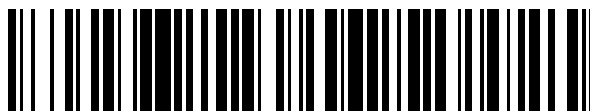


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 434**

51 Int. Cl.:
C12N 15/29 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **02794513 .8**
96 Fecha de presentación: **19.07.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1417312**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.05.2004**

54 Título: **PLANTAS DE ALGODÓN TOLERANTES A HERBICIDAS Y MÉTODOS PARA PRODUCIR E IDENTIFICAR A LAS MISMAS.**

30 Prioridad:
06.08.2001 US 921922

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.02.2012

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

72 Inventor/es:
**TROLINDER, Linda;
JEFFERSON, Gwyn y
DE BEUCKELEER, Marc**

74 Agente: **Lehmann Novo, Isabel**

ES 2 373 434 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

Plantas de algodón tolerantes a herbicidas y métodos para producir e identificar a las mismas.

Campo del invento

5 Este invento se refiere a plantas de algodón transgénicas, al material de las plantas y a semillas, caracterizadas/os porque albergan un suceso de transformación específico, particularmente por la presencia de un gen que codifica una proteína que confiere tolerancia a los herbicidas, en un lugar específico en el genoma del algodón, tal como se caracteriza en las reivindicaciones. Las plantas de algodón del invento combinan el fenotipo tolerante a un herbicida con un comportamiento agronómico, una estabilidad genética y una adaptabilidad a diferentes contextos genéticos equivalentes al linaje de algodón no transformado en la ausencia de presión de malezas.

10 Antecedentes del invento

15 La expresión fenotípica de un transgén en una planta es determinada tanto por la estructura del gen propiamente dicho como por su lugar en el genoma de la planta. Al mismo tiempo, la presencia del transgén en diferentes lugares del genoma influirá sobre el fenotipo global de la planta de diferentes maneras. La introducción satisfactoria desde los puntos de vista agronómico o industrial de un rasgo comercialmente interesante en una planta por manipulación genética puede ser un proceso largo y tedioso, dependiente de diferentes factores. La transformación y la regeneración reales de las plantas transformadas genéticamente son solamente la primera de una serie de etapas de selección, que incluyen una extensa caracterización genética, una crianza y una evaluación en pruebas realizadas en el campo.

20 Una fibra de algodón es el único material textil más importante en todo el mundo. Aproximadamente 80 millones de acres de algodón se cosechan anualmente en todo el globo terrestre. El algodón es la quinta planta más cultivada en los EE.UU. en términos de producción por superficie expresada en acres con más de 15 millones de acres plantados en el 2.000. Unas especies de malezas primarias para el algodón son *Ipomoea sp.* (Ipomoea violácea, en inglés morning glory), *Amaranthus spp.* (amaranto, en inglés pigweed), *Cyperus spp.* (coquillo, en inglés nutsedge), *Xanthium spp.* (bardana, en inglés cocklebur) y *Sorghum spp.* (sorgo de pasto, en inglés johnsongrass). Antes de la introducción de herbicidas para hojas anchas que se pudieran utilizar en un campo de algodón en crecimiento, los cultivadores usaron directamente unas aplicaciones después del brote de herbicidas no selectivos, teniendo cuidado de no entrar en contacto con las plantas cultivadas en crecimiento. Puesto que esto requiere una diferencia en altura entre las malezas y la planta cultivada, esto no es siempre posible. Especialmente para el algodón pequeño, esta práctica consume mucho tiempo y es potencialmente dañina para la planta cultivada.

30 El gen *bar* (Thompson y colaboradores, 1987, EMBO J 6:2519-2523; Deblock y colaboradores 1987, EMBO J. 6:2513-2518) es un gen que codifica la enzima fosfinotricina acetil transferasa (PAT) que, cuando se expresa en una planta, confiere una resistencia a los compuestos herbicidas fosfinotricina (también denominado glufosinato) o bialafos (véanse también por ejemplo las patentes de los EE.UU. 5.646.024 y 5.561.236) y sales e isómeros ópticos de los mismos. La fosfinotricina reprime a las malezas de hoja ancha incluyendo las *Ipomoea* y tiene una amplia ventana de aplicación.

35 Una satisfactoria transformación genética del algodón se ha obtenido por un cierto número de métodos, incluyendo la infección con *Agrobacterium* de explantes de algodón (véanse Firoozabady y colaboradores 1987, Plant Molecular Biology 10:105-116; Umbeck y colaboradores 1987, Bio/Technology 5:263-266 y los documentos de solicitud de patente internacional WO 00/71733, y de patentes de los EE.UU. US 5.004.863, y US 5.159.135), así como la transferencia directa de genes por bombardeo con microproyectiles de tejidos de algodón meristemáticos (Finer y Mc Mullen, 1990, Plant Cell Reports, 5:586-589; McCabe y Martinell, 1993, Bio/Technology 11:596-598, y los documentos WO92/15675 y de patente europea EP 0 531 506). Se ha informado de una eficiencia aumentada de transformación para la transformación con *Agrobacterium* usando los métodos descritos por Hansen y colaboradores (1994, Proc. Nat. Acad. Sci. 91:7603-7607), Veluthambi y colaboradores (1989, Journal of Bacteriology 171:3696-3703) y el documento WO 00/71733. Se han descrito también diferentes métodos para la regeneración de plantas de algodón (documentos WO 89/05344, US 5.244.802, US 5.583.036, WO89/12102, WO98/15622 y WO97/12512).

Sin embargo, los precedentes documentos no han sido capaces de enseñar ni sugerir el presente invento.

Sumario del invento

50 El presente invento se refiere a una planta de algodón transgénica, o a semillas, células o tejidos de la misma, que comprende integrada establemente dentro de su genoma, una casete de expresión que comprende un gen de tolerancia a un herbicida, que comprende a su vez la secuencia de codificación del gen *bar* (tal como se describe en el Ejemplo 1.1 en el presente texto), que es tolerante a herbicidas y que, en la ausencia de presión por malezas, tiene un comportamiento agronómico que es sustancialmente equivalente al isolinaje no transgénico tal como se

caracteriza en las reivindicaciones. Bajo presión de malezas y el apropiado tratamiento con Liberty®, la planta tendrá un fenotipo agronómico superior comparado con el de la planta no transgénica.

5 En una forma de realización del invento, la planta de algodón o las semillas, las células o los tejidos de la misma, comprende(n) la casete de expresión de pGSV71 (tal como se describe en el Ejemplo 1.1, Tabla 1 en el presente texto). La planta de algodón o las semillas, las células o los tejidos de la misma comprende(n) el suceso de élite EE-GH1.

En otra forma de realización del invento, la planta de algodón transgénica o las semillas, las células o los tejidos de la misma comprende(n):

- 10 (i) el suceso EE-GH1 en su genoma; o
(ii) el suceso EE-GH1 con la condición de que el gen *bar* usado en el suceso ha de ser sustituido con una secuencia de ácido nucleico que se hibrida con el complemento del gen *bar* en condiciones rigurosas.

15 Más específicamente, el presente invento se refiere a una planta de algodón transgénica, y a semillas, células o tejidos de la misma, cuyo ADN genómico está caracterizado por el hecho de que, cuando se analiza en un protocolo de identificación por PCR tal como se describe aquí, usando dos cebadores dirigidos a la región flanqueadora en 5' o 3' de EE-GH1 y el ADN ajeno, respectivamente, proporciona un fragmento que es específico para EE-GH1. Los cebadores están dirigidos contra la región flanqueadora en 5' dentro de la SEQ ID NO: 1 y el ADN ajeno respectivamente; los cebadores comprenden la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, y proporcionan un fragmento de ADN con una longitud entre 250 y 290 pb (pares de bases), de manera preferible de aproximadamente 269 pb.

20 Una semilla de referencia, que comprende el suceso de élite del invento, ha sido depositada en la colección ATCC bajo el número de acceso PTA-3343. Por lo tanto, una forma de realización del invento es la semilla que comprende el suceso de élite EE-GH1 depositado como el número de acceso en la ATCC PTA-3343, que crecerá para formar una planta de algodón resistente al glufosinato. La semilla con el número de depósito en la ATCC PTA-3343, procede de un lote de semillas que se compone en aproximadamente un 50 % de almendras no transgénicas y en un 50 % de almendras transgénicas que son hemicigólicas para el transgén que comprende el suceso de élite del invento, y que crecerán para formar plantas tolerantes al glufosinato. La semilla puede ser sembrada y las plantas en crecimiento pueden ser tratadas con PPT o Liberty®, tal como aquí se describe, para obtener unas plantas tolerantes al glufosinato en un 100 %, que comprenden el suceso de élite del invento. El invento se refiere además a las células, los tejidos, la progenie y los descendientes procedentes de una planta que comprende el suceso de élite del invento, que ha crecido a partir de la semilla depositada en la ATCC que tiene el número de acceso PTA-3343. El invento se refiere además a plantas obtenibles por propagación de y/o crianza con una planta de algodón que comprende el suceso de élite del invento que ha crecido a partir de la semilla depositada en la ATCC que tiene el número de acceso PTA-3343.

35 También se describen en el presente texto plantas, semillas, células o tejidos que comprenden una secuencia de ADN ajeno, de manera preferible un gen de tolerancia a un herbicida como aquí se describe, integrado dentro del ADN cromosomal en una región que comprende la secuencia de ADN de la planta de las SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO: 4, que comprende más particularmente la secuencia de ADN de la SEQ ID NO: 5, o una secuencia que se hibrida en condiciones rigurosas con una secuencia que es complementaria con una secuencia que comprende las secuencias de ADN de la planta, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4 y/o SEQ ID NO: 5.

40 Se describe además en el presente texto un procedimiento para producir una célula transgénica de una planta de algodón, que comprende introducir una molécula de ADN recombinante dentro de una región del ADN cromosomal de una célula, un tejido o un callo de algodón, que comprende la secuencia de ADN de la planta de las SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO: 4, o que comprende una secuencia que se hibrida en condiciones rigurosas con una secuencia que es complementaria con una secuencia que comprende la secuencia de ADN de la planta de las SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO: 4.

45 También se describe aquí un método para identificar a una planta transgénica, o a células o tejidos de la misma, que comprende el suceso de élite EE-GH1, cuyo método está basado en identificar la presencia de secuencias de ADN caracterizadoras o de aminoácidos codificados por dichas secuencias de ADN en la planta transgénica, las células o los tejidos. Dichas secuencias de ADN caracterizadoras pueden ser secuencias con una longitud de 15 pb, 20 pb, 30 pb o más, que comprenden el sitio de inserción del suceso, es decir tanto una parte de ADN ajeno como una parte del genoma de algodón (ya sea la región flanqueadora en 5' o 3') contigua a la misma, que permite una identificación específica del suceso de élite.

55 De acuerdo con otro aspecto del invento, se describen unas secuencias de ADN que comprenden el sitio de inserción del suceso y una longitud suficiente de polinucleótidos tanto del ADN genómico del algodón como del ADN ajeno (transgén), de manera tal que sean útiles como cebador o sonda para la detección del EE-GH1. De manera

5 preferible, dichas secuencias comprenden por lo menos 9 nucleótidos del ADN genómico del algodón y un número similar de nucleótidos del ADN ajeno (transgén) del EE-GH1 junto con ellas, en cada lado del sitio de inserción respectivamente. De manera sumamente preferible, dichas secuencias de ADN comprenden por lo menos 9 nucleótidos del ADN genómico del algodón y un número similar de nucleótidos del ADN ajeno que está contiguo al sitio de inserción en las SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 4.

10 El método para identificar a una planta transgénica, o a células o tejidos de la misma, que comprenden el suceso de élite EE-GH1, puede comprender amplificar una secuencia de un ácido nucleico que está presente en muestras biológicas, usando una reacción en cadena de la polimerasa (PCR, acrónimo de Polymerase Chain Reaction) con por lo menos dos cebadores, uno de los cuales reconoce al ADN de la planta en la región flanqueadora en 5' o 3' de EE-GH1, y el otro reconoce a una secuencia situada dentro de ADN ajeno. El ADN genómico puede ser analizado usando unos cebadores que reconocen a una secuencia situada dentro de la región flanqueadora en 5' de la planta de EE-GH1, de manera sumamente preferible dentro de la secuencia de ADN de la planta en la SEQ ID NO: 1, y una secuencia situada dentro del ADN ajeno, respectivamente. El ADN genómico se puede analizar de acuerdo con el protocolo de identificación por PCR que aquí se describe, según el cual el cebador que reconoce a una secuencia situada dentro de la región flanqueadora en 5', comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2. Particularmente, el cebador que reconoce a una secuencia situada dentro de la región flanqueadora en 5' comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 y el cebador que reconoce a una secuencia situada dentro del ADN ajeno comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3, de manera tal que el fragmento amplificado es un fragmento que comprende preferiblemente entre 250 y 290 pb, más preferiblemente entre 260 y 270 pb, de manera sumamente preferiblemente 269 pb.

Correspondientemente, se describen aquí la planta transgénica, las células o los tejidos de la misma, que se pueden identificar de acuerdo con los métodos de identificación más arriba descritos para EE-GH1.

25 El presente invento se refiere a unos métodos para identificar al suceso de élite EE-GH1 en muestras biológicas, cuyos métodos están basados en cebadores o sondas que reconocen específicamente a las secuencias flanqueadoras en 5' y/o 3' de EE-GH1. En una forma preferida de realización del invento, estos métodos están basados en unos cebadores o unas sondas que reconocen a una secuencia situada dentro de las SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO: 4, más particularmente unos cebadores o unas sondas que comprenden la secuencia de la SEQ ID NO: 2. Dichos métodos están basados en unos cebadores o unas sondas que reconocen a una secuencia caracterizadora de EE-GH1, que es una secuencia de ADN que comprende el sitio de inserción del suceso, que incluye suficientes nucleótidos del ADN flanqueador en 5' o 3' y el ADN ajeno que está contiguo a éste, de manera tal que sea de carácter diagnóstico para el suceso. Dichos métodos están basados en una secuencia que comprende suficientes nucleótidos del ADN flanqueador en 5' o 3' y del ADN ajeno contiguo a este de las SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 4 tal como se caracterizan las reivindicaciones. Dichos métodos son conocidos en la especialidad e incluyen, pero no se limitan a, el método descrito por Lyamichev y colaboradores (1999, Nature Biotechn 17:292-296).

40 También se describen aquí las secuencias flanqueadoras específicas de EE-GH1 que aquí se describen, las cuales se pueden usar para desarrollar unos específicos métodos de identificación del EE-GH1 en muestras biológicas. Más particularmente, se describen las regiones flanqueadoras en 5' y/o 3' de EE-GH1, que se pueden usar para el desarrollo de cebadores y sondas que son específicos/as así como de los cebadores y las sondas específicos/as, que se han desarrollado a partir de las secuencias flanqueadoras en 5' y/o 3' de EE-GH1 y del sitio de inserción adyacente a éste.

Se describen además unos métodos de identificación de la presencia del EE-GH1 en muestras biológicas, basándose en el uso de dichos cebadores o dichas sondas específicos/as.

45 El invento, por lo tanto, se refiere a un estuche para identificar el suceso de élite EE-GH1 en muestras biológicas, comprendiendo el estuche por lo menos un cebador o una sonda que reconoce específicamente a la región flanqueadora en 5' a 3' de EE-GH1, tal como se caracterizan en las reivindicaciones.

50 El estuche del invento comprende, además de un cebador que reconoce específicamente a la región flanqueadora en 5' o 3' de EE-GH1, un segundo cebador que reconoce específicamente a una secuencia situada dentro del ADN ajeno de EE-GH1, para su uso en un protocolo de identificación por PCR. Preferiblemente, el estuche del invento comprende dos (o más) cebadores específicos, uno de los cuales reconoce a una secuencia situada dentro de la región flanqueadora en 5' de EE-GH1, de manera sumamente preferible una secuencia situada dentro de la región del ADN de la planta de la SEQ ID NO: 1, y el otro reconoce a una secuencia situada dentro del ADN ajeno. De manera especialmente preferible, el cebador que reconoce a la secuencia de ADN de la planta situada dentro de la región flanqueadora en 5' comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2. Particularmente, el cebador que reconoce a la secuencia de ADN de la planta situada dentro de la región flanqueadora en 5' comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 y el cebador que reconoce al ADN ajeno comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 que aquí se describe.

De acuerdo con una forma de realización adicional, el invento se refiere a un estuche para identificar al suceso de élite EE-GH1 en muestras biológicas, cuyo estuche comprende por lo menos un cebador o una sonda específico/a que tiene una secuencia que corresponde (o es complementaria con) una secuencia que se hibrida en condiciones rigurosas con una región específica o caracterizadora del EE-GH1. De manera preferible, la secuencia de la sonda corresponde a una región específica que comprende una parte del ADN ajeno y una parte de la región flanqueadora en 5' o 3' (ADN de la planta) del EE-GH1 contiguo a ella. De modo sumamente preferible, la sonda específica comprende (o es complementaria con) una secuencia que se hibrida en condiciones rigurosas con una secuencia de 15 a 30 nucleótidos, que franquea el sitio de inserción en la región 5' o 3' del ADN ajeno dentro de las SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 4. De manera especialmente preferible, la sonda específica comprende (o es complementaria con) una secuencia que se hibrida en condiciones rigurosas con una secuencia de 9 nucleótidos del ADN de la planta y un número similar de nucleótidos del ADN ajeno contiguo al sitio de inserción, situados dentro de las secuencias de las SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 4. De acuerdo con una forma de realización particular, dicho cebador comprende una secuencia que es idéntica a una secuencia de 9 nucleótidos del ADN de la planta y un número similar de nucleótidos del ADN ajeno contiguo al sitio de inserción, situados dentro de las secuencias de las SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 4.

Los métodos y los estuches abarcados por el presente invento se pueden usar para diferentes finalidades, tales como, pero sin limitarse a, las siguientes: identificar al EE-GH1 en plantas, en el material de las plantas o en productos tales como, pero sin limitarse a, alimentos y piensos o productos alimenticios (recientes o elaborados) que comprenden o se derivan de un material de planta; de manera adicional o alternativa, los métodos y estuches del presente invento se pueden usar para identificar un material de planta transgénica para finalidades de segregación entre un material transgénico y otro no transgénico; de manera adicional o alternativa, los métodos y los estuches del presente invento se pueden usar para determinar la calidad (es decir el porcentaje de material puro) de un material de planta que comprende EE-GH1.

También se describe aquí un método para seguir el rastro de plantas que comprenden el suceso de élite EE-GH1 en su genoma después de su introducción dentro de diferentes cultivares.

Se entenderá que unas formas particulares de realización del invento son descritas por las reivindicaciones dependientes que aquí se citan.

Breve descripción de la Figura

La siguiente descripción detallada, que se da por vía del ejemplo, se puede entender en conjunción con la Figura aneja, que se incorpora aquí por referencia en la que:

Fig. 1. Un análisis por PCR de otros sucesos y del suceso de élite EE-GH1 usando el protocolo de identificación por PCR del EE-GH1. Secuencia de carga del gel: pista 1, marcador del peso molecular (escalera de 100 pb), pista 2, muestra de ADN procedente de una planta de algodón que comprende el suceso transgénico EE-GH1, pista 3, muestras de ADN procedentes de una planta de algodón que comprende otro suceso transgénico, pista 4, ADN procedente de algodón de tipo silvestre, pista 5, tipo silvestre más 1 copia del material digerido pGSV71-BamHI (testigo positivo), pista 6 testigo negativo (no de molde), pista 8, marcador del peso molecular (escalera de 100 pb).

Descripción detallada de formas preferidas de realización

El término "gen", tal como se usa aquí, se refiere a cualquier secuencia de ADN que comprende varios fragmentos de ADN engarzados operativamente, tales como una región de promotor, una región no traducida en 5' (la 5'UTR), una región codificadora (que puede o no codificar una proteína), y una región no traducida en 3' (3'UTR) que comprende un sitio de poliadenilación. Típicamente en células de plantas, la 5'UTR, la región codificadora y la 3'UTR son transcritas dentro de un ARN del cual, en el caso de un gen que codifica una proteína, la región codificadora es traducida en una proteína. Un gen puede incluir fragmentos de ADN adicionales tales como, por ejemplo, intrones. Como se usa en el presente contexto, un locus genético es la posición de un gen dado en el genoma de una planta.

El término "quimérico" cuando se refiere a una secuencia de un gen o ADN, se usa para referirse al hecho de que la secuencia de gen o ADN comprende por lo menos dos fragmentos de ADN funcionalmente relevantes (tales como un promotor, la 5'UTR, la región codificadora, la 3'UTR, un intrón) que de un modo natural no están asociados unos con otros, y/o se originan, por ejemplo, a partir de diferentes fuentes. El término "ajeno" al referirse a una secuencia de gen o ADN con respecto a una especie de planta, se usa para indicar que la secuencia del gen o ADN no es hallada de un modo natural en esa especie de planta, o no es hallada de un modo natural en ese locus genético en esa especie de planta. El término "ADN ajeno" se usará en el presente texto para referirse a una secuencia de ADN tal como ha sido incorporada dentro del genoma de una planta como un resultado de una transformación. El "ADN transformante" tal como se usa en el presente contexto se refiere a una molécula de ADN recombinante usada para la transformación. El ADN transformante comprende usualmente por lo menos un "gen interesante" (p.ej. un gen

químico) que es capaz de conferir una o más características específicas a la planta transformada. El término "molécula de ADN recombinante" se usa para ejemplificar y por lo tanto puede incluir una molécula aislada de ácido nucleico, que puede ser un ADN y que se puede obtener mediante procesos de recombinación o de otro tipo.

5 Como se usa en el presente texto, el término "transgénico" se refiere a un gen interesante (o la totalidad del ADN ajeno) tal como se incorpora en el genoma de una planta. Una "planta transgénica" se refiere a una planta que comprende por lo menos un transgén en el genoma de todas sus células.

El ADN ajeno presente en las plantas del presente invento comprenderá de manera preferible un gen de tolerancia a un herbicida, más específicamente un gen 35S-bar como el gen interesante.

10 Un gen de "tolerancia a un herbicida" como se usa en el presente contexto, se refiere a un gen que hace que la planta sea tolerante a un herbicida. Un ejemplo de un gen de tolerancia a un herbicida es un gen que comprende una secuencia que codifica la enzima fosfinotricina acetil transferasa, que desintoxica a la fosfinotricina, bajo el control de un promotor constitutivo. Más específicamente, en el suceso de élite del presente invento el gen de tolerancia a un herbicida comprende la secuencia codificadora del gen de resistencia al bialafos (*bar*) de *Streptomyces hygroscopicus* (Thompson y colaboradores (1987) EMBO J 6: 2519-2523) bajo el control del promotor de 35S procedente del virus del mosaico de la coliflor (Odell y colaboradores (1985), Nature 313: 810-812), que también se cita aquí como el gen "35S-*bar*". La expresión del gen 35S-*bar* confiere tolerancia a los compuestos herbicidas fosfinotricina o bialafos o glufosinato, o de un modo más general, a agentes inhibidores de la glutamina sintasa o sales o isómeros ópticos del mismo, que generalmente se citará aquí en el presente texto como "tolerancia al glufosinato".

20 Por hibridación en "condiciones rigurosas" se entienden las condiciones de hibridación convencionales que han sido descritas por Sambrook y colaboradores (1989) (Molecular Cloning: A Laboratory Manual [Clonación molecular, un manual de laboratorio], segunda edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY) que por ejemplo pueden comprender las siguientes etapas: 1) inmovilizar fragmentos de ADN genómico de la planta sobre un filtro, 2) hibridar previamente el filtro durante 1 a 2 horas a 42°C en formamida al 50 %, 5 X SSPE, 2 X reactivo de Denhardt y 0,1 % de SDS (dodecil-sulfato de sodio), o durante 1 a 2 horas a 68°C en 6 X SSC, 2 X reactivo de 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 la temperatura ambiente en 1X SSC y 0,1 % de SDS, 6) lavar el filtro tres veces durante 20 min. cada vez a 68°C en 0,2 X SSC y 0,1 % de SDS, y 7) exponer el filtro durante 24 a 48 horas a una película de rayos X a -70°C con una pantalla intensificadora.

30 La incorporación de una molécula de ADN recombinante en el genoma de una planta resulta típicamente de una transformación de una célula, un tejido o un callo (o procedente de otra manipulación genética). El sitio particular de incorporación o bien es aleatorio o está en un lugar previamente determinado (si se usa un proceso de integración dirigida a una diana).

35 El ADN introducido en el genoma de la planta como un resultado de la transformación de una célula o un tejido de la planta con un ADN recombinante o "ADN", se cita aquí como el "ADN ajeno" que comprende uno o más "transgenes". Así, un ADN ajeno puede comprender tanto un ADN recombinante así como un ADN reestructurado de la planta, introducido de nuevas. Sin embargo, el término "ADN de la planta" en el contexto del presente invento se referirá al ADN de la planta que es encontrado generalmente en el mismo locus genético en la correspondiente planta de tipo silvestre.

40 El ADN ajeno puede ser caracterizado 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 de la planta en donde ha sido introducido un ADN recombinante es citado también como el "sitio de inserción" o "sitio diana". La introducción (inserción) del ADN recombinante dentro del genoma de la planta puede ser asociada con una supresión (delección) de ADN de la planta, citada como "supresión del sitio diana". Una "región flanqueadora" o "secuencia flanqueadora" tal como aquí se usa, se refiere a una secuencia de por lo menos 20 pb, de manera preferible de por lo menos 50 pb y de hasta 5.000 pb del genoma de la planta, que está situado o bien inmediatamente corriente arriba de y contiguo a o inmediatamente corriente abajo de y contiguo a el ADN ajeno. Unos procesos de transformación que conducen a una integración aleatoria del ADN ajeno darán como resultado unos transformantes con diferentes regiones flanqueadoras, que son características y únicas en su género para cada transformante. Cuando el ADN recombinante, que está presente en una planta transgénica, es introducido dentro de una planta diferente mediante un cruzamiento tradicional, su sitio de inserción en el genoma de la planta o sus regiones flanqueadoras generalmente no se cambiarán (aparte de unos cambios ocasionales debidos a mutaciones o cruces y transposones). Una "región de inserción" como se usa en el presente contexto, se refiere a la región que corresponde a la región de por lo menos 40 pb, de manera preferible por lo menos 100 pb y de hasta más que 10.000 pb, abarcadas por la secuencia que comprende la región flanqueadora corriente arriba y/o corriente abajo de un ADN ajeno en el genoma de la planta (no transformada) (y que incluye el sitio de inserción y la posible supresión de un sitio diana). Tomando en consideración diferencias minoritarias debidas a mutaciones dentro de una especie, una región de inserción retendrá por lo menos el 85 %, de manera preferible el 90 %, de manera más preferible el 95 % y de manera sumamente preferible el 100 % de identidad de secuencias con la secuencia que comprende las regiones flanqueadoras corriente arriba y corriente abajo del ADN ajeno en una planta dada de esa especie.

El concepto de expresión de un gen interesante se refiere al hecho de que el gen confiere a la planta uno o más rasgos fenotípicos (p.ej. tolerancia a un herbicida), que se pretendía(n) conferir por la introducción de la molécula de ADN recombinante – del ADN transformante – que se había usado durante la transformación (sobre la base de la estructura y la función de una parte o de la totalidad del o los gen(es) interesante(s)).

5 Un “suceso” es definido como un locus genético (artificial) que, como resultado de la ingeniería genética, lleva un ADN ajeno que comprende por lo menos una copia del o los gen(es) interesante(s) (también citada como un suceso de transformación). Un suceso es caracterizado fenotípicamente por la expresión de los transgenes. Al nivel genético, un suceso es una parte de la disposición genética de una planta. Al nivel molecular, un suceso es caracterizado por el mapa de restricción (p.ej. tal como se determina por transferencia de borrar Southern) y/o por
10 las secuencias flanqueadoras situadas corriente arriba y/o corriente abajo del ADN ajeno y/o por la configuración molecular del ADN ajeno que comprende los transgenes. Usualmente, cuando se transforma una célula, un tejido o un callo de una planta con un ADN transformante, se genera una multitud de sucesos, cada uno de los cuales es único en su género.

15 Un “suceso de élite” como se usa en el presente texto, es un suceso que se selecciona entre un grupo de sucesos, obtenido por transformación con el mismo ADN transformante o por cruzamiento de retorno con plantas obtenidas por dicha transformación, basándose en la expresión fenotípica y en la estabilidad de los transgenes y en la ausencia de un impacto negativo sobre las características agronómicas de la planta que lo comprende (es decir el suceso de transformación seleccionado). Por lo tanto los criterios para la selección de un suceso de élite son uno o más, preferiblemente dos o más, ventajosamente la totalidad de los siguientes:

- 20 a) que la presencia del ADN ajeno en la planta no comprometa a otras características deseadas de la planta, tales como las que se refieren al comportamiento agronómico o al valor comercial;
- b) que el suceso sea caracterizado por una configuración molecular bien definida que es heredada de una manera estable y para la cual se pueden desarrollar apropiadas herramientas de diagnóstico para el control de la identidad;
- 25 c) que el (o los) gen(es) interesante(s) muestre(n) una expresión fenotípica espacial y temporal apropiada y estable en la condición homocigótica del suceso, a un nivel comercialmente aceptable en una gama de condiciones medioambientales en las que es probable que las plantas que son portadoras del suceso sean expuestas a un uso agronómico normal.

30 Se prefiere que el ADN ajeno esté asociado con una posición en el genoma de la planta que permite una introgresión dentro de contextos genéticos comerciales deseados.

El estatus de un suceso como un suceso de élite es confirmado por introgresión del suceso de élite dentro de diferentes contextos genéticos relevantes y observando la adaptabilidad con uno, dos o la totalidad de los criterios, p.ej. a), b) y c) anteriores.

35 Por lo tanto, un “suceso de élite” se refiere a un locus genético que comprende un ADN ajeno, que responde a los criterios antes descritos. Una planta, un material de planta o una progenie tal como semillas, puede comprender uno o más sucesos de élite en su genoma. Por lo tanto, cuando se hace referencia a una planta, una semilla, una célula o un tejido que comprende el suceso de élite EE-GH1 en su genoma, se entiende una planta, una semilla, una célula o un tejido que comprende el ADN ajeno aquí descrito (que comprende el gen *35S-bar*) integrado en su genoma junto al sitio de integración que aquí se describe.

40 Las herramientas desarrolladas para identificar a un suceso de élite o a la planta o al material de planta que comprende un suceso de élite, o a productos que comprenden un material de planta que comprende el suceso de élite, se basan en las características genómicas específicas del suceso de élite tales como un mapa de restricción específico de la región genómica que comprende el ADN ajeno, marcadores moleculares con la secuencia de la(s) región(regiones) flanqueadora(s) del ADN ajeno.

45 Una vez que han sido secuenciadas una o ambas de las regiones flanqueadoras del ADN ajeno, se pueden desarrollar unos cebadores y unas sondas que reconozcan específicamente a esta(s) secuencia(s) en el ácido nucleico (ADN o ARN) de una muestra por la vía de una técnica biológica molecular. Por ejemplo, se puede desarrollar un método de PCR para identificar el suceso de élite en muestras biológicas (tales como muestras de plantas, del material de las plantas o productos que comprenden el material de las plantas). Dicha PCR está basada en por lo menos dos “cebadores” específicos, uno de los cuales reconoce a una secuencia situada dentro de la
50 región flanqueadora en 5' o 3' del suceso de élite y el otro reconoce a una secuencia situada dentro del ADN ajeno. Los cebadores tienen preferiblemente una secuencia de entre 15 y 35 nucleótidos que, en condiciones de PCR optimizadas, “reconoce específicamente” a una secuencia situada dentro de la región flanqueadora en 5' o 3' del suceso de élite y del ADN ajeno del suceso de élite respectivamente, de manera tal que un fragmento específico (“fragmento de integración”) es amplificado a partir de una muestra de ácido nucleico que comprende el suceso de élite. Esto significa que solamente el fragmento de integración establecido como diana, y ninguna otra secuencia (de ese tamaño) en el genoma de la planta o el ADN ajeno, es amplificado en condiciones de PCR optimizadas.

Preferiblemente, el fragmento de integración tiene una longitud preferida de entre 50 y 500 nucleótidos, de manera sumamente preferible de entre 100 y 350 nucleótidos. Preferiblemente, los cebadores específicos tienen una secuencia que es idéntica entre un 80 y un 100 % a una secuencia situada dentro de la región flanqueadora en 5' o 3' del suceso de élite y del ADN ajeno del suceso de élite, respectivamente, con la condición de que las incongruencias todavía permitan una identificación específica del suceso de élite con estos cebadores en condiciones de PCR optimizadas. La gama de incongruencias permisibles, sin embargo, se puede determinar fácilmente de modo experimental y éstas son conocidas por una persona experta en la especialidad.

Puesto que la secuencia de los cebadores y su secuencia reconocida en el genoma son únicas en su género para el suceso de élite, una amplificación del fragmento de integración se realizará solamente en muestras biológicas que comprendan (el ácido nucleico de) el suceso de élite. Preferiblemente, cuando se realiza una PCR para identificar la presencia del EE-GH1 en muestras desconocidas, se incluye un testigo (o elemento de control) de un conjunto de cebadores con el cual se puede amplificar un fragmento situado dentro de un "gen de mantenimiento" de la especie de plantas del suceso. Los genes de mantenimiento son unos genes que son expresados en la mayor de los tipos de células y que son implicados en actividades metabólicas básicas comunes para todas las células. Preferiblemente, el fragmento amplificado a partir del gen de mantenimiento es un fragmento que tiene una mayor longitud que el fragmento de integración amplificado. Dependiendo de las muestras que se hayan de analizar, se pueden incluir otros testigos.

Unos protocolos de PCR normalizados se describen en la especialidad, tal como en el "Manual de aplicaciones de la PCR" (de Roche Molecular Biochemicals, 2ª edición, 1999). Las condiciones óptimas para la PCR, incluyendo la secuencia de los cebadores específicos, se especifica en un "protocolo de identificación por PCR" para cada suceso de élite. Se entiende, sin embargo, que un cierto número de parámetros en el protocolo de identificación por PCR pueden necesitar ser ajustados a unas condiciones de laboratorio específicas, y que éstos se pueden modificar ligeramente para obtener unos resultados similares. Por ejemplo, el uso de un método diferente para la preparación de un ADN puede requerir un ajuste, por ejemplo, de la cantidad de cebadores, de la polimerasa y de las condiciones de reanillamiento que se usen. Similarmente, la selección de otros cebadores puede dictar otras condiciones óptimas para el protocolo de identificación por PCR. Estos ajustes, sin embargo, resultarán evidentes para una persona experta en la especialidad y se detallan además en los manuales de aplicación de PCR actuales, tales como el antes citado.

Alternativamente, se pueden usar unos cebadores específicos para amplificar un fragmento de integración que se puede usar como una "sonda específica" para identificar el EE-GH1 en muestras biológicas. El hecho de poner en contacto el ácido nucleico de una muestra biológica con la sonda, en unas condiciones que permitan una hibridación de la sonda con su correspondiente fragmento en el ácido nucleico, da como resultado la formación de un híbrido del ácido nucleico y de la sonda. La formación de este híbrido se puede detectar (p.ej. por marcación del ácido nucleico o de la sonda), con lo que la formación de este híbrido indica la presencia del EE-GH1. Dichos métodos de identificación basados en una hibridación con una sonda específica (situada ya sea en un soporte de fase sólida o en solución) han sido descritos en la especialidad. La sonda específica es de manera preferible una secuencia que, en condiciones optimizadas, se hibrida específicamente con una región que comprende una parte de la región flanqueadora en 5' o 3' del suceso de élite y que también comprende una parte del ADN ajeno que está contiguo a éste (en lo sucesivo citada también como una "región específica" del suceso). Dependiendo del método que se use, dicha sonda específica puede comprender una secuencia de entre 15 y 30 pb o de entre 50 y 500 pb, preferiblemente de 100 a 350 pb que se hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de nucleótidos (o con el complemento de dicha secuencia) de una región específica. De manera preferible, la sonda específica comprenderá una secuencia de aproximadamente 15 a aproximadamente 100 nucleótidos contiguos que son idénticos a (o complementarios con) los de una región específica del suceso de élite. De manera sumamente preferible, dicha sonda comprende por lo menos 9 nucleótidos idénticos a (o complementarios con) los de la región flanqueadora en 3' o 5' y un número similar de nucleótidos en el ADN ajeno contiguo a ella. De manera sumamente preferible, dicha sonda comprende por lo menos 9 nucleótidos idénticos a (o complementarios con) los de la región flanqueadora en 3' o 5' y un número similar de nucleótidos en el ADN ajeno contiguo a ésta de las SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 4.

El concepto de un "mapa de restricción", tal como se usa en el presente contexto, se refiere a un conjunto de pautas de transferencia de borrón Southern obtenidas después de disociar un ADN genómico de una planta (y/o el ADN ajeno comprendido en él) con una enzima de restricción particular en condiciones normalizadas de rigurosidad. Las condiciones normalizadas de rigurosidad tal como se usan en el presente texto, se refieren a las condiciones para una hibridación que aquí se describen o a las condiciones de hibridación convencionales que han sido descritas por Sambrook y colaboradores (1989) (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY) que pueden comprender por ejemplo las siguientes etapas: 1) inmovilizar fragmentos de ADN genómico de la planta sobre un filtro, 2) hibridar previamente el filtro durante 1 a 2 horas a 42°C en formamida al 50 %, 5 X SSPE, 2 X reactivo de Denhardt y 0,1 % de SDS, o durante 1 a 2 horas a 68°C en 6 X SSC, 2 X reactivo de 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 la temperatura ambiente en 1 X SSC, 0,1 % de SDS, 6) lavar el filtro tres veces durante 20 min., cada vez a 68°C en 0,2 X SSC, 0,1 % de SDS, y 7) exponer el filtro durante 24 hasta 48 horas a una película de rayos X a -70°C con una pantalla intensificadora.

Debido a los sitios de restricción (endógenos) que están presentes en un genoma de una planta antes de la incorporación del ADN ajeno, la introducción de un ADN ajeno alterará el mapa de restricción específico de ese genoma. Por lo tanto, un transformante particular o una progenie derivada de éste se puede identificar por una o más pautas de restricción específicas.

5 Alternativamente, las plantas o el material de las plantas, que comprenden un suceso de élite, se pueden identificar ensayando con un protocolo de identificación por PCR. Éste es una PCR que reconoce específicamente al suceso de élite. Esencialmente, se desarrolla un conjunto de cebadores de PCR, que reconocen a) a una secuencia situada dentro de la secuencia flanqueadora en 3' o 5' del suceso de élite y b) una secuencia situada dentro del ADN ajeno, los cuales cebadores amplifican un fragmento (fragmento de integración) constituido preferiblemente por entre 100 y
10 300 nucleótidos. Preferiblemente, se incluye un testigo de un conjunto de cebadores que amplifica a un fragmento con un gen de mantenimiento de la especie de planta (preferiblemente un fragmento que es más largo que el fragmento de integración amplificado). Las condiciones óptimas para la PCR, incluyendo la secuencia de los cebadores específicos, se especifican en un protocolo de identificación por PCR.

15 Otros métodos para identificar plantas, un material de plantas o productos que comprenden el material de plantas, que comprenden el suceso de élite EE-GH1, se contemplan también. Estos métodos incluyen todos los métodos basados en la detección de la secuencia de ADN ajeno y la(s) secuencia(s) flanqueadora(s) del suceso de élite con una sonda específica. Más particularmente, se contemplan unas tecnologías basadas en chips, tales como las que han sido descritas por Hacia y colaboradores 1996 (Nat Genet 14(4):441-447) y por Shoemaker y colaboradores 1996 (Nat Genet 14(4):450-456). Estos métodos permiten la segregación de unas moléculas dianas como
20 agrupaciones de alta densidad usando unas agrupaciones de sondas fijadas o marcando los genes con oligonucleótidos, después de lo cual éstas se pueden escrutar por hibridación. Alternativamente, se contemplan unos terceros métodos de detección de ondas, tales como los que han sido descritos por Lyamichev y colaboradores (1999, anteriormente).

25 La identificación de la(s) proteína(s) codificada(s) por el ADN ajeno del suceso de élite se puede realizar por clásicos métodos de detección de proteínas que han sido descritos en la especialidad, tales como los que están basados en las propiedades cromatográficas o electromagnéticas de la proteína o la detección por anticuerpos monoclonales específicos (tal como se describen en "Guide to protein purification" [guía para la purificación de proteínas], Murray P., coordinador de edición alemán).

30 Un "estuche" tal como se utiliza en este texto, se refiere a un conjunto de reactivos con la finalidad de realizar el método del invento, más particularmente la identificación del suceso de élite EE-GH1 en muestras biológicas. Más particularmente, el estuche del invento comprende por lo menos dos cebadores específicos, tal como se han descrito anteriormente. Opcionalmente, el estuche puede comprender además cualquier otro reactivo que se describe aquí en el protocolo de identificación por PCR.

35 Alternativamente, el estuche puede comprender una sonda específica, como más arriba se ha descrito, que se hibrida específicamente con el ácido nucleico de muestras biológicas para identificar la presencia de EE-GH1 en ellas. Opcionalmente, el estuche puede comprender además cualquier otro reactivo (tal como, pero sin limitarse a, un tampón de hibridación, una marca) para la identificación del EE-GH1 en muestras biológicas usando la sonda específica.

40 El estuche del invento se puede usar para, y sus componentes se pueden ajustar específicamente a, finalidades de control de la calidad (p.ej. la pureza de lotes de semillas), de detección del suceso de élite en un material de planta o un material que comprende o se deriva del material de planta, tal como pero sin limitarse a, un alimento o pienso o productos alimenticios.

45 El presente invento se refiere al desarrollo de un suceso de élite en algodón, EE-GH1, a las plantas que comprenden este suceso, a la progenie obtenida a partir de estas plantas y a las células de las plantas o al material de las plantas que se deriva de este suceso. Unas plantas que comprende el suceso de élite EE-GH1 se obtuvieron mediante transformación con pGSV71, tal como se describe en el Ejemplo 1.

50 Unas plantas de algodón o un material de plantas, que comprenden EE-GH1, se puede(n) identificar de acuerdo con el protocolo de identificación por PCR que se ha descrito para EE-GH1 en el Ejemplo 4 del presente texto. Dicho brevemente, un ADN genómico de algodón es amplificado por PCR usando un cebador que reconoce específicamente a una secuencia situada dentro de la secuencia flanqueadora en 5' o 3' de EE-GH1, particularmente el cebador que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 2, y un cebador que reconoce una secuencia en el ADN ajeno, particularmente el cebador con la secuencia de la SEQ ID NO: 3. Unos cebadores de ADN de algodón endógenos se utilizan como testigos. Si el material de las plantas proporciona un fragmento con una longitud de entre 250 y 290 pb, de manera preferible de aproximadamente 269 pb, se determina que la planta de algodón
55 alberga el suceso de élite EE-GH1.

Las plantas que albergan el EE-GH1 se caracterizan por su tolerancia al glufosinato, que en el contexto del presente invento incluye el hecho de que las plantas son tolerantes al herbicida Liberty®. La tolerancia al Liberty® se puede ensayar de diferentes maneras. El método de pintura de hojas que aquí se describe, es sumamente útil si se desea identificar plantas tanto resistentes como sensibles, pero no se quiera aniquilar a las que sean sensibles. Alternativamente, la tolerancia se puede ensayar mediante aplicación por atomización de Liberty®. Los tratamientos de atomización deberían hacerse entre los estadios de hojas V3 y V4 para obtener los mejores resultados. Unas plantas tolerantes son caracterizadas por el hecho de que una atomización de las plantas con por lo menos 200 gramos de ingrediente activo/hectárea (g de i.a./ha) preferiblemente 400 g de i.a./ha, y posiblemente hasta 1.600 g de i.a./ha (4X (veces el régimen de campo normal), no aniquila a las plantas. Una aplicación por esparcimiento deberá efectuarse con un régimen de 28-34 oz (onzas) de Liberty®. Lo mejor es aplicar a un volumen de 20 galones de agua por acre usando una boquilla de tipo de ventilador plano mientras que se tiene cuidado de no dirigir las aplicaciones por atomización directamente dentro del verticilo de las plantas para evitar una quemadura por agente tensioactivo en las hojas. El efecto herbicida debería aparecer en el transcurso de 48 horas y ser claramente visible en el transcurso de 5-7 días.

- 15 Las plantas que albergan el EE-GH1 pueden ser caracterizadas adicionalmente por la presencia en sus células de la fosfinotricina acetil transferasa, tal como se determina por un ensayo con PAT (De Block y colaboradores 1987, anteriormente).

Las plantas que albergan el EE-GH1 se pueden obtener, por ejemplo, a partir de semillas depositadas en el ATCC bajo el número de acceso PTA-3343, que contienen 50 % de almendras que son hemicigólicas para el suceso de élite. Dichas plantas pueden ser propagadas adicionalmente para introducir el suceso de élite del invento en otros cultivares de la misma especie de plantas. Las semillas seleccionadas obtenidas a partir de estas plantas contienen el suceso de élite incorporado establemente en su genoma. El invento se relaciona además con las plantas derivadas del número de acceso al ATCC PTA-334, que comprende EE-GH1. El término "derivadas de" indica aquí que las plantas están relacionadas, es decir que ellas son ambas una progenie (directa o de dos o más generaciones) del mismo transformante por cruzamiento.

Las plantas que albergan el EE-GH1 son caracterizadas también por tener unas características agronómicas que son comparables a las de variedades de algodón que están comercialmente disponibles en los EE.UU., en la ausencia de presión de malezas y del uso de Liberty® para la represión de malezas. Se ha observado que la presencia de un ADN ajeno en la región de inserción del genoma de la planta de algodón que aquí se describe confiere unas características fenotípicas y moleculares particularmente interesantes a las plantas que comprenden este suceso. Más específicamente, la presencia del ADN ajeno en esta región particular en el genoma de estas plantas, da como resultado unas plantas que presentan una expresión fenotípica estable del gen interesante sin comprometer de una manera significativa a ningún aspecto del deseado comportamiento agronómico de las plantas. Por lo tanto, se muestra que la región de inserción, que corresponde a una secuencia que comprende el ADN de la planta de las SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO: 4, más particularmente una secuencia que corresponde a la SEQ ID NO: 5, de manera sumamente particular el sitio de inserción de EE-GH1 aquí, es particularmente idónea para la introducción de uno (o varios) gen(es) interesante(s). Más particularmente, la región de inserción de EE-GH1 (que corresponde a una secuencia de ADN de por lo menos 40 pb en el genoma del algodón dentro de la SEQ ID NO: 5), o una secuencia de por lo menos 40 pb que se hibrida en condiciones rigurosas con el complemento de la secuencia de la SEQ ID NO: 5, es particularmente idónea para la introducción de un ADN ajeno que comprende un gen de tolerancia a un herbicida, asegurando la expresión de cada uno de estos genes en la planta sin comprometer al comportamiento agronómico.

Una molécula de ADN recombinante puede ser introducida específicamente en una región de inserción por métodos de inserción dirigidos a unas dianas. Dichos métodos son bien conocidos para los expertos en la especialidad y comprenden, por ejemplo una recombinación homóloga, usando una recombinasa, tal como, pero sin limitarse a, la recombinasa FLP procedente de *Saccharomyces cerevisiae* (solicitud PCT publicada, documento WO 99/25821), la recombinasa CRE procedente del fago P1 de *Escherichia coli* (solicitud PCT publicada, documento WO 99/25840), la recombinasa procedente de pSR1 de *Saccharomyces rouxii* (Araki y colaboradores 1985, J Mol Biol 182:191-203), el sistema Gin/gix del fago Mu (Maeser y Kahlmann, 1991, Mol Gen Genetics 230:170-176) o el sistema de recombinación del fago lambda (tal como se describe en la patente de los EE.UU. 4.673.640).

Tal como se usa aquí, el concepto de "identidad entre secuencias" con respecto a las secuencias de nucleótidos (ADN o ARN), se refiere al número de posiciones con nucleótidos idénticos, dividido por el número de nucleótidos en la más corta de las dos secuencias. La alineación de las dos secuencias de nucleótidos es realizada por el algoritmo de Wilbur y Lipmann (Wilbur y Lipmann, 1983, Proc Nat Acad Sci USA 80:726) utilizando un tamaño de ventana de 20 nucleótidos, una longitud de palabra de cuatro nucleótidos y una penalidad por intersticio de 4. Un análisis ayudado por ordenador y una interpretación de los datos de secuencias, que incluye una alineación de secuencias como se ha descrito anteriormente, se puede realizar convenientemente p.ej. usando los programas del Paquete de Wisconsin (procedente del Genetics Computer Group, Inc). Las secuencias son indicadas como "esencialmente similares" cuando tales secuencias tienen una identidad entre secuencias de por lo menos aproximadamente 75 %, de manera particular de por lo menos aproximadamente 80 %, de manera más particular por lo menos de aproximadamente 85 %, de manera absolutamente particular de aproximadamente 90 %, de manera especial de

aproximadamente 95 %, de manera más especial aproximadamente 100 % y de manera absolutamente especial son idénticas. Está claro que cuando se afirma que unas secuencias de ARN son esencialmente similares o tienen un cierto grado de identidad entre secuencias con unas secuencias de ADN, se considera que la timina (T) en la secuencia de ADN es igual a uracilo (U) en la secuencia de ARN. El término “complementario con”, como se usa en el presente texto, se refiere a la complementariedad entre A y T (U) y entre los nucleótidos G y C en secuencias de nucleótidos.

Como se usa en el presente texto, una “muestra biológica” es una muestra de una planta, de un material de planta o de productos que comprenden el material de planta. Se pretende que el término “planta” abarque tejidos de plantas de algodón (tal como pero sin limitarse a *Gossypium hirsutum*), en cualquier estadio de madurez, así como cualesquiera células, tejidos u órganos que se toman o derivan de dichas plantas incluyendo, sin limitación, cualesquiera semillas, hojas, tallos, flores, raíces, células únicas, gametos, cultivos de células, cultivos de tejidos o protoplastos. El concepto de “material de planta” tal como se usa aquí, se refiere a un material que se obtiene o se deriva de una planta. Los productos que comprenden el material de planta se refieren a piensos, alimentos u otros productos que se producen usando el material de planta o pueden ser contaminados por el material de planta. Se entiende que, en el contexto del presente invento, dichas muestras biológicas se ensayan preferiblemente para descubrir la presencia de ácidos nucleicos específicos para EE-GH1, que implican la presencia de ácidos nucleicos en las muestras. Por lo tanto, los métodos aquí citados para identificar un suceso de élite EE-GH1 en muestras biológicas se relacionan preferiblemente con la identificación en muestras biológicas de unos ácidos nucleicos que comprenden el suceso de élite.

Como se usa en el presente texto, el término “comprenden” ha de ser interpretado como que especifica la presencia de las características, partes integrantes, estadios o componentes señalados que aquí se refieren, pero no excluyen la presencia o adición de una o más características, partes integrantes, estadios o componentes, o grupos de las mismas. Por lo tanto p.ej. un ácido nucleico o una proteína que comprende una secuencia de nucleótidos o de aminoácidos, puede comprender más nucleótidos o aminoácidos que los realmente citados, es decir puede estar embebido/a en un ácido nucleico o una proteína mayor. Un gen quimérico que comprende una secuencia de ADN que está definida funcional o estructuralmente, puede comprender secuencias de ADN adicionales, etec.

Los siguientes ejemplos describen el desarrollo y las características de plantas de algodón que albergan los sucesos de élite EE-GH1 así como el desarrollo de herramientas para la identificación de un suceso de élite EE-GH1 en muestras biológicas.

A menos que se señale otra cosa distinta, todas las técnicas de ADN recombinante se llevan a cabo de acuerdo con protocolos normalizados tal como se describen en Sambrook y colaboradores (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY y en los Volúmenes 1 y 2 de Ausubel y colaboradores (1994) *Current Protocols in Molecular Biology* [Protocolos actuales en biología molecular], Current Protocols, EE.UU. Unos materiales y métodos normalizados para el trabajo molecular en plantas se describen en *Plant Molecular Biology Labfax* (1993) por R.D.D. Croy publicado por BIOS Scientific Publications Ltd (Reino Unido) y por Blackwell Scientific Publications.

En la memoria descriptiva y en los ejemplos se hace referencia a las siguientes secuencias:

SEQ ID NO: 1: secuencia que comprende la región flanqueadora en 5'
 SEQ ID NO: 2: cebador GHI06
 SEQ ID NO: 3: cebador GHI05
 SEQ ID NO: 4: secuencia que comprende la región flanqueadora en 3'
 SEQ ID NO: 5: región de inserción
 SEQ ID NO: 6: plásmido pGSV71
 SEQ ID NO: 7: plásmido pRVA44
 SEQ ID NO: 8: cebador MDB327
 SEQ ID NO: 9: cebador MLD015
 SEQ ID NO: 10: cebador MLD016
 SEQ ID NO: 11: cebador MDB612
 SEQ ID NO: 12: cebador MDB053
 SEQ ID NO: 13: cebador MDB356
 SEQ ID NO: 14: cebador DPA017
 SEQ ID NO: 15: cebador MLD019
 SEQ ID NO: 16: secuencia que comprende la supresión de un sitio diana
 SEQ ID NO: 17: cebador GHI01
 SEQ ID NO: 18: cebador GHI02

EJEMPLOS**Ejemplo 1: Transformación de algodón con un gen de tolerancia a un herbicida****1.1. Construcción del ADN quimérico que comprende el gen *bar* bajo el control de un promotor constitutivo**

5 Se construyó un plásmido pGSV71 siguiendo unos procesos normalizados. La secuencia de los elementos genéticos del plásmido pGSV71 se indica en la tabla 1 (SEQ ID NO: 6):

Tabla 1: Posiciones de nucleótidos (Nt) de los elementos genéticos en pGSV71

Posiciones de Nt	Abreviatura	Descripción y referencias
198-222	-	Repetición en el borde derecho a partir del ADN TL procedente de pTiB6S3 (Gielen y colaboradores 1984, EMBO J. 3:835-846)
223-249	-	Poliengarzador
250-1.634	P35S3	Promotor del ARN de 35S del virus del mosaico de la coliflor (Odell y colaboradores, (1985), Nature 313: 810-812)
1.635-2.186	<i>bar</i>	Secuencia codificadora que codifica la fosfinotricina acetil transferasa procedente de <i>Streptomyces hygrosopicus</i> (Thompson y colaboradores, (1987) EMBO J. 6: 2519-2523). Los dos codones terminales de N de la región codificadora del gen <i>bar</i> de tipo silvestre han sido sustituidos por los codones ATG y GAC respectivamente
2.187-2.205	-	Poliengarzador
2.206-2.465	3'nos	Un fragmento TaqI de 260 pb procedente de la región no traducida en 3' del gen de nopalina sintasa que se origina a partir del ADN T de pTiT37 (Depicker y colaboradores 1982, J. Mol. Appl. Genet. 1: 561-573)
2.466-2.519	-	Poliengarzador
2.520-2.544	-	Repetición en el borde izquierdo a partir del ADN TL procedente de pTiB6S3 (Gielen y colaboradores, 1984, EMBO J. 3:835-846)

1.2. Transformación de *Gossypium hirsutum*

10 Un tejido de algodón procedente de plantas Coker312 fue transformado con pGSV71 usando una transformación con *Agrobacterium transformation* (documento US 5.986.181) y regenerado para formar plantas sobre unos medios apropiados.

Las pequeñas plántulas iniciadas sobre los medios de regeneración selectiva fueron transferidas a un nuevo medio para la germinación (todo el medio está exento de hormonas). Las plántulas fueron luego transferidas a las cámaras de crecimiento o a los invernaderos.

15 La selección se realizó sobre fosfinotricina (PPT) en todas las etapas excepto la regeneración de las plántulas, que se realizó en la ausencia de PPT para acelerar el crecimiento. Esto dio como resultado un conjunto de transformantes primarios (plantas de la generación T0).

Ejemplo 2: Desarrollo de sucesos**2.1. Desarrollo de linajes que son portadores del rasgo de suceso**

20 Unos vástagos T0 fueron transferidos a la tierra de un invernadero y las plantas fueron escrutadas en cuanto a la tolerancia al glufosinato y en cuanto a la presencia de la enzima PAT con un sistema PAT ELISA (de Steffens Biotechnische Analysen GmbH, Ebringen, Alemania).

25 Unas plantas T1 hasta T3 se hicieron crecer en el invernadero y se ensayaron en cuanto a tolerancia al Liberty® a un régimen de 2x (por atomización de 56 onzas/hectárea). Las plantas positivas fueron ensayadas en cuanto a la expresión del gen *bar* usando el ensayo Pat que ha sido descrito por Deblock y colaboradores 1987 (EMBO J. 6:2513-2518).

La presencia del ADN ajeno y el número de copias se comprobaron mediante un análisis de transferencia de borrón Southern. El ADN genómico total fue aislado a partir de 1 g de tejido de hoja de acuerdo con el método CETAB de Doyle y colaboradores (1987, Phytochem. Bull. 19:11) y fue digerido con la enzima de restricción EcoRI.

30 Se usaron unas sondas tales como las siguientes para análisis Southern:

Sonda "bar": material digerido con KpnI-BglII de 474 pb del plásmido pDE110 (WO 92/09696)

Sonda "35S": material digerido con NcoI-MunI de 892 pb del plásmido pRVA44 (SEQ ID NO: 7)

- 5 Unas plantas T2 fueron evaluadas también en cuanto a características fenotípicas generales en comparación con los linajes isogénicos no transgénicos. En posteriores generaciones, se seleccionaron los linajes para los que no observaron penalidades negativas sobre el fenotipo o el comportamiento agronómico por la presencia del transgén o bien en una condición hemicigótica o en una condición homocigótica, en comparación con tipos silvestres.

Un material T4 se hizo crecer en el campo y se ensayó en condiciones de campo abierto en cuanto a tolerancia a Liberty® de acuerdo con diferentes programas.

- 10 En posteriores generaciones, unas plantas fueron comparadas con variedades comerciales en cuanto al rendimiento, la calidad de las fibras y los datos de cartografiado de las plantas. Se evaluaron unas características agronómicas, tales como la altura de las plantas, la altura hasta los nodos, la altura hasta la retención de cápsulas, la posición, el vigor, la longitud de las fibras, las fibras, la resistencia de las fibras y el rendimiento de plumones.

- 15 Se determinó que un suceso se comportaba de igual manera o mejor que las comprobaciones comparables y que para este suceso el rendimiento era dependiente del contexto genético en lugar de la presencia del transgén.

2.2. Selección de un suceso de élite

Este proceso de selección proporcionó un suceso de élite que presentaba una expresión óptima del gen 35S-bar es decir tolerancia al glufosinato amonio sin penalidad sobre el comportamiento agronómico ni el rendimiento. Este suceso de élite fue denominado EE-GH1.

- 20 **2.3. Ensayo de EE-GH1 en variedades de algodón con diferentes contextos genéticos y en diferentes lugares**

El suceso seleccionado fue introducido dentro de diferentes contextos genéticos comerciales, incluyendo los FM989, FM832, FM958 y FM966 y se compararon los resultados de pruebas en el campo de cuatro diferentes lugares. Las plantas fueron atomizadas con 1.600 g de i.a./ha, usando diferentes tratamientos (1x estadio de hojas 3-5, 4x, estadio de hojas 3-5, 1x+1x, estadio de hojas 3-5, 4x+4x, estadio de hojas 3-5, 0 como testigo).

- 25 La calificación del brote y del vigor de las plántulas para el suceso de élite fue muy buena.

No se observó jamás ningún daño visible como un resultado de la aplicación de un herbicida después de la aplicación, independientemente del régimen o del estadio de desarrollo en el momento de la aplicación. No hubo efectos perjudiciales sobre la morfología ni sobre el hábito de crecimiento de las plantas por la aplicación de herbicidas.

- 30 Además, el suceso tenía una morfología normal de las hojas, flores y cápsulas, una excelente fertilidad, y no mostró ninguna enfermedad ni susceptibilidad anormal a los insectos en múltiples contextos genéticos. Durante una introgresión en contextos genéticos múltiples no se observaron problemas anómalos ni anomalías a lo largo de cuatro generaciones.

2.4. Análisis genético del locus

- 35 La estabilidad genética del inserto para el suceso EE-GH1 se comprobó mediante un análisis molecular y fenotípico en las plantas de progenies a lo largo de varias generaciones.

Los análisis de transferencias de borrón Southern de plantas de las generaciones T1, T2 y T3 se compararon en cuanto al suceso EE-GH1. Se encontró que las pautas obtenidas eran idénticas en las diferentes generaciones. Esto prueba que la configuración molecular del ADN ajeno en el EE-GH1 era estable.

- 40 El suceso EE-GH1 presentó una segregación de Mendel para el transgén como un único locus genético en por lo menos tres generaciones subsiguientes, indicando que el inserto es estable.

Ejemplo 3: Caracterización del suceso de élite EE-GH1

3.1. Análisis molecular y genético en profundidad del locus

- 45 Una vez que el suceso EE-GH1 fue identificado como el suceso en el que era óptima/o la expresión del transgén así como el comportamiento agronómico global, el locus del transgén fue analizado con detalle a un nivel molecular. Esto incluía la secuenciación de las regiones flanqueadoras del transgén.

La secuencia de las regiones que flanqueaban al transgén insertado en el suceso EE-GH1 se determinó usando el protocolo TAIL-PCR como se ha descrito por Liu y colaboradores (1995, Plant J. 8(3): 457-463).

a) Determinación de la región flanqueadora en 5'

Los cebadores usados fueron:

		Secuencia (5' → 3')	Posición en pGSV71
Cebador degenerado	MDB327	NTg.Agg.WTC.NWg.TSA.T (SEQ ID NO: 8)	-
TAIL primario	MLD015	Tgg.TTC.CTA.gCg.TgA.gCC.AgT.g (SEQ ID NO: 9)	606→585
TAIL secundario	MLD016	AgC.TgC.TgC.TCT.TgC.CTC.TgT (SEQ ID NO: 10)	467→447
TAIL terciario	GHI05	ggA.CCg.TTA.TAC.ACA.ACg.Tag (SEQ ID NO: 3)	358→338
En que: N = A,C,T o g; S = C o g; W =A o T			

5 El fragmento amplificado usando MDB327-GHI05 era de aproximadamente 1.200 pb que se había secuenciado (flanco 5': SEQ ID NO: 1). La secuencia situada entre pb 1 y pb 677 comprendía el ADN de la planta, mientras que la secuencia situada entre pb 678 y pb 850 correspondía al ADN de pGSV71.

b) Determinación de la región flanqueadora en 3'

10 Los cebadores usados fueron:

		Secuencia (5' → 3')	Posición en pGSV71
Cebador degenerado	MDB612	NgT.gCT.SWg.ANA.WgA.T (SEQ ID NO: 11)	-
TAIL primario	MDB053	CAT.gAC.gTg.ggT.TCC.Tgg.Cag.C (SEQ ID NO: 12)	2.109-2.130
TAIL secundario	MDB356	AAT.CCT.gTT.gCC.ggT.CTT.gCg (SEQ ID NO: 13)	2.252-2.272
TAIL terciario	DPA017	gAT.TAg.AgT.CCC.gCA.ATT.ATA.C (SEQ ID NO: 14)	2.362-2.383
En que: N = A,C,T o g; S = C o g; W = A o T			

El fragmento amplificado usando MDB612-DPA017 era de aproximadamente 400 pb, cuya secuencia completa fue determinada (SEQ ID NO: 4). La secuencia entre los nucleótidos 1 y 179 corresponde al ADN T, mientras que la secuencia entre los nucleótidos 180 y 426 corresponde al ADN de la planta.

15 c) Identificación de la supresión del sitio diana

Usando unos cebadores correspondientes a secuencias situadas dentro de las regiones flanqueadoras del transgén del *Gossypium hirsutum* de tipo silvestre como un molde, se identificó el sitio de inserción del transgén.

Se usaron los siguientes cebadores

	Secuencia (5' → 3')	Posición en el flanco 5' (SEQ ID NO: 1)	Posición en el flanco 3' (SEQ ID NO: 4)
GHI06	TTg.CAC.CAT.CTA.gCT.CAC.TC (SEQ ID NO: 2)	815 → 795	-----
MLD019	CAA.gAt.gCg.AgC.AAC.TAT.gT (SEQ ID NO: 15)	285 → 266	

20 Esto proporcionó un fragmento de 200 pb (SEQ ID NO: 16) en el que los pb 85 hasta 122 corresponden a una supresión de sitio diana. Por lo tanto la región de inserción (SEQ ID NO: 5) tal como se secuenció comprende:

1-677:	región flanqueadora en 5'	pb 1 hasta 677 de la SEQ ID NO: 1
678-714:	supresión del sitio diana	pb 85 hasta 122 de la SEQ ID NO: 16
715-916:	región flanqueadora en 3'	pb 180 hasta 426 de la SEQ ID NO: 4

25 3.2. Análisis genético del locus

La estabilidad genética del inserto se comprobó mediante análisis moleculares y fenotípicos en las plantas de progeñie a lo largo de varias generaciones.

30 Se compararon los análisis de transferencia de borrar Southern en plantas tolerantes al glufosinato de plantas de algodón con EE-GH1 de las generaciones T₀, T₁ y T₂ y se encontró que eran idénticas. Esto prueba que la configuración molecular del transgén en plantas que contienen EE-GH1 era estable.

El suceso EE-GH1 presentó una segregación de Mendel para el transgén como un único locus genético en por lo menos tres subsiguientes generaciones, indicando que el inserto era estable.

Sobre la base de los resultados anteriores, el EE-GH1 fue identificado como un suceso de élite.

Ejemplo 4: Desarrollo de herramientas de diagnóstico para el control de la identidad

Un protocolo de identificación por PCR del suceso de élite EE-GH1 se desarrolló hasta alcanzar la identidad en presencia de EE-GH1 en plantas, en el material de las plantas o en muestras biológicas.

5 Protocolo de identificación por reacción en cadena de la polimerasa del suceso de élite EE-GH1

Una tanda de ensayo con todos los testigos o elementos de control apropiados ha de ser realizada antes de intentar escrutar partes desconocidas. El protocolo presentado puede requerir una optimización en cuanto a unos componentes que pueden diferir entre laboratorios (preparación del ADN de molde, polimerasa de ADN Taq, calidad de los cebadores, los dNTP's, el termociclador, etc).

10 Una amplificación de la secuencia endógena desempeña un cometido clave en el protocolo. Se ha de alcanzar condiciones de PCR y de termociclación que amplifiquen unas cantidades equimolares tanto de la secuencia endógena como de la secuencia transgénica en un molde de ADN genómico transgénico conocido. Cuando el fragmento endógeno establecido como diana no es amplificado o cuando las secuencias establecidas como dianas no son amplificadas con las mismas intensidades de tinción con bromuro de etidio, tal como se juzgaba mediante
15 electroforesis en gel de agarosa, se puede requerir una optimización de las condiciones de PCR.

ADN de molde

El ADN de molde se prepara de acuerdo con el método CTAB descrito por Doyle y Doyle (1987, Phytochem. Bull. 19: 11). Cuando se usa un ADN preparado con otros métodos, debería realizarse una tanda de ensayo utilizando
20 diferentes cantidades del molde. Usualmente 50 ng de un ADN de molde genómico proporcionan los óptimos resultados.

Testigos positivos y negativos asignados

Los siguientes testigos positivos y negativos deberían ser incluidos en una tanda de PCR:

- Testigo Master Mix (testigo negativo de ADN). Éste es una PCR en la cual no se añade ADN a la reacción. Cuando se observa el resultado esperado, es decir inexistencia de productos de la PCR, esto indica que el
25 cóctel de PCR no estaba contaminado con el ADN diana.
- Un testigo positivo de ADN (muestra de ADN genómico que se conoce como que contiene las secuencias transgénicas). Una amplificación con éxito de este testigo positivo demuestra que la PCR se realizó en unas condiciones que permiten la amplificación de secuencias dianas.
- Un testigo de ADN de tipo silvestre. Ésta es una PCR en la que el ADN de molde proporcionado es un ADN
30 genómico preparado a partir de una planta no transgénica. Cuando se observa el resultado esperado, es decir ninguna amplificación del producto de la PCR del transgén sino una amplificación del producto de la PCR endógeno, esto indica que no hay una amplificación detectable del contexto del transgén en una muestra del ADN genómico.

Cebadores

35 Se usan los siguientes cebadores que específicamente reconocen al transgén y a una secuencia flanqueadora de EE-GH1

Cebador	Secuencia (5' → 3')	Diana
GHI05	ggA.CCg.TTA.TAC.ACA.ACg.Tag (SEQ ID NO: 3)	Secuencia de pGSV71
GHI06	TTg.CAC.CAT.CTA.gCT.CAC.TC (SEQ ID NO: 2)	Secuencia de ADN de la planta

40 Unos cebadores que tienen como diana una secuencia endógena se incluyen siempre en el cóctel de PCR. Estos cebadores sirven como un testigo interno en muestras desconocidas y en el testigo positivo de ADN. Un resultado positivo con el par de cebadores endógenos demuestra que hay un ADN amplio de calidad adecuada en la preparación del ADN genómico para un producto de PCT que se ha de generar. Los cebadores endógenos usados son:

GHI01: 5'-AAC.CTA.ggC.TgC.TgA.Agg.AgC-3' (SEQ ID NO: 17)
 (gen de alcohol deshidrogenasa nº de acceso: AF036569, 1070 →1090)
 GHI02: 5'-CAA.CTC.CTC.CAg.TCA.TCT.CCg-3' (SEQ ID NO: 18)
 (gen de alcohol deshidrogenasa nº de acceso : AF036569, 1515 →1495)

5

Fragmentos amplificados

Los fragmentos amplificados esperados en la reacción de PCR son

10 Para el par de cebadores GHI01-GHI02: 445 pb (testigo endógeno)
 Para el par de cebadores GHI05-GHI06: 269 pb (suceso de élite EE-GH1)

Condiciones de la PCR

La mezcla de PCR para reacciones de 50 µl contiene:

15 5 µl de ADN de molde
 5 µl de 10x tampón de amplificación, suministrado con la polimerasa de Taq)
 1 µl de dNTP's 10 mM
 0,5 µl de GHI01 (10 picomoles/µl)
 0,5 µl de GHI02 (10 picomoles/µl)
 20 1 µl de GHI05 (10 picomoles/µl)
 1 µl de GHI06 (10 picomoles/µl)
 0,2 µl de polimerasa de ADN Taq (5 unidades/µl)
 agua hasta 50 µl.

El perfil de termociclación que se ha de seguir para obtener resultados óptimos es el siguiente.

25

4 min. a 95°C
 Seguido por : 1 min. a 95°C
 1 min. a 57°C
 2 min. a 72°C
 Durante 5 ciclos
 Seguido por: 30 seg. a 92°C
 30 seg. a 57°C
 1 min. a 72°C
 Durante 25 ciclos
 Seguido por: 8 minutos a 72°C

Análisis con un gel de agarosa

Entre 0 y 20 µl de las muestras para PCR deberían aplicarse sobre un gel de agarosa al 1,5 % (tampón de Tris-borato) con un apropiado marcador del peso molecular (p.ej. la escalera de 100 pb de PHARMACIA).

30 Validación de los resultados

35 Los datos procedentes de muestras de ADN de una planta transgénica dentro de una única tanda de PCR y un único cóctel de PCR no deberían ser aceptables a menos que 1) el testigo positivo de ADN muestre los esperados productos de la PCR (fragmentos transgénicos y endógenos), 2) el testigo negativo de ADN sea negativo para una amplificación por PCR (no hay fragmentos) y 3) el testigo de ADN de tipo silvestre muestre el resultado esperado (amplificación de fragmentos endógenos).

40 Unas pistas que muestran cantidades visibles de los productos de la PCR transgénicos y endógenos con los tamaños esperados indican que la correspondiente planta. a partir de la cual se había preparado el ADN de molde genómico, ha heredado el suceso de élite EE-GH1. Las pistas que no muestran cantidades visibles del producto de la PCR transgénico y que muestran cantidades visibles del producto de la PCR endógeno indican que la correspondiente planta. a partir de la que se había preparado el ADN de molde genómico, no comprende el suceso de élite. Unas pistas que no muestran cantidades visibles de los productos de PCR endógenos y transgénicos, indican que la calidad y/o la cantidad del ADN genómico no permiten que se genere un producto de la PCR. Estas plantas no pueden ser calificadas. La preparación del ADN genómico debería repetirse, y ha de realizarse una nueva tanda de PCR, con los testigos apropiados.

Uso de un protocolo de PCR discriminador para identificar EE-GH1

Un material de hojas de algodón procedentes de plantas que comprenden diferentes sucesos transgénicos (muestras 1 hasta 4) se ensayó de acuerdo con el protocolo antes descrito. Unas muestras procedentes de un algodón de tipo silvestre se tomaron como testigos negativos.

- 5 Los resultados de los análisis de PCR se ilustran en la Figura 1. Se reconoce que la muestra 1 que comprende el suceso de élite EE-GH1. Todos los otros linajes ensayados no comprenden este suceso de élite.

Ejemplo 5: Introgresión de EE-GH1 dentro de cultivares preferidos

El suceso de élite EE-GH1 es introducido por cruzamiento de retorno repetido dentro de los siguientes cultivares de algodón comerciales FM5013, FM5015, FM5017, FM989, FM832, FM966 y FM958.

- 10 Se observa que la introgresión del suceso de élite dentro de estos cultivares no influye significativamente sobre ninguna de las deseables características fenotípicas o agronómicas de estos cultivares (no hay arrastre de engarces) mientras que la expresión del transgén, tal como se determina por la tolerancia al glufosinato, satisface unos niveles comercialmente aceptables. Esto confirma el estatus del suceso EE-GH1 como un suceso de élite.

- 15 Tal como se usa en las reivindicaciones siguientes, a menos que se indique con claridad otra cosa distinta, se pretende que el término "planta" abarque tejidos de plantas, en cualquier estadio de madurez, así como cualesquiera células, tejidos u órganos que se toman o se derivan de cualquiera de dichas plantas, incluyendo, sin limitación, cualesquiera semillas, hojas, tallos, flores, raíces, células únicas, gametos, cultivos de células, cultivos de tejidos o protoplastos.

- 20 Una semilla de referencia que comprendía el suceso de élite EE-GH1 fue depositada como EE-GH1 en la ATCC (10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209) el 26 de Abril de 2001, bajo el número de acceso a la ATCC PTA-3343.

- 25 Tal como se usa en las reivindicaciones siguientes, a menos que se indique con claridad otra cosa distinta, se pretende que el término "planta" abarque tejidos de plantas, en cualquier estadio de madurez, así como cualesquiera células, tejidos u órganos que se toman o se derivan de cualquiera de dichas plantas, incluyendo, sin limitación, cualesquiera semillas, hojas, tallos, flores, raíces, células únicas, gametos, cultivos de células, cultivos de tejidos o protoplastos.

ES 2 373 434 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Aventis CropScience N.V.

5 <120> Plantas de algodón tolerantes a un herbicida y métodos para producirlas e identificarlas

<130> EE-GH1

<150> US 09/921.922

10 <151> 2001-08-06

<160> 18

<170> PatentIn versión 3.1

15

<210> 1

<211> 850

<212> ADN

<213> Artificial: secuencia que comprende una región flanqueadora en 5'

20

<400> 1

```

aaaggggatg agattgaatg ttaccttate aacaaaagga gttgtagctc atggaacaac      60
aatagctctt tccaecggaaa cctagatgat gttctccaa tgcttgataa atctttaaca      120
ttgtcatcat aagttgcaac ctcattgttc acacaagcat caatcaaatg ttgatcttca      180
ttactaaaat gtgcttgatc cttccttaca caaatctacc tatgttgagg tattttgttc      240
tattcatcat tctaacaagt ttgcaattg agttgaactt cttccaatct cgtatcagcc      300
tataatagtg gggctctaata tgtccatttt tcccacaata atgacatata atctttctaa      360
agcttttatt ctctgcctta tgatgaaaag aacccaaatc ttttaactta acaaaaataa      420
gatgagcgat aggttcttca cctttattga tgtaaccaag tcctctatgg catggttcaa      480
ttctcattga agccaaaatt tcatgaaact tctcacattg gcctctaaac ttcttcaaga      540
tagcctttgc accatctagc tcactcttgg ttgttttcaa aacatcatcc gtttcttggg      600
ccacaatttt gagcttttca ttttctattt tgaggataat agtttattcc ctcaaggaac      660
tattcaactg agcttaacag tactcggccg tcgaccgagg taaccggaat tccaatccca      720
caaaaatctg agcttaacag cacagttgct cctctcagag cagaatcggg tattcaacac      780
cctcatatca actactacgt tgtgtataac ggtccacatg cgggtatata cgatgactgg      840
ggttgtaaaa
    
```

<210> 2

25 <211> 20

<212> ADN

<213> Artificial: cebador GHI06

<400> 2

30 ttgacacatc tagctcactc 20

<210> 3

<211> 21

<212> ADN

35

<213> Artificial: cebador GHI05

ES 2 373 434 T3

<400> 3
ggaccgttat acacaacgta g 21

5 <210> 4
<211> 426
<212> ADN
<213> Artificial: secuencia que comprende una región flanqueadora en 3'

10 <400> 4

gattagagtc	ccgcaattat	acatttaata	cgcgatagaa	aacaaaatat	agcgcgcaaa	60
ctaggataaa	ttatcgcgcg	cggtgtcatc	tatgttacta	gatcgggaag	atcctctaga	120
gtcgacctgc	aggcatgcaa	gcttagatcc	atggagccat	ttacaattga	atatacctc	180
caaatattta	aaaagaatat	caccattatc	cgaatcttct	ttaaaatctg	ttagaacacg	240
gtttggaata	gtggtagtaa	aagtaacata	gttgctcgca	tcttgatcta	cattaaactt	300
tcttcatcac	tccaagtgat	tgtaaatac	ttctatttct	tcttagtatt	agcacattct	360
aattttaagt	gaaacaatcc	cttacattca	taacattgaa	tatccttcta	tcatctcaca	420
gcacga						426

15 <210> 5
<211> 961
<212> ADN
<213> Gossypium hirsutum: región de inserción

<400> 5

aaaggggatg	agattgaatg	ttacctatc	aacaaaagga	gttgtagctc	atggaacaac	60
aatagtcttt	tccacggaaa	cctagatgat	gtttctccaa	tgcttgataa	atctttaaca	120
ttgtcatcat	aagttgcaac	ctcatgttcc	acacaagcat	caatcaaag	ttgatcttca	180
ttactaaaat	gtgcttgatc	cttcttaca	caaatctacc	tatgttgg	tattttgttc	240
tattcatcat	tctaacaagt	tttgcaattg	agttgaactt	cttccaatct	cgtatcagcc	300
tataatagtg	gggtctaata	tgctcatttt	tcccacaata	atgacatata	atctttctaa	360
agcttttatt	ctctgcctta	tgatgaaaag	aacccaaatc	tttaacttta	acaaaaataa	420
gatgagcgat	aggttcttca	cctttattga	tgtaaccaag	tcctctatgg	catggttcaa	480
ttctcattga	agccaaaatt	tcatgaaact	tctcacattg	gcctctaaac	ttcttcaaga	540
tagcctttgc	accatctagc	tcactcttgg	ttgttttcaa	aacatcatcc	gtttcttggg	600
ccacaatttt	gagcttttca	ttttctattt	tgaggataat	agtttattcc	ctcaaggaac	660

ES 2 373 434 T3

tattcaactg agcttaaadc tcaatttttt ttaacatatg actataagta tcctccaaat 720
 atttaaaaag aatataacca ttatccgaat cttctttaa atctgttaga acacggtttg 780
 gaatagtggg agtaaaagta acatagttgc tcgcatcttg atctacatta aactttcttc 840
 atcactccaa gtgattgtaa atgacttcta tttcttctta gtattagcac attctaattt 900
 taagtgaaac aatcccttac attcataaca ttgaatatcc ttctatcacc tcacagcacg 960
 a 961

<210> 6
 <211> 9555
 <212> ADN
 <213> Artificial: plásmido pGSV71

5

<400> 6

agattcgaag ctcgggtcccg tgggtgttct gtcgtctcgt tgtacaacga aatccattcc 60
 cattccgcgc tcaagatggc ttcccctcgg cagttcatca gggctaaatc aatctagccg 120
 acttgtccgg tgaaatgggc tgcactccaa cagaaacaat caaacaacaac tacacagcga 180
 cttattcaca cgcgacaaat tacaacggta tatacctcgc cagtactcgg ccgtcgaccg 240
 cggtagccgg aattccaatc ccacaaaaat ctgagcttaa cagcacagtt gctcctctca 300
 gagcagaatc gggatttcaa caccctcata tcaactacta cgttgtgtat aacgggtccac 360
 atgccgggat atacgatgac tggggttgta caaaggcggc aacaaacggc gttcccggag 420
 ttgcacacaa gaaatttgcc actattacag aggcaagagc agcagctgac gcgtacacaa 480
 caagtcagca aacagacagg ttgaacttca tccccaaagg agaagctcaa ctcaagccca 540
 agagctttgc taaggcccta acaagcccac caaagcaaaa agcccactgg ctacagctag 600
 gaaccaaaag gccagcagc gatccagccc caaaagagat ctcctttgcc ccggagatta 660
 caatggacga tttcctctat ctttacgac taggaaggaa gttcgaagggt gaagggtgacg 720
 acactatggt caccactgat aatgagaagg ttagcctctt caatttcaga aagaatgctg 780
 acccacagat ggtagagag gcctacgcag caggctctcat caagacgac taccagagta 840
 acaatctcca ggagatcaaa taccttccca agaaggtaa agatgcagtc aaaagattca 900
 ggactaattg catcaagaac acagagaaag acatatttct caagatcaga agtactattc 960
 cagtatggac gattcaaggc ttgcttcata aaccaaggca agtaatagag attggagtct 1020
 ctaaaaagggt agttcctact gaatctaagg ccatgcatgg agtctaagat tcaaategag 1080
 gatctaacag aactcgcctg gaagactggc gaacagttca tacagagtct tttacgactc 1140
 aatgacaaga agaaaatctt cgtcaacatg gtggagcacg acactctgggt ctactccaaa 1200
 aatgtcaaag atacagtctc agaagaccaa agggctattg agacttttca acaaaggata 1260

ES 2 373 434 T3

atttcgggaa acctcctcgg attccattgc ccagctatct gtcacttcat cgaaaggaca 1320
 gtagaaaagg aagggtggctc ctacaaatgc catcattgcy ataaaggaaa ggctatcatt 1380
 caagatgcct ctgccgacag tggccccaaa gatggacccc cacccacgag gagcatcgtg 1440
 gaaaaagaag acgttccaac cacgtcttca aagcaagtgg attgatgtga catctccact 1500
 gacgtaaggg atgacgcaca atcccactat ccttcgcaag acccttcctc tatataagga 1560
 agttcatttc atttgagagag gacacgctga aatcaccagt ctctctctat aaatctatct 1620
 ctctctctat aaccatggac ccagaacgac gcccggccga catccgccgt gccaccgagg 1680
 cggacatgcc ggcgggtctgc accatcgtca accactacat cgagacaagc acgggtcaact 1740
 tccgtaccga gccgcaggaa ccgcaggagt ggacggacga cctcgtccgt ctgcgggagc 1800
 gctatccctg gctcgtcgcg gaggtggacg gcgaggtcgc cggcatcgcg tacgcggggc 1860
 cctggaaggc acgcaacgcc tacgactgga cggccgagtc gaccgtgtac gtctcccccc 1920
 gccaccagcg gacgggactg ggctccacgc tctacacca cctgctgaag tccttgagg 1980
 cacagggctt caagagcgtg gtcgctgtca tcgggctgcc caacgacccg agcgtgcgca 2040
 tgcacgaggc gctcggatat gccccccgcy gcctgctgcy ggcggccggc ttcaagcacg 2100
 ggaactggca tgacgtgggt ttctggcagc tggacttcag cctgccggta ccgccccgctc 2160
 cggctcctgcc cgtcaccgag atctgagatc acgcgttcta ggatccgaag cagatcgttc 2220
 aacatttgg caataaagtt tcttaagatt gaatcctgtt gccggctctg cgatgattat 2280
 catataattt ctggtgaatt acgtaagca tgtaataatt aacatgtaat gcatgacgtt 2340
 atttatgaga tgggttttta tgattagagt cccgcaatta tacatttaat acgcgataga 2400
 aaacaaaata tagcgcgcaa actaggataa attatcgcgc gcgggtgtcat ctatgttact 2460
 agatcgggaa gatcctctag agtcgacctg caggcatgca agcttagatc catggagcca 2520
 tttaacaattg aatataatcct gccgccgctg ccgctttgca cccggtgag cttgcatggt 2580
 ggtttctacg cagaactgag ccggttaggc agataatttc cattgagaac tgagccatgt 2640
 gcaccttccc cccaacacgg tgagcgacgg ggcaacggag tgatccacat gggactttta 2700
 aacatcatcc gtcggatggc gttgcgagag aagcagtcga tccgtgagat cagccgacgc 2760
 accgggcagg cgcgcaacac gatcgcaaag tatttgaacg caggtacaat cgagccgacg 2820
 ttcacggtag cggaacgacc aagcaagcta gcttagtaaa gccctcgcta gattttaatg 2880
 cggatgttgc gattacttcg ccaactattg cgataacaag aaaaagccag cctttcatga 2940
 tataatctcc aatttgtgta gggcttatta tgcacgctta aaaataataa aagcagactt 3000
 gatcctgatag tttggctgtg agcaattatg tgcttagtgc atctaacgct tgagttaagc 3060
 cgcgccgcga agcggcgtcg gcttgaacga attgtagac attatttgcg gactaccttg 3120

ES 2 373 434 T3

gtgatctcgc ctttcacgta gtggacaaat tcttccaact gatctgcgcg cgaggccaag 3180
 cgatcttctt cttgtccaag ataagcctgt ctagcttcaa gtatgacggg ctgatactgg 3240
 gccggcagge gctccattgc ccagtcggca gcgacatcct tcggegcat tttgcccgtt 3300
 actgcgctgt accaaaatgcy ggacaacgta agcactacat ttcgctcatc gccagcccag 3360
 tcgggcggcg agttccatag cgttaagggt tcatttagcy cctcaaatag atcctgttca 3420
 ggaaccggat caaagagttc ctccgccgct ggacctacca aggcaacgct atgttctctt 3480
 gcttttgtca gcaagatagc cagatcaatg tcgatcgtgg ctggctcgaa gatacctgca 3540
 agaatgtcat tgcgctgcca ttctccaaat tgcagttcgc gcttagctgg ataacgccac 3600
 ggaatgatgt cgtcgtgcac aacaatggtg acttctacag cgcggagaat ctcgctctct 3660
 ccaggggaag ccgaagtttc caaaaggctc tgatcaaag ctccgccgct tgtttcatca 3720
 agccttacgg tcaccgtaac cagcaaatca atatcactgt gtggcttcag gccgccatcc 3780
 actgcggagc cgtacaaatg tacggccagc aacgtcgggt cgagatggcg ctcgatgacg 3840
 ccaactacct ctgatagttg agtcgatact tcggcgatca ccgcttcctt catgatgttt 3900
 aactttgttt tagggcgact gccctgctgc gtaacatcgt tgctgctcca taacatcaaa 3960
 categaccca cggcgtaacg cgttgctgc ttggatgcc gaggcataga ctgtaccca 4020
 aaaaaacagt cataacaagc catgaaaacc gccactgcgc cgttaccacc gctgcgttcg 4080
 gtcaagggtc tggaccagtt gcgtgagcgc atacgctact tgcattacag cttacgaacc 4140
 gaacaggctt atgtccactg ggttcgtgcc ttcacccgtt tccacgggtg gcgtcaccgc 4200
 gcaaccttgg gcagcagcga agtcgaggca tttctgtcct ggctggcgaa cgagcgcaag 4260
 gtttcggtct ccacgcacgc tcaggcattg gcggccttgc tgttcttcta cggcaagtgc 4320
 tgtgcacgga tctgccctgg cttcaggaga tcggaagacc tcggccgtcc gggcgcttgc 4380
 cggtggtgct gaccccgat gaagtgggtc gcatectcgg ttttctggaa ggcgagcatc 4440
 gtttgttcgc ccagcttctg tatggaacgg gcatgcggat cagtgagggt ttgcaactgc 4500
 gggtaagga tctggatttc gatcacggca cgatcatcgt gcgggagggc aagggtcca 4560
 aggatcgggc cttgatgtta cccgagagct tggcaccag cctgcgagag cagggatcga 4620
 tccaaccctt ccgctgctat agtcagtcg gcttctgacg ttcagtgcag ccgtcttctg 4680
 aaaacgacat gtcgcacaag tcctaagtta cgcgacagge tgccgccctg cccttttctt 4740
 ggcgttttct tgtcgctgtt ttagtcgca taaagtagaa tacttgcgac tagaacggga 4800
 gacattacgc catgaacaag agcggccgcy ctggcctgct gggctatgcc cgcgtcagca 4860
 ccgacgacca ggacttgacc aaccaacggg ccgaactgca cgcggccggc tgcaccaagc 4920

ES 2 373 434 T3

tgttttccga gaagatcacc ggcaccagge gcgaccgccc ggagctggcc aggatgcttg 4980
 accacctacg ccctggcgac gttgtgacag tgaccaggct agaccgcctg gcccgcagca 5040
 cccgcgacct actggacatt gccgagcgca tccaggaggc cggcgcgggc ctgcgtagcc 5100
 tggcagagcc gtgggcccac accaccacgc cggccggccg catggtgttg accgtgttcg 5160
 cgggcattgc cgagttcgag cgttccctaa tcatcgaccg caccgggagc gggcgcgagg 5220
 ccgccaagge ccgaggcgtg aagtttggcc cccgcctac cctcaccg gacagatcg 5280
 cgcacgcccc cgagctgatc gaccaggaag gccgcaccgt gaaagaggcg gctgcactgc 5340
 ttggcgtgca tcgctcgacc ctgtaccgcg cacttgagcg cagcgaggaa gtgacgccc 5400
 ccgaggccag gcggcgcggt gccttccgtg aggacgcatt gaccgaggcc gacgccctgg 5460
 cggccgcccga gaatgaacgc caagaggaac aagcatgaaa ccgcaccagg acggccagga 5520
 cgaaccgttt ttcattaccg aagagatcga ggcggagatg atcgcggccg ggtacgtgtt 5580
 cgagccgccc gcgcacgtct caaccgtgcg gctgcatgaa atcctggccg gtttgtctga 5640
 tgccaagctg gcggcctggc cggccagctt ggccgctgaa gaaaccgagc gccgccgtct 5700
 aaaaagggtga tgtgtatttg agtaaaacag cttgcgtcat gcggtcgctg cgtatatgat 5760
 gcgatgagta aataaaciaa tacgcaaggg gaacgcatag aggttatcgc tgtacttaac 5820
 cagaaaggcg ggtcaggcaa gacgaccatc gcaaccatc tagcccgcgc cctgcaactc 5880
 gccggggccg atgttctgtt agtcgattcc gatccccagg gcagtgcccg cgattggggc 5940
 gccgtgcggg aagatcaacc gctaaccgtt gtcggcatcg accgcccgac gattgaccgc 6000
 gacgtgaagg ccatcggccg gcgcgacttc gtagtgatcg acggagcgcc ccaggcggcg 6060
 gacttggtg tgctccgat caaggcagcc gacttcgtgc tgattccggt gcagccaagc 6120
 ccttacgaca tatgggccac cggcgacctg gtggagctgg ttaagcagcg cattgaggtc 6180
 acggatggaa ggctacaagc ggctttgtc gtgtcgcggg cgatcaaagg cacgcgcatc 6240
 ggcgggtgagg ttgccgaggc gctggccggg tacgagctgc ccattcttga gtcccgtatc 6300
 acgcagcgcg tgagctacc aggcaactgc gccgcccgca caaccgttct tgaatcagaa 6360
 cccgagggcg acgctgcccg cgaggtccag gcgctggccg ctgaaattaa atcaaaactc 6420
 atttgagtta atgaggtaaa gagaaaatga gcaaaagcac aaacacgcta agtgccggcc 6480
 gtccgagcgc acgcagcagc aaggctgcaa cgttggccag cctggcagac acgccagcca 6540
 tgaagcgggt caactttcag ttgccggcgg aggatcacac caagctgaag atgtacgcgg 6600
 tacgccaagg caagaccatt accgagctgc tatctgaata catcgcgag ctaccagagt 6660
aattagcaaa atgaataaat gagtagatga attttagcgg ctaaaggagg cggcatggaa 6720
 aatcaagaac aaccaggcac cgacgcccgtg gaatgccccca tgtgtggagg aacggggcgt 6780

ES 2 373 434 T3

tggccaggcg taagcggctg ggttgtctgc cggccctgca atggcactgg aaccccccaag 6840
 cccgaggaat cggcgtgacg gtcgcaaacc atccggcccc gtacaaatcg gcgcgccgct 6900
 ggggtgatgac ctggtggaga agttgaaggc cgcgcaggcc gccagcggc aacgcatcga 6960
 ggcagaagca cgcgccggtg aatcgtggca agcggccgct gatcgaatcc gcaaagaatc 7020
 ccggcaaccg ccggcagccg gtgcgccgtc gattaggaag ccgccaagg gcgacgagca 7080
 accagatfff ttcgttccga tgetctatga cgtgggcacc cgcgatagtc gcagcatcat 7140
 ggacgtggcc gttttccgtc tgtcgaagcg tgaccgacga gctggcgagg tgatccgcta 7200
 cgagcttcca gacgggcacg tagaggtttc cgcagggccg gccggcatgg ccagtgtgtg 7260
 ggattacgac ctggtactga tggcggtttc ccatctaacc gaatccatga accgataccg 7320
 ggaaggggaag ggagacaagc cgggccgctg gttccgtcca cacgttgccg acgtactcaa 7380
 gttctgccgg cgagccgatg gcggaaagca gaaagacgac ctggtagaaa cctgcattcg 7440
 gttaaacacc acgcacgctg ccatgcagcg tacgaagaag gccaagaacg gccgcctggt 7500
 gacggtatcc gaggggtaag ccttgattag ccgctacaag atcgtaaaga gcgaaaccgg 7560
 gcggccggag tacatcgaga tcgagctagc tgattggatg taccgcgaga tcacagaagg 7620
 caagaaccgg gacgtgctga cggttcacc cgtacttt ttgatcgatc ccggcatcgg 7680
 ccgttttctc taccgcctgg cacgccgcgc cgcaggcaag gcagaagcca gatggttgtt 7740
 caagacgatc tacgaacgca gtggcagcgc cggagagttc aagaagttct gtttcaccgt 7800
 gcgcaagctg atcgggtcaa atgacctgcc ggagtacgat ttgaaggagg aggcggggca 7860
 ggctggcccc atcctagtea tgcgctaccg caacctgatc gagggcgaag catccgccgg 7920
 ttcctaatgt acggagcaga tgctagggca aattgcccta gcaggggaaa aaggctgaaa 7980
 aggtctcttt cctgtggata gcacgtacat tgggaaccca aagccgtaca ttgggaaccg 8040
 gaaccctgac attgggaacc caaagccgta cattgggaac cggtcacaca tgtaagtgac 8100
 tgatataaaa gagaaaaaag gcgatttttc cgcctaaaac tctttaaaac ttattaaaac 8160
 tcttaaaacc cgcctggcct gtgcataact gtctggccag cgcacagccg aagagctgca 8220
 aaaagcgcct acccttcggt cgctgcgctc cctacgcccc gccgcttcgc gtcggcctat 8280
 cgcggccgct ggccgctcaa aatggctgg cctacggcca ggcaatctac cagggcgcgg 8340
 acaagccgcg ccgtcgccac tcgaccgccc gcgcccacat caaggeacc tgccctcgcg 8400
 gtttcgggtga tgacgggtgaa aacctctgac acatgcagct cccggagacg gtcacagctt 8460
 gtctgtaagc ggatgccggg agcagacaag cccgtcaggg cgcgtcagcg ggtgttggcg 8520
 ggtgtcgggg cgcagccatg acccagtcac gtagegatag cggagtgtat actggcttaa 8580

ES 2 373 434 T3

ctatgcggca tcagagcaga ttgtactgag agtgcacccat atgcggtgtg aaataccgca 8640
cagatgcgta aggagaaaat accgcatcag gcgctcttcc gcttcctcgc tcaactgactc 8700
gctgcgctcg gtcggtcggc tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg cggtaatcag 8760
gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaaag gccagcaaaa 8820
ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgcttttc cataggctcc gccccctga 8880
cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga aaccgcacag gactataaag 8940
ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct cctggtccga ccctgccgct 9000
taccggatac ctgtccgctt ttctcccttc ggggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg 9060
ctgtaggtat ctcagttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc 9120
ccccgttcag cccgaccgct gcgccttatc cggtaactat cgtcttgagt ccaaccgggt 9180
aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggta 9240
tgtaggcggg gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac 9300
agtatttggg atctgcgctc tgetgaagcc agttacctc ggaaaaagag ttggtagctc 9360
ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cgggtggtttt tttgtttgca agcagcagat 9420
tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tccggaaaac gcaagcgcaa agagaaagca 9480
ggtagcttgc agtgggctta catggcgata gctagactgg gcggttttat ggacagcaag 9540
cgaaccggaa ttgcc 9555

<210> 7

<211> 4182

5 <212> ADN

<213> Artificial: plásmido pRVA44

<400> 7

tcgcgcttt cggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca 60
cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg 120
ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180
accatacctg caggcaattg gtacctacgt atgcatggcg cgccatatgc ccgggcctg 240
tacagcggcc gcgttcctac gcagcaggtc tcatcaagac gatctaccgg agtaacaatc 300
tccaggagat caaatcctt cccaagaagg ttaaagatgc agtcaaaaaga ttcaggacta 360
attgcatcaa gaacacagag aaagacatat ttctcaagat cagaagtact attccagtat 420
ggacgattca aggcttgctt cataaaacca ggcaagtaat agagattgga gtctctaaaa 480
aggtagttcc tactgaatct aaggccatgc atggagtcta agattcaaat cgaggatcta 540
acagaactcg ccgtgaagac tggcgaacag ttcatacaga gtcttttacg actcaatgac 600

ES 2 373 434 T3

aagaagaaaa tcttcgtaa catggtggag cacgacactc tggctactc caaaaatgtc 660
aaagatacag tctcagaaga ccaaagggct attgagactt ttcaacaaag gataatttcg 720
ggaaacctcc tcggattcca ttgcccagct atctgtcact tcatcgaaag gacagtagaa 780
aaggaaggtg gctcctacaa atgccatcat tgcgataaag gaaaggctat cattcaagat 840
gcctctgccg acagtgggtcc caaagatgga cccccaccca cgaggagcat cgtggaaaaa 900
gaagacgttc caaccacgtc ttcaaagcaa gtggattgat gtgacatctc cactgacgta 960
agggatgacg cacaatccca ctatccttcg caagaccctt cctctatata aggaagtcca 1020
tttcatttgg agaggacacg ctgaaatcac cagtctctct ctataaatct atctctctct 1080
ctataacat ggaccagaa cgacgcccgg ccgacatccg ccgtgccacc gaggcggaca 1140
tgccggcggc ctgcaccatc gtcaaccact acatcgagac aagcacggtc aacttccgta 1200
ccgagccgca ggaaccgag gagtggacgg acgacctcgt ccgtctgagg gagcgtatc 1260
cctggctcgt cgccgaggtg gacggcgagg tcgcccggcat cgcctacggg gcccctgga 1320
aggcacgcaa cgcctacgac tggacggccg agtcgacctg gtacgtctcc ccccgccacc 1380
agcggacggg actgggctcc acgctctaca cccacctgct gaagtccttg gaggcacagg 1440
gcttcaagag cgtggctcgt gtcacgggc tgcceaacga cccgagcgtg cgcacgacg 1500
agcgctcgg atatgcccc cgcgccatgc tgcggggcgg cggcttcaag cacgggaact 1560
ggcatgacgt gggtttctgg cagctggact tcagcctgcc ggtaccgccc cgtccggctc 1620
tgcccgtcac cgagatctga tctcacgctg ctaggatccg aagcagatcg ttcaaacatt 1680
tggcaataaa gtttcttaag attgaatcct gttgccggtc ttgcgatgat tatcatataa 1740
tttctgttga attacgttaa gcatgtaata attaacatgt aatgcatgac gttatttatg 1800
agatggggtt ttatgattag agtcccgcaa ttatacattt aatacgcgat agaaaacaaa 1860
atatagcgcg caaactagga taaattatcg cgcgagggtg catctatgtt actagatcgg 1920
gaagatcctc tagagcgatc gcaagcttgg cgtaateatg gtcatactg tttctgtgt 1980
gaaattgtta tccgctcaca attccacaca acatacgagc cggaagcata aagtgtaaag 2040
cctgggggtgc ctaatgagtg agctaactca cattaattgc gttgcgctca ctgcccgtt 2100
tccagtcggg aaacctgtcg tgccagctgc attaataaat cggccaacgc gcggggagag 2160
gcggtttgcg tattgggctc tcttccgctt cctcgtcac tgactcgtg cgtcggctc 2220
ttcggctgcg gcgagcggta tcagctcact caaaggcggg aatacgggta tccacagaat 2280
caggggataa cgcaggaaag aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta 2340
aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata ggctccgccc cctgacgag catcacaataa 2400
atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac caggcgtttc 2460

ES 2 373 434 T3

cccctggaag ctccctcgtg cgetctcctg ttccgaccct gccgcttacc ggatacctgt 2520
 ccgcctttct cccttcggga agcgtggcgc tttctcaaag ctcacgctgt aggtatctca 2580
 gttcgggtgta ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc gttcagccccg 2640
 accgctgcgc cttatccggt aactatcgtc ttgagtccaa cccggtaaga cacgacttat 2700
 cgccactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcgggtgcta 2760
 cagagttctt gaagtgggtg cctaactacg gctacactag aagaacagta tttgggtatct 2820
 gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac 2880
 aaaccaccgc tggtagcggg ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa 2940
 aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag tggaacgaaa 3000
 actcacgta agggattttg gtcattgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt 3060
 taaattaaat atgaagtttt aatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggctctgaca 3120
 gttaccaatg cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgat ctgtctattt cgttcatcca 3180
 tagttgctg actccccgtc gtgtagataa ctacgatacg ggagggtta ccatctggcc 3240
 ccagtgtgc aatgataccg cgagaccac gctcaccggc tccagattta tcagcaataa 3300
 accagccagc cggaagggcc gagcgcagaa gtggtcctgc aactttatcc gcctccatcc 3360
 agtctattaa ttgttgccgg gaagctagag taagtagttc gccagttaat agtttgcgca 3420
 acgttggtgc cattgctaca ggcacgtgg tgtcacgctc gtcgtttggg atggcttcat 3480
 tcagctccgg ttccaacga tcaaggcgag ttacatgatc ccccatggtg tgcaaaaaag 3540
 cggttagctc cttcggctct ccgatcgttg tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac 3600
 tcatggttat ggcagcactg cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt 3660
 ctgtgactgg tgagtactca accaagtcat tctgagaata gtgtatgcgg cgaccgagtt 3720
 gctcttgccc ggcgtcaata cgggataata ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc 3780
 tcatcattgg aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat 3840
 ccagttcgat gtaaccact cgtgcaccca actgatcttc agcatctttt actttcacca 3900
 gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaagggg ataagggcga 3960
 cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg 4020
 gttattgtct catgagcggg tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg 4080
 ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac ctgacgtcta agaaaccatt attatcatga 4140
 cattaaccta taaaaatagg cgtatcacga ggccctttcg tc 4182

<210> 8
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Artificial: cebador MDB327
 5
 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (1)..(16)
 <223> "n" = a, c, t o g; "s" = c o g; "w" = a o t
 10
 <400> 8
 ntgaggwtcn wgtsat 16
 <210> 9
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial: cebador MLD015
 15
 <400> 9
 tggttcctag cgtgagccag tg 22
 <210> 10
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial: cebador MLD016
 20
 <400> 10
 agctgctgct ctgcctctg t 21
 <210> 11
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Artificial: cebador MDB612
 25
 <220>
 <221> característica diversa
 <222> (1)..(16)
 <223> "n" = a, c, t o g; "s" = c o g; "w" = a o t
 30
 <400> 11
 ngtgctswga nawgat 16
 <210> 12
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial: cebador MDB053
 35
 <400> 12
 catgacgtgg gttctggca gc 22
 <210> 13
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial: cebador MDB356
 40
 <400> 13
 aatcctgttg ccggtctgc g 21
 45
 50
 55

ES 2 373 434 T3

<210> 14
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial: cebador DPA017
 5
 <400> 14
 gattagagtc ccgcaattat ac 22
 <210> 15
 10 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial: cebador MLD019
 <400> 15
 15 caagatgcca gcaactatgt 20
 <210> 16
 <211> 200
 <212> ADN
 20 <213> Artificial: secuencia que comprende una supresión de un sitio diana
 <400> 16

tcttgacca caattttgag cttttcattt tctattttga ggataatagt ttattccctc 60
aaggaactat tcaactgagc ttaatattctc aatttttttt aacatatgac tataagtatc 120
ctccaaatat ttaaaaagaa taccaccatt atccgaatct tctttaaaat ctggttagaac 180
acggtttgga atagtggtag 200
 25 <210> 17
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial: cebador GHI01
 30 <400> 17
 aacctaggct gctgaaggag c 21
 <210> 18
 <211> 21
 35 <212> ADN
 <213> Artificial: cebador GHI02
 <400> 18
 40 caactctcc agtcatctcc g 21

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una planta de algodón transgénica o semillas, células o tejidos de la misma, que comprenden el suceso de élite EE-GH1 en su genoma, comprendiendo una semilla de referencia dicho suceso de élite depositado en la ATCC bajo el número de acceso PTA-3343, que está **caracterizada porque** un fragmento de ADN específico para EE-GH1 con una longitud comprendida entre 250 y 290 pb, puede ser amplificado a partir del ADN genómico de dicha planta de algodón o de las semillas, células o tejidos de la misma, usando una reacción en cadena de la polimerasa con dos cebadores que tienen la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID No 2 y SEQ ID No 3, respectivamente.
2. Una planta de algodón transgénica o semillas, células o tejidos de la misma de acuerdo con la reivindicación 1, en que dicho fragmento de ADN es un fragmento de aproximadamente 269 pb.
- 10 3. Una planta de algodón transgénica o semillas o células de tejidos de la misma, que comprenden el suceso de élite EE-GH1 en su genoma, que se ha obtenido por propagación de y/o crianza con la planta de algodón transgénica de las reivindicaciones 1 ó 2.
- 15 4. Un método para identificar el suceso de élite EE-GH1, comprendiendo la semilla de referencia dicho suceso de élite depositado en la ATCC bajo el número de acceso PTA-3343, en muestras biológicas, cuyo método comprende detectar una región específica para el EE-GH1 con unos cebadores que reconocen específicamente a la región flanqueadora en 5' o a la región flanqueadora en 3' de dicho suceso de élite, comprendiendo dicho método amplificar un fragmento de ADN que tiene un longitud comprendida entre 100 y 350 pb a partir de un ácido nucleico presente en dichas muestras biológicas, usando una reacción en cadena de la polimerasa con por lo menos dos cebadores, un primer cebador reconoce a una secuencia situada entre los nucleótidos 1-677 de la SEQ ID NO: 1 y un segundo cebador reconoce a una secuencia complementaria situada entre los nucleótidos 678-850 de la SEQ ID NO: 1, o un primer cebador reconoce a una secuencia situada entre los nucleótidos 1-179 de la SEQ ID NO: 4 y un segundo cebador reconoce a una secuencia complementaria situada entre los nucleótidos 180-426 de la SEQ ID NO: 4.
- 20 5. El método de la reivindicación 4, en el que dichos cebadores usados en una reacción en cadena de la polimerasa comprenden las SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3.
- 25 6. Un estuche para identificar el suceso de élite EE-GH1, comprendiendo una semilla de referencia dicho suceso de élite depositado en la ATCC bajo el número de acceso PTA-3343, en muestras biológicas, comprendiendo dicho estuche por lo menos dos cebadores de PCR, un primer cebador reconoce a una secuencia situada entre los nucleótidos 1-677 de la SEQ ID NO: 1 y un segundo cebador reconoce a una secuencia complementaria situada entre los nucleótidos 678-850 de la SEQ ID NO: 1, o un primer cebador reconoce a una secuencia situada entre los nucleótidos 1-179 de la SEQ ID NO: 4 y un segundo cebador reconoce a una secuencia complementaria situada entre los nucleótidos 180-426 de la SEQ ID NO: 4.
- 30 7. El estuche de la reivindicación 6, en el que un primer cebador comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 2 y un segundo cebador comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 3.
- 35 8. Una molécula de ADN que puede ser amplificada a partir de una muestra de ácido nucleico de algodón transgénico, que comprende el suceso de élite EE-GH1 en su genoma, comprendiendo una semilla de referencia dicho suceso de élite depositado en la ATCC bajo el número de acceso PTA-3343, usando un conjunto de cebadores, el primero de los cuales comprende una secuencia de 15 a 30 nucleótidos y reconoce a una secuencia situada entre los nucleótidos 1-677 de la SEQ ID NO: 1 y el segundo cebador reconoce a una secuencia complementaria entre los nucleótidos 678-850 de la SEQ ID NO: 1, o un primer cebador reconoce a una secuencia situada entre los nucleótidos 1-179 de la SEQ ID NO: 4 y un segundo cebador reconoce a una secuencia complementaria situada entre los nucleótidos 180-426 de la SEQ ID NO: 4 en dicha muestra de ácido nucleico de algodón.
- 40 9. La molécula de ADN de la reivindicación 8, que puede ser amplificada a partir de la muestra de ácido nucleico de algodón transgénico, usando un conjunto de cebadores, el primero de los cuales comprende la SEQ ID NO: 2 y el segundo de los cuales comprende la SEQ ID NO: 3.
- 45

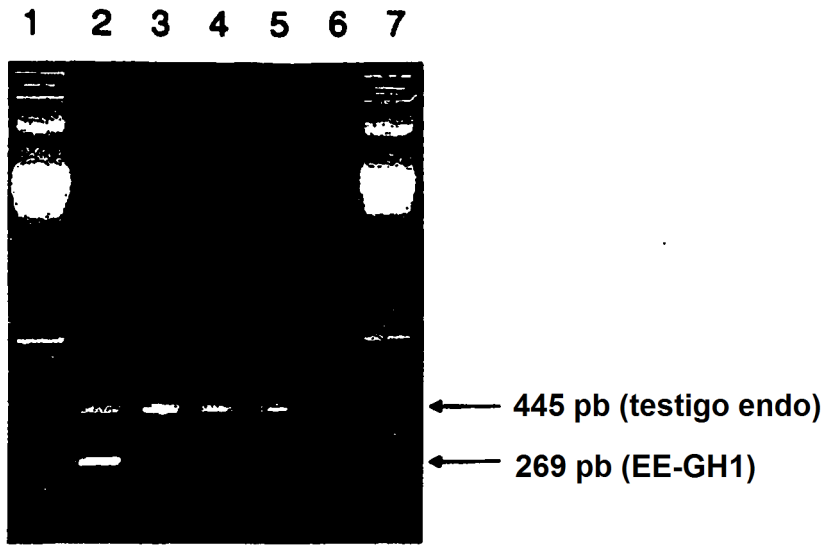


Figura 1