<400> 16
5 aaggtcaaac gtgaccctga 20
<210> 17
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial
10 <220>
<223> cebador SMO024
<400> 17
gaagaatgat cactgtgcg 20
<210> 18
15 <211> 21
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> cebador 1 para la amplificación de fragmento de control endógeno
20 <400> 18
tgtggtatg gcggtgcat c 21
<210> 19
<211> 21
<212> ADN
25 <213> Artificial
<220>
<223> cebador 2 para la amplificación de fragmento de control endógeno
<400> 19
tgctacaggc atcgtggtg c 21
30

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar el suceso élite A5547-127 en muestras biológicas, método el cual comprende detectar una región de ADN específica de A5547-127 que comprende una parte de la región de ADN flanqueante de 5' o 3' del suceso élite A5547-127 y una parte de la región de ADN extraño del suceso élite A5547-127 contigua con ella, con un cebador o sonda, en el que dicha región de ADN flanqueante de 5' comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 311, dicha región de ADN extraño contigua a dicha región flanqueante de 5' comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 312 hasta el nucleótido 810, dicha región de ADN flanqueante de 3' comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 510 hasta el nucleótido 1880, y dicha región de ADN extraño contigua a dicha región flanqueante de 3' comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 509.
2. El método de la reivindicación 1, comprendiendo dicho método amplificar un fragmento de ADN de entre 100 y 500 pb a partir de un ácido nucleico presente en dichas muestras biológicas usando una reacción en cadena de la polimerasa con al menos dos cebadores, reconociendo uno de dichos cebadores la región flanqueante de 5' o 3' de A5547-127, teniendo dicha región flanqueante de 5' la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 311, y teniendo dicha región flanqueante de 3' la secuencia nucleotídica del complemento de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 510 hasta el nucleótido 1880, reconociendo el otro cebador de dichos cebadores una secuencia en el ADN extraño que tiene la secuencia nucleotídica del complemento de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 312 hasta el nucleótido 810, o la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 509, respectivamente.
3. El método de la reivindicación 2, en el que dicho cebador que reconoce la región flanqueante de 5' consiste en una secuencia nucleotídica de 17 a 200 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 311, o dicho cebador que reconoce la región flanqueante de 3' de A5547-127 consiste en una secuencia nucleotídica de 17 a 200 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia nucleotídica del complemento de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 510 hasta el nucleótido 1880, y dicho cebador que reconoce la secuencia en el ADN extraño consiste en 17 a 200 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia nucleotídica del complemento de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 312 hasta el nucleótido 810 o la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 509, respectivamente.
4. El método de la reivindicación 2, en el que dicho cebador que reconoce la región flanqueante de 5' comprende en su extremo 3' terminal una secuencia nucleotídica de al menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 311, o dicho cebador que reconoce la región flanqueante de 3' de A5547-127 comprende en su extremo 3' terminal una secuencia nucleotídica de al menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia nucleotídica del complemento de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 510 hasta el nucleótido 1880, y dicho cebador que reconoce una secuencia en el ADN extraño comprende en su extremo 3' al menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia nucleotídica del complemento de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 312 hasta el nucleótido 810 o la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 509, respectivamente.
5. El método de la reivindicación 4, en el que dichos cebadores comprenden la secuencia de SEC ID nº 13 y SEC ID nº 15, respectivamente.
6. El método de la reivindicación 5, método el cual comprende amplificar un fragmento de alrededor de 151 pb usando el protocolo de identificación de A5547-127.
7. Un kit para identificar el suceso élite A5547-127 en muestras biológicas, comprendiendo dicho kit un conjunto de al menos dos cebadores como se describe en las reivindicaciones 2 a 5.
8. Un cebador para uso en un protocolo de identificación mediante PCR de A5547-127, que tiene una secuencia que, en condiciones optimizadas de PCR, reconoce específicamente una secuencia en la región flanqueante de 5' o 3' de A5547-127, teniendo dicha región flanqueante de 5' la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 311, y teniendo dicha región flanqueante de 3' la secuencia nucleotídica del complemento de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 510 hasta el nucleótido 1880, y comprendiendo dicho cebador en su extremo 3' terminal una secuencia nucleotídica de al menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia nucleotídica de dicha región flanqueante de 5' o el complemento de dicha región flanqueante de 3'.
9. El cebador de la reivindicación 8, en el que dicho cebador consiste en una secuencia nucleotídica de 17 a 200 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 311 o del complemento de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 510 hasta el nucleótido 1880.
10. El cebador de la reivindicación 8, en el que dicho cebador comprende en su extremo 3' terminal una secuencia nucleotídica de al menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 311 o del complemento de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 510 hasta el

nucleótido 1880.

11. Un cebador que comprende en su extremo 3' terminal la secuencia de SEC ID nº 13.

12. Un cebador que comprende en su extremo 3' terminal la secuencia de SEC ID nº 15.

5 13. El método de la reivindicación 1, método el cual comprende hibridar un ácido nucleico de muestras biológicas con dicha sonda que reconoce además específicamente el ADN extraño contiguo a la región de ADN flanqueante de 5' o 3' de A5547-127, en el que dicha región de ADN extraño comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 312 hasta el nucleótido 810, o de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 509.

14. El método de la reivindicación 13, en el que la sonda tiene al menos 80% de identidad de secuencia con dicha región de ADN específica de A5547-127, o su complemento.

10 15. El método de la reivindicación 13 ó 14, en el que la sonda tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEC ID nº 1 desde el nucleótido 260 hasta 360, o con SEC ID nº 2 desde el nucleótido 460 hasta 560, o el complemento de dichas secuencias.

15 16. Un kit para identificar el suceso élite A5547-127 en muestras biológicas, comprendiendo dicho kit una sonda como se describe en la reivindicación 13 a 15, en el que dicha sonda tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la región de ADN específica de A5547-127 de la reivindicación 1.

20 17. Una sonda para la identificación del suceso élite A5547-127 en muestras biológicas mediante hibridación de una región de ADN específica de A5547-127 como se describe en la reivindicación 1, en la que dicha sonda tiene una secuencia que reconoce dicha región de ADN específica de A5547-127 que comprende parte de la región flanqueante de 5' o 3' de A5547-127 y parte del ADN extraño contiguo a ella, en la que dicha región de ADN flanqueante de 5' tiene una secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 311, dicha región de ADN flanqueante de 3' tiene la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 510 hasta el nucleótido 1880, y dicha región de ADN extraño tiene una secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 312 hasta el nucleótido 810 o la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 509, respectivamente, en la que dicha sonda tiene al menos 80% de identidad de secuencia con dicha región de ADN específica.

18. La sonda de la reivindicación 17, que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEC ID nº 1 desde el nucleótido 260 hasta 360, o con SEC ID nº 2 desde el nucleótido 460 hasta 560, o el complemento de dichas secuencias.

30 19. Una sonda para uso en la hibridación de una región de ADN específica de A5547-127 como se describe en la reivindicación 1, cuya secuencia tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEC ID nº 1 desde el nucleótido 260 hasta 360, o con SEC ID nº 2 desde el nucleótido 460 hasta 560, o el complemento de dichas secuencias.

35 20. Un método para confirmar la pureza de las semillas, método el cual comprende la detección de una región de ADN específica de A5547-127 que comprende una parte de la región de ADN flanqueante de 5' o 3' del suceso élite A5547-127 y una parte de la región de ADN extraño del suceso élite A5547-127 contigua a ella, con un cebador o sonda que reconoce específicamente la región de ADN flanqueante de 5' o 3' de A5547-127, en muestras de semillas, en el que dicha región de ADN flanqueante de 5' comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 311 contigua a la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 312 hasta el nucleótido 810 del ADN extraño, y en el que dicha región de ADN flanqueante de 3' comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 510 hasta el nucleótido 1880 contigua a la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 509 del ADN extraño.

45 21. Un método para identificar semillas en busca de la presencia de A5547-127, método el cual comprende la detección de una región de ADN específica de A5547-127 que comprende una parte de la región de ADN flanqueante de 5' o 3' del suceso élite A5547-127 y una parte de la región de ADN extraño del suceso élite A5547-127 contigua a ella, con un cebador o sonda que reconoce específicamente la región de ADN flanqueante de 5' o 3' de A5547-127, en muestras de lotes de semillas, en el que dicha región de ADN flanqueante de 5' comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 311 contigua a la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 312 hasta el nucleótido 810 del ADN extraño, y en el que dicha región de ADN flanqueante de 3' comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 510 hasta el nucleótido 1880 contigua a la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 509 del ADN extraño.

50 22. Un amplicón discriminante que identifica específicamente el suceso élite A5547-127 de haba de soja, amplicón el cual se puede obtener a partir de una muestra de ácido nucleico que comprende dicho suceso élite usando una reacción en cadena de la polimerasa con al menos dos cebadores, reconociendo uno de dichos cebadores la región flanqueante de 5' de A5547-127, teniendo dicha región flanqueante de 5' la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 1

ES 2 369 032 T3

5 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 311, o la región flanqueante de 3' de A5547-127, teniendo dicha región flanqueante de 3' la secuencia nucleotídica del complemento de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 510 hasta el nucleótido 1880, reconociendo el otro cebador de dichos cebadores una secuencia en el ADN extraño que tiene la secuencia nucleotídica del complemento de SEC ID nº 1 desde el nucleótido 312 hasta el nucleótido 810, o la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 2 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 509, respectivamente.

Fig. 1

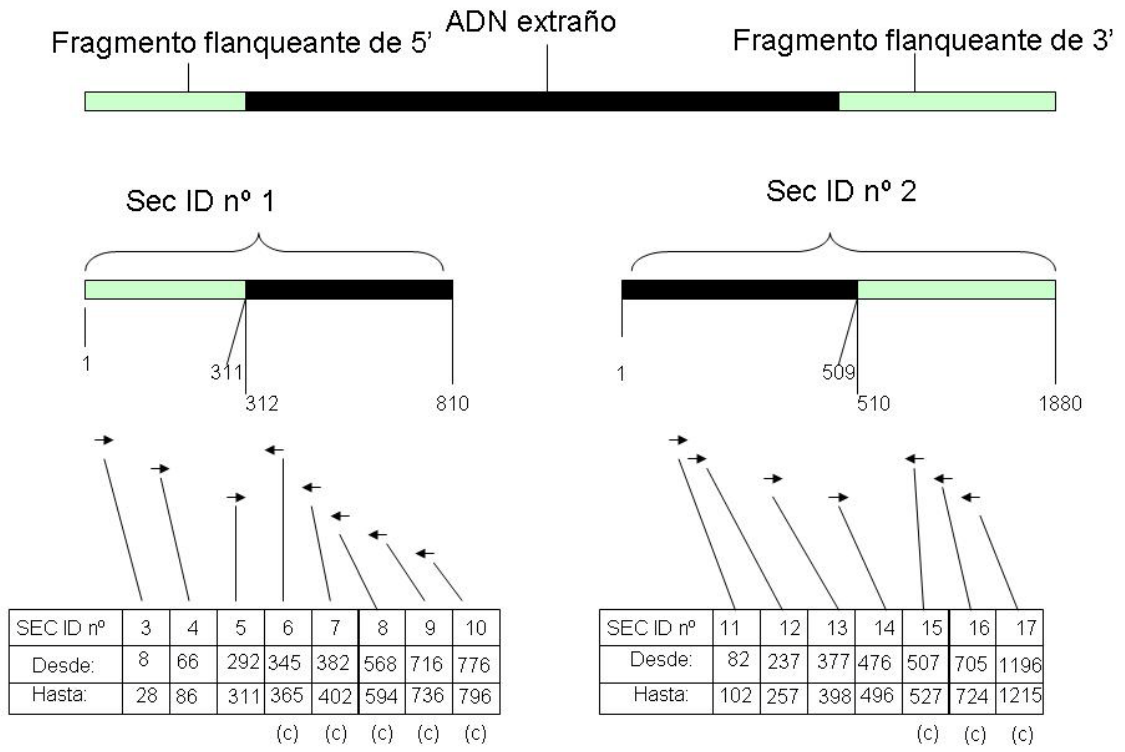


Fig. 2

