

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 300**

51 Int. Cl.:
C12N 15/09 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/566 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09015931 .0**
96 Fecha de presentación: **06.04.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **2180051**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.04.2010**

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA DETECTAR Y CUANTIFICAR UNA SECUENCIA DE ADN DE TRIGO ENDOGENO.**

30 Prioridad:
09.04.2004 JP 2004115687

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.03.2012

73 Titular/es:
**NISSHIN SEIFUN GROUP INC.
25, KANDA-NISHIKI-CHO 1-CHOME CHIYODA-KU
TOKYO 101-8441, JP y
INCORPORATED ADMINISTRATIVE AGENCY
NATIONAL AGRICULTURE AND FOOD RESEARCH
ORGANIZATION (NARO)**

72 Inventor/es:
**Hino, Akihiro;
Kodama, Takashi;
Iida, Mayu;
Yamakawa, Hirohito;
Nozaki, Satomi y
Hayakawa, Katsuyuki**

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

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).

ES 2 376 300 T3

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para detectar y cuantificar una secuencia de ADN de trigo endógeno

Antecedentes

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para detectar o cuantificar una secuencia de ADN endógeno de trigo en una muestra de ensayo, y se refiere en particular a un procedimiento de detección o cuantificación de ADN de trigo endógeno para usar cuando se determina la velocidad de contaminación de trigo modificado genéticamente contenido en materiales alimentarios o alimentos procesados.

10 En Japón, 50 o más variedades de cultivos modificados genéticamente (de aquí en adelante "OMG"), incluyendo maíz, soja y patatas, han pasado la valoración de seguridad y se han aprobado para importación y venta. Al mismo tiempo, los alimentos que contienen OMG deben etiquetarse como tales de acuerdo con las "Normas de etiquetado para alimentos modificados genéticamente" establecidas por el Ministerio de agricultura, bosques y pesca basado en el artículo 7, párrafo 1 de las "Normas de calidad de etiquetado para alimentos procesados" y el artículo 7, párrafo 1 de las "Normas de calidad de etiquetado para alimentos frescos" (notificación nº 517 del Ministerio de agricultura, bosques y pesca, 31 de marzo de 2000), y la "Aplicación de la ordenanza ministerial que corrige en parte la ordenanza ministerial sobre la aplicación de la ley de sanidad alimentaria, reglamentos y patrones composicionales, etc. para leches y productos lácteos" (Notificación nº 79 del Departamento de sanidad alimentaria, Ministerio de sanidad, trabajo y bienestar, 15 de marzo de 2001).

20 Sin embargo, en otros países, los OMG pueden cultivarse en algunos casos conjuntamente con no OMG una vez se ha completado la evaluación de la seguridad, o puede aparecer contaminación durante el proceso de distribución después de la recolección. Además, los fabricantes de productos alimentarios y similares a menudo subcontratan la fabricación de alimentos procesados en compañías de fabricación, e incluso si estipulan que deben usarse no OMG, si se usan OMG en las plantas de las compañías de fabricación, los alimentos procesados pueden contaminarse por pequeñas cantidades de OMG. En consecuencia, para satisfacer sus obligaciones de etiquetado de productos alimentarios y similares, los productores deben valorar y analizar los productos alimentarios procesados finales para verificar que no están contaminados con OMG.

30 Los procedimientos para detectar OMG en muestras de ensayo de alimentos procesados y sus materiales brutos, etc. incluyen procedimientos de detección de ADN modificado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y procedimientos de detección de proteínas modificadas por ELISA, pero en el caso de alimentos procesados, los OMG deben detectarse por PCR debido a que las proteínas a menudo se han desnaturalizado por el calor o la presión y no pueden detectarse exactamente por ELISA.

35 Los procedimientos de valoración y análisis incluyen los procedimientos descritos en el "JAS Analytical Handbook, Manual of Assessment and Analysis for Genetically Modified Foods", 2ª edición revisada, y los descritos en "Concerning Testing Methods for Foods Modified by Recombinant DNA Technology (revisado parcialmente)" (Notificación nº 0618002 del Departamento de sanidad alimentaria, Ministerio de salud, trabajo y bienestar, 18 de junio de 2003). Estos describen que, en el ensayo y análisis de OMG, es necesario efectuar la PCR usando un par cebador que reconozca el ADN endógeno de cada producto agrícola y verificar que se obtiene un producto de PCR de la longitud esperada, para verificar que el ADN extraído de la muestra de ensayo puede amplificarse mediante PCR. Cuando se cuantifica un OMG contenido en una muestra de ensayo, se usa el procedimiento de medir la velocidad de mezclado del cultivo modificado basándose en la relación de ADN recombinante a ADN endógeno que está siempre presente en ese cultivo.

45 En el caso del maíz, por ejemplo, se han desarrollado pares cebadores que reconocen cada una de las 5 estirpes de OMG aprobados, junto con un par cebador que reconoce la región génica SSIIB de ADN de maíz endógeno ("JAS Analytical Handbook, Manual of Assessment and Analysis for Genetically Modified Foods", 2ª edición revisada, IAA Center for Food Quality, Labeling and Consumer Services). Debido a que este par cebador proporciona el patrón de la cantidad de ADN endógeno en la detección y cuantificación del ADN recombinante, la región de ADN endógeno a amplificar debería estar presente en una sola copia del genoma.

50 En "Concerning Testing Methods for Foods Modified by Recombinant DNA Technology (revisado parcialmente)" (notificación nº 1113001 del Departamento de sanidad alimentaria, Ministerio de salud, trabajo y bienestar, 13 de noviembre de 2003), los productos de amplificación por pares cebadores específicos orientados a ADN de maíz o soja endógeno y a ADN recombinante están ligados con un plásmido y se usan como sustancia patrón. La relación del número de copias de ADN recombinante a número de copias de ADN endógeno puede determinarse exactamente en una muestra de ensayo mediante PCR cuantitativa de tiempo fijo, efectuando la PCR usando esta sustancia patrón.

55 Cuando hay múltiples estirpes de OMG como en el caso del maíz, es una técnica particularmente útil usar una sustancia patrón común para medir la velocidad de contaminación de cada estirpe, lo que puede realizarse usando una sustancia patrón que tiene ADN endógeno y ADN específico de cada estirpe incorporados a un solo ADN circular.

Es generalmente difícil obtener genes específicos de cada estirpe, pero una vez se han incorporado estos al ADN circular, es posible proporcionar un suministro estable de ADN específico de estirpe replicando el ADN circular mismo.

Sumario

5 Aunque ningún producto modificado genéticamente del trigo común (*Triticum aestivum*, de aquí en adelante llamado a veces simplemente "trigo") ha pasado todavía la valoración de seguridad, se espera que aparezcan en el mercado en el futuro próximo. En consecuencia, tienen que desarrollarse procedimientos para detectar y cuantificar ADN de trigo endógeno y pares cebadores de PCR para uso en dichos procedimientos en preparación para la distribución de trigo OMG. En términos de su estructura genómica y la secuencia nucleotídica de sus genes, sin embargo, el trigo
10 comparte un alto grado de homología con otros cereales tales como cebada, centeno y avena. Además del trigo común (*Triticum aestivum*), existe también el trigo duro (*Triticum durum*). El trigo duro comparte un grado particularmente alto de homología con el trigo común, puesto que posee las partes (AA, BB) del genoma del trigo común (AA, BB, DD), de modo que la posibilidad de una falsa detección es alta. Existe por lo tanto la necesidad de procedimientos capaces de detectar específicamente el ADN endógeno de trigo común sin detectar falsamente ADN
15 derivado de trigo duro y otros cultivos de cereales, o en otras palabras, de procedimientos que eviten una reacción cruzada con otros cultivos.

20 Cuando hay múltiples copias de una región de ADN endógeno amplificada por PCR, el trigo de la muestra de ensayo no puede ensayarse exactamente, así que para ensayar exactamente la velocidad de contaminación del trigo OMG en la muestra de ensayo es deseable que la región de ADN endógeno para amplificar esté presente solo en una sola copia en el genoma.

Además, cuando se valora la contaminación de OMG por PCR cuantitativa, es también útil en el caso del trigo usar una sustancia patrón que comprenda una región capaz de amplificarse por pares cebadores específicos orientados a ADN génico endógeno y ADN recombinante ligados a ADN circular.

25 Es por lo tanto objeto de la presente invención especificar una secuencia parcial de ADN de trigo (genoma) que esté presente en una sola copia y permita la detección específica de trigo sin reactividad cruzada con otras plantas en PCR, y proporcionar cebadores para amplificar esta secuencia parcial y un procedimiento para detectar y ensayar favorablemente el ADN endógeno usando estos cebadores.

30 Es otro objeto de la presente invención proporcionar una sustancia patrón que comprenda una región capaz de amplificarse por pares cebadores específicos orientados a ADN génico endógeno y ADN recombinante ligados a ADN circular.

35 Los inventores perfeccionaron en este caso la presente invención como resultado de una investigación exhaustiva dirigida a resolver los problemas anteriormente mencionados, cuando encontraron que la región no transcrita del gen WaxyD, una región del gen TaSUT1D que codifica un transportador de sacarosa, una región del gen CbplIII que codifica carboxipeptidasa III, la secuencia GSS (Genome Survey Sequence) y la región del gen Lr1 (gen de resistencia a la roya foliar) están presentes en una sola copia en ADN de genoma de trigo y no tienen reactividad cruzada con otras plantas en PCR, y descubrieron secuencias parciales que, cuando se amplifican, permiten detectar y ensayar específicamente secuencias de ADN de trigo endógeno.

Es decir, la presente invención se refiere a:

40 [1] Un procedimiento para detectar o cuantificar ADN de trigo endógeno en una muestra de ensayo por PCR, que comprende: una etapa de amplificación de un ácido nucleico de una región que comprende al menos un 80% o más de una secuencia nucleotídica representada por la SEC ID N°: 3 ó 4 usando un ácido nucleico en la muestra o un ácido nucleico extraído de la muestra como molde con un par cebador capaz de amplificar esa región, y detectar o cuantificar el ácido nucleico amplificado.

45 [2] El procedimiento según [1] anteriormente, en el que el par cebador se selecciona del grupo que consiste en (i) un par cebador constituido por un ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica representada por la SEC ID N°:12 y un ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica representada por la SEC ID N°:13, (ii) un par cebador que consiste en un ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica representada por la SEC ID N°:14 y un ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica representada por la SEC ID N°: 15 y (iii) pares cebadores que consisten en pares de ácidos nucleicos, comprendiendo cada ácido nucleico la secuencia continua
50 de al menos un 80% de la secuencia nucleotídica de un ácido nucleico de uno de los pares cebadores (i) o (ii).

[3] Un procedimiento según [1] o [2] anteriormente, en el que los cebadores del par cebador son ácidos nucleicos de 15 a 40 nucleótidos de longitud.

55 [4] Un par cebador para detectar o cuantificar trigo en una muestra de ensayo por PCR, en el que dicho par cebador es capaz de amplificar una región constituida por al menos un 80% de una secuencia nucleotídica representada por la SEC ID N°:3 o 4.

5 [5] El par cebador según [4] anteriormente, seleccionado del grupo que consiste en (i) un par cebador que consiste en un ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica representada por la SEC ID N°:12 y un ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica representada por la SEC ID N°:13, (ii) un par cebador que consiste en un ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica representada por la SEC ID N°:14 y un ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica representada por la SEC ID N°: 15 y (iii) pares cebadores que consisten en pares de ácidos nucleicos, comprendiendo cada ácido nucleico la secuencia continua de al menos un 80% de la secuencia nucleotídica de un ácido nucleico del par cebador (i) o (ii).

[6] Un kit para detectar o ensayar una secuencia de ADN de trigo endógeno en una muestra de ensayo por PCR, que comprende un par cebador según [4] o [5] anteriormente.

10 [7] Un procedimiento para determinar la velocidad de mezclado de trigo modificado genéticamente en una muestra de ensayo, que comprende: efectuar una PCR cuantitativa usando, como molde, un ADN circular que comprende una región que consiste en al menos el 80% de una secuencia nucleotídica representada por la SEC ID N° 3 ó SEC ID N° 4, capaz de amplificarse por PCR usando un par cebador según [4] o [5] y ADN extraído de la muestra de ensayo;

15 preparar una curva de calibración para determinar el número de moléculas de ADN molde usando los resultados de la PCR cuantitativa para el ADN circular;

20 determinar el número de moléculas que tiene una secuencia parcial de una secuencia de ADN de trigo endógeno y el número de moléculas que tiene una secuencia parcial de una secuencia de ADN presente específicamente en al menos una clase de trigo modificado genéticamente contenido en la muestra de ensayo, usar la curva de calibración y los resultados de la PCR cuantitativa para la muestra de ensayo, y

determinar la relación A obtenida dividiendo el número de moléculas que tienen una secuencia parcial de la secuencia de ADN específica del trigo modificado genéticamente entre el número de moléculas que tienen una secuencia parcial de la secuencia de ADN de trigo endógeno.

[8] El procedimiento según [7] anteriormente, que comprende adicionalmente:

25 determinar la velocidad de mezclado de trigo modificado genéticamente en una muestra calculando la fórmula $100 \times A/B$, usando la relación A y la relación B obtenidas dividiendo el número de moléculas obtenido por PCR cuantitativa usando como molde ADN extraído de semillas patrón de trigo modificado genéticamente, que tienen una secuencia parcial de una secuencia de ADN presente específicamente en una estirpe particular de trigo modificado genéticamente, entre el número de moléculas que tienen una secuencia parcial de una secuencia de ADN de trigo endógeno.

30 [9] Un procedimiento según [7] o [8] anteriormente, en el que al menos un par cebador seleccionado del los pares cebadores descritos en [4] y [5] se usa en dicha PCR cuantitativa.

35 [10] Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de [7] – [9] anteriormente, en el que el ADN circular comprende adicionalmente uno o más trozos de ADN que comprende cada uno uno o más trozos de ADN que comprenden cada uno una secuencia particular de una estirpe específica de trigo modificado genéticamente.

40 El procedimiento de la presente invención proporciona información exacta sobre la presencia y cantidad de trigo en muestras de ensayo de materiales alimentarios y alimentos procesados, etc., y por lo tanto los pares cebadores de PCR usados en la presente invención tienen que detectar específicamente trigo sin ninguna reacción cruzada con cultivos distintos del trigo tales como arroz, cebada, centeno, avena, cebada "Minorimugi", maíz, soja, patatas, tomates, berenjenas, moha, setaria gigante, trigo sarraceno, colza, etc. Además, la región de ADN endógeno para amplificar por el par cebador de la presente invención es preferiblemente de una sola copia.

45 Si el par cebador de PCR reacciona de forma cruzada con un cultivo distinto de trigo en un procedimiento de valoración, no solo puede haber resultados falsos positivos en la detección de trigo, sino que será difícil cuantificar exactamente el ADN de trigo endógeno en la muestra de ensayo. De forma similar, el ADN de trigo endógeno no puede ensayarse exactamente si la región de ADN endógeno está presente en múltiples copias. En consecuencia, dichos procedimientos y pares cebadores no pueden determinar exactamente la velocidad de contaminación de trigo OMG.

50 La presente invención proporciona un procedimiento capaz de detectar o cuantificar específicamente ADN de trigo endógeno en muestras de ensayo de materiales alimentarios, alimentos procesados y similares sin reacción cruzada con otros cultivos, junto con pares cebadores de PCR para uso en este procedimiento. Este procedimiento detecta o ensaya por PCR una secuencia parcial específica de una secuencia de ADN endógeno que tiene baja homología con granos distintos del trigo y que está presente solo en una sola copia en el genoma.

55 Además, usando la sustancia patrón para detectar trigo OMG proporcionada por la presente invención, es posible determinar exactamente la velocidad de contaminación de trigo OMG en una muestra de ensayo para cada estirpe de OMG por PCR cuantitativa.

Descripción de los dibujos

5 La Figura 1 muestra los resultados del ensayo de especificidad de trigo del par cebador Wx011-5'/3'. De los carriles, M muestra el marcador de peso molecular de 100 pb, 1 es la marca de trigo 1CW, 2 es la marca de trigo WW, 3 es la marca de trigo N61, 4 es harina de trigo, 5 es arroz, 6 es cebada, 7 es maíz, 8 es soja, 9 es patatas, 10 es tomates, 11 es berenjena, 12 es centeno, 13 es Minorimugi, 14 es avena, 15 es moha, 16 es setaria gigante, 17 es trigo sarraceno, 18 es colza y 19 es el control sin molde (agua).

10 La Figura 2 muestra los resultados del ensayo de especificidad de trigo del par cebador Wx012-5'/3'. De los carriles, M muestra el marcador de peso molecular de 100 pb, 1 es la marca de trigo 1CW, 2 es la marca de trigo WW, 3 es la marca de trigo N61, 4 es harina de trigo, 5 es arroz, 6 es cebada, 7 es maíz, 8 es soja, 9 es patatas, 10 es tomates, 11 es berenjena, 12 es centeno, 13 es Minorimugi, 14 es avena, 15 es moha, 16 es setaria gigante, 17 es trigo sarraceno, 18 es colza y 19 es el control sin molde (agua).

La Figura 3 muestra el diseño de la sonda WxS01 para hibridación Southern para estimar el número de copias de Wx012. A muestra la región no transcrita y B muestra la sonda.

La Figura 4 muestra los sitios de escisión de enzimas de restricción de la sonda WxS01.

15 La Figura 5 muestra los resultados de la hibridación Southern de trigo usando la sonda WxS01. De los carriles, 1 muestra los resultados para la variedad WW escindida con Mbol, 2 para la variedad WW escindida con Mval, 3 para la variedad WW escindida con EcoT14I, 4 para la variedad HRS escindida con Mbol, 5 para la variedad HRS escindida con Mval, 6 para la variedad HRS escindida con EcoT14I y P los resultados de escisión con el control positivo (Wxs01: 300 g).

20 La Figura 6 muestra los resultados de la hibridación Southern de trigo duro. De los carriles, 1 muestra los resultados de la variedad de trigo duro escindida con Mbol, 2 de la variedad de trigo duro escindida con Mval y 3 de la variedad de trigo duro escindida con EcoT14I.

25 La Figura 7 muestra los resultados de un ensayo que confirma la especificidad de trigo del par cebador Cbp014-5'/3'. De los carriles, M muestra el marcador de peso molecular de 100 pb, 1 es la marca de trigo 1CW, 2 es la marca de trigo WW, 3 es la marca de trigo N61, 4 es harina de trigo, 5 es arroz, 6 es cebada, 7 es maíz, 8 es soja, 9 es patatas, 10 es tomates, 11 es berenjena, 12 es centeno, 13 es Minorimugi, 14 es avena, 15 es moha, 16 es setaria gigante, 17 es trigo sarraceno, 18 es colza y 19 es el control sin molde.

30 La Figura 8 es una curva de calibración preparada a partir de los resultados de PCR cuantitativa usando como moldes diversas concentraciones de ADN de trigo.

Descripción detallada

Los términos usados en esta memoria descriptiva se definen a continuación, y la presente invención se explican con detalle.

En esta memoria descriptiva, el término "trigo" indica trigo común (*Triticum aestivum*) a menos que se especifique otra cosa.

35 El procedimiento de la presente invención detecta como una secuencia de ADN endógeno de trigo partes específicas de regiones de la región no transcrita del gen WaxyD y su región 3' cadena arriba (SEC ID N°:16), el gen TaSUT1D (n° de acceso AF408845), el gen CbpIII (n° de acceso J02817), el gen Lr1 (n° de acceso S79983) y la secuencia GSS (n° de acceso AJ440705) en el genoma de trigo.

40 Es conocido que existen un total de tres conjuntos del gen Waxy, uno en cada cromosoma de trigo 4A, 7A y 7D (solicitud de patente japonesa abierta a inspección pública n° 2003-284598 y Ainsworth, C. *et al.*, Plant Mol. Biol. abril de 1993, 22(1): 67-82). Es difícil detectar el gen WaxyD completo del genoma de trigo en un alimento procesado, mientras que la región de una secuencia parcial seleccionada al azar puede ser una secuencia de copias múltiples.

45 Los presentes inventores determinaron la secuencia nucleotídica (SEC ID N°:22) de la región no transcrita del gen WaxyD, descubrieron la existencia en esa región de una región de una sola copia presente solo en el genoma D y nombraron a una parte de 101 pb de esta la región Wx011 (SEC ID N°:2). Una región de 102 pb se nombró región Wx012 (SEC ID N°:1). En el procedimiento de la presente invención, el gen Waxy D se detecta y cuantifica amplificando por PCR una región que comprende al menos un 80% de la región Wx011 o la región Wx012.

50 El gen TaSUT es conocido como un gen transportador de sacarosa, y los cromosomas A, B y D de trigo se ha notificado que contienen cada uno una copia del gen TaSUT con secuencias nucleotídicas altamente homólogas (Aoki, N. *et al.*, Plant Molecular Biology 50: 453-462, 2002). Sin embargo, en la presente invención se ha descubierto que, de las regiones del gen TaSUT1D del genoma D, la región sut01 (SEC ID N°:3) y la región sut02 (SEC ID N°:4) podrían estar presentes solo en una sola copia en el cromosoma D. Por lo tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento para detectar y cuantificar el gen TaSUT1D amplificando por PCR una región que comprende al

menos un 80% de la región sut01 (SEC ID N°:3) y/o la región sut02 (SEC ID N°:4).

De las regiones del gen CbplII del genoma, la región CbplII014 de 100 pb (SEC ID N°:5) es probablemente de una sola copia, y se ha confirmado que no tiene casi reactividad cruzada con otras variedades de planta en PCR cualitativa. Se describe en la presente memoria un procedimiento para detectar y cuantificar el gen CbplII amplificando por PCR una región que comprende al menos un 80% de la región CbplII014 (SEC ID N°:5).

La región GSS del trigo es ADN que tiene una función de tipo promotor en el análisis del genoma. De la región GSS, la región gss01 de 111 pb (SEC ID N°:6) es probablemente de una sola copia, y se ha confirmado que no tiene casi reactividad cruzada con otras variedades de planta en PCR cualitativa. Se describe en la presente memoria un procedimiento para detectar y ensayar la región gss01 amplificando por PCR una región que comprende al menos un 80% de la región gss01 (SEC ID N°:6).

De las regiones del gen Lr1 en el genoma del trigo, la región Lr101 de 111 pb (SEC ID N°:7) es probablemente de una sola copia, y se ha confirmado que no tiene casi reactividad cruzada con otras variedades de planta en PCR cualitativa. Se describe en la presente memoria un procedimiento para detectar y ensayar el gen Lr1 amplificando por PCR una región que comprende al menos un 80% de la región Lr101 (SEC ID N°:7).

Debido a que la región Wx011, la región Wx012, la región sut01, la región sut02, la región CbplII014, la región gss01 y la región Lr101 anteriormente mencionadas son todas cortas (aproximadamente 100-130 pb), permiten detectar y cuantificar el ADN de trigo endógeno incluso en alimentos procesados y otras muestras en que el ADN puede haberse fragmentado.

En la memoria descriptiva de esta solicitud, una "región que comprende al menos un 80% de una secuencia nucleotídica representada por una cualquiera de las SEC ID NOS:1 a 7" es una región más corta que comprende la secuencia continua de al menos un 80% de la secuencia nucleotídica representada por una cualquiera de las SEC ID NOS:1 a 7 o una región más larga que comprende la secuencia nucleotídica representada por una cualquiera de las SEC ID NOS:1 a 7 junto con la secuencia nucleotídica del extremo 5' y/o 3' del genoma, en la que al menos un 80% del total constituye la secuencia nucleotídica representada por una cualquiera de las SEC ID NOS:1 a 7. Debido a que esta región comprende al menos un 80% de una región de una sola copia, puede obtenerse un producto de PCR de la longitud esperada seleccionando los pares cebadores apropiados incluso si la región es más corta o más larga que la secuencia nucleotídica representada por las SEC ID NOS:1 a 7, permitiendo detectar y/o ensayar el ADN de trigo endógeno.

El par cebador usado en la PCR de la presente invención no está particularmente limitado, a condición de que sea capaz de amplificar una región de al menos un 80% de la región Wx011, la región Wx012, la región sut01 o la región sut02, la región CbplII014, la región gss01 o la región Lr101, y puede diseñarse basándose en la secuencia nucleotídica de la región para amplificar de acuerdo con las normas básicas de la preparación de cebadores. En este caso, debe tenerse cuidado con la uniformidad de los valores de Tm de los cebadores. Cada cebador debería ser normalmente de 15 a 40 pb, o preferiblemente de 15 a 30 pb de longitud.

Si el par cebador de PCR reacciona de forma cruzada con un cultivo distinto del trigo, no solo puede haber resultados falsos positivos en la detección de trigo, sino que será difícil cuantificar exactamente la secuencia de ADN de trigo endógeno en la muestra. Será también imposible ensayar exactamente una secuencia de ADN de trigo endógeno si hay múltiples copias de la secuencia de ADN endógeno. Por lo tanto, dichos procedimientos y pares cebadores no pueden determinar exactamente la tasa de mezclado de trigo OMG.

El procedimiento de la presente invención proporciona información exacta sobre la presencia y cantidad de trigo en muestras de ensayo de materiales alimentarios, alimentos procesados y similares, y por lo tanto los pares cebadores de PCR usados en la presente invención tienen que detectar específicamente trigo sin ninguna reacción cruzada con cultivos distintos del trigo tales como arroz, trigo duro, cebada, centeno, avena, cebada "minorimugi", maíz, soja, patatas, tomates, berenjenas, moha, setaria gigante, trigo sarraceno, colza, etc.

Los ejemplos de dichos pares cebadores incluyen (i) un par cebador que consiste en un ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica representada por la SEC ID N°:8 y un ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica representada por la SEC ID N°:9, (ii) un par cebador que consiste en un ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica representada por la SEC ID N°:10 y un ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica representada por la SEC ID N°: 11, (iii) un par cebador que consiste en un ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica representada por la SEC ID N°:12 y un ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica representada por la SEC ID N°:13, (iv) un par cebador que consiste en un ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica representada por las SEC ID N°:14 o 16 y un ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica representada por las SEC ID N°:15 o 17, (v) un par cebador que consiste en un ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica representada por la SEC ID N°:18 y un ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica representada por la SEC ID N°:19, (vi) un par cebador que consiste en un ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica representada por la SEC ID N°:20 y un ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica representada por la SEC ID N°:21, y (vii) pares cebadores que consisten en pares de ácidos nucleicos, comprendiendo cada ácido nucleico la secuencia continua de al menos un 80% de la

secuencia nucleotídica de un ácido nucleico de uno de los pares cebadores (i) a (vi) anteriores. Estos pares cebadores amplifican específicamente la región Wx011, la región Wx012, la región sut01 o la región sut02, la región CbplII014, la región gss01 o la región Lr101 sin cruzamiento con otros cultivos.

5 Los "cebadores que consisten en ácidos nucleicos que comprenden cada uno la secuencia continua de al menos un 80% de la secuencia nucleotídica de cada cebador" son cebadores que comprenden cada uno la secuencia continua de al menos un 80% de una de las secuencias nucleotídicas representadas por las SEC ID N°:8 a 21, que pueden desplazarse hacia el extremo 5' o el extremo 3' de la secuencia nucleotídica del genoma y pueden ser más cortos, más largos o idénticos. En consecuencia, entre los pares cebadores (vii) anteriores, el cebador de codificación, el cebador inverso o ambos constituidos por secuencias nucleotídicas representadas por las SEC ID N°:8 a 21 pueden modificarse según las condiciones anteriormente mencionadas. Sin embargo, debido a que estos cebadores comprenden al menos un 80% de las secuencias nucleotídicas representadas por las SEC ID NOS:8 a 21, como los pares cebadores (i) a (vi) anteriores, pueden amplificar específicamente la región Wx011, la región Wx012, la región sut01 o la región sut02, la región CbplII014, la región gss01 o la región Lr101 sin reactividad cruzada con otros cultivos.

15 Las muestras de ensayo usadas en la presente invención son materiales alimentarios o alimentos procesados que contienen o pueden contener trigo incluyendo, por ejemplo, semillas de trigo bruto, semillas secadas, harina de trigo, harina mixta y otros comestibles brutos y comestibles procesados intermedios, así como alimentos procesados tales como pan y fideos. Estos materiales y productos alimentarios no están limitados a los alimentos humanos, sino que incluyen también alimentos y alimentación para mascotas. Los cultivos distintos del trigo incluyen todos los cultivos usados como materiales alimentarios y comestibles brutos, tales como los mencionados anteriormente.

20 Los ácidos nucleicos pueden extraerse de esta muestra como tal o después de pulverizarse, o también después de lavarse, secarse y pulverizarse. Los ácidos nucleicos extraídos de la muestra de ensayo y usados en análisis son normalmente ADN. El ADN puede extraerse mediante cualquier procedimiento conocido, y puede extraerse usando uno de los muchos kits de extracción de ADN actualmente en el mercado. Por ejemplo, el ADN puede extraerse de la muestra de ensayo usando un DNeasy Plant Maxi Kit (QIAGEN) de acuerdo con los procedimientos descritos en el "JAS Analytical Handbook, Manual of Assessment and Analysis for Genetically Modified Foods", 2ª edición revisada (IAA Center for Food Quality, Labeling and Consumer Services). Se mide la concentración del ADN extraído mediante absorción y se usa preferiblemente después de diluir a una concentración adecuada para PCR.

25 En el procedimiento de la presente invención, la PCR puede efectuarse de acuerdo con procedimientos ordinarios teniendo en consideración los cebadores y ADN polimerasa usados. Pueden prepararse el tampón de PCR, dNTP, MgCl₂ y otros reactivos o puede usarse un kit comercial de PCR. Pueden usarse en la PCR uno o dos o más pares de los cebadores anteriormente mencionados. Las condiciones de PCR pueden ser, por ejemplo, 40 ciclos de un ciclo de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 63°C y 30 segundos a 72°C, seguido de 7 minutos a 72°C para la reacción final, pero estas condiciones pueden cambiarse según sea apropiado teniendo en consideración la Tm de los cebadores usados, la longitud de la región para amplificar, la concentración de ADN molde y similares.

30 El ácido nucleico amplificado (producto de PCR) puede detectarse usando cualquier procedimiento capaz de identificar un fragmento de ADN específico, tal como electroforesis en gel de agarosa, electroforesis en gel de acrilamida, electroforesis capilar, hibridación, procedimientos inmunológicos o similares. En general, el producto de PCR se somete a electroforesis y se identifica basándose en el patrón de electroforesis, pero la detección puede lograrse también identificando una banda producida por electroforesis usando gel de agarosa al 0,8% que contiene bromuro de etidio.

35 La presente invención comprende los pares cebadores usados en el procedimiento de detección o cuantificación anteriormente mencionado de la presente invención y un kit que contiene estos pares cebadores. Los cebadores pueden fabricarse mediante procedimientos ordinarios. Además de los pares cebadores, el kit puede incluir otros reactivos tales como dNTP, MgCl₂, ADN polimerasa Taq y otras polimerasas, tampón (tal como Tris-HCl), glicerol, DMSO, ADN de control positivo, ADN de control negativo, agua destilada y similares. Estos reactivos pueden envasarse individualmente en el kit, o pueden proporcionarse dos o más reactivos mezclados entre sí. Las concentraciones de los diversos reactivos en el kit no están particularmente limitadas, a condición de que sean tales que permitan la PCR de la presente invención. El kit puede consistir solo en reactivos cebadores o puede incluir también las condiciones de PCR deseables y otra información.

Se describe en la presente memoria una sustancia patrón útil para medir la velocidad de contaminación de trigo OMG por PCR cuantitativa. Esta sustancia patrón comprende ADN endógeno común tanto a trigo no OMG como a trigo OMG, junto con uno o más trozos de ADN específico de trigo OMG ligados a un solo ADN circular.

55 La sustancia patrón puede ser ADN circular que comprende, como ADN endógeno, ADN constituido por una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 80% de homología con una cualquiera de las secuencias nucleotídicas representadas por las SEC ID N° 1 a 7.

Puede ser también ADN circular que comprende, como ADN endógeno, una región capaz de amplificarse por un par cebador seleccionado del grupo que consiste en (i) un par cebador que consiste en un ácido nucleico que

comprende la secuencia nucleotídica representada por la SEC ID N°:8 y un ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica representada por la SEC ID N°:9, (ii) un par cebador que consiste en un ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica representada por la SEC ID N°:10 y un ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica representada por la SEC ID N°:11, (iii) un par cebador que consiste en un ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica representada por la SEC ID N°:12 y un ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica representada por la SEC ID N°:13, (iv) un par cebador que consiste en un ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica representada por las SEC ID N°:14 o 16 y un ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica representada por las SEC ID N°:15 o 17, (v) un par cebador que consiste en un ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica representada por la SEC ID N°:18 y un ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica representada por la SEC ID N°:19, (vi) un par cebador que consiste en un ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica representada por la SEC ID N°:20 y un ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica representada por la SEC ID N°:21, y (vii) pares cebadores constituidos por pares de ácidos nucleicos, comprendiendo cada ácido nucleico la secuencia continua de al menos un 80% de la secuencia nucleotídica de un ácido nucleico de uno de los pares cebadores (i) a (vi) anteriores.

El ADN circular usado para la sustancia patrón no está particularmente limitado, a condición de que permita la inserción de ADN endógeno y ADN específico de estirpe de trigo OMG, pero pueden usarse, por ejemplo, un vector pBR (pBR322, pBR328, etc.), un vector pUC (pUC19, pUC18, etc.) o un vector del fago λ (λ gt10, λ gt11, etc.) o un vector comercial que comprenda uno de estos con modificaciones o similares.

Cuando se detecta trigo OMG, es necesario no solo amplificar y detectar una secuencia de ADN exógeno insertada en el genoma de trigo normal mediante recombinación genética, sino amplificar una región que incluya las secuencias endógenas cadena arriba y cadena abajo de la secuencia de ADN exógeno. Debido a que una secuencia de ADN exógeno idéntica puede insertarse en otros cultivos para preparar cultivos OMG, si se detecta solo la secuencia de ADN exógeno, no resultará evidente si deriva de trigo OMG o de otro cultivo modificado genéticamente. En consecuencia, los cebadores para detectar secuencias específicas de estirpe OMG tienen que ser cebadores capaces de amplificar regiones que comprenden las secuencias endógenas cadena arriba y cadena abajo de las secuencias de ADN exógeno insertadas en cada estirpe de trigo OMG. Estos cebadores se preparan según los procedimientos descritos con respecto a soja, por ejemplo, (Wurz, A. *et al.*, "2nd Status report: BgVV, BgVV-Heft", 1/199797, 118 o Kopell, E. *et al.*, *Mitt. Gebiete Levensm. Hyg.*, 88, 164, etc.), o procedimientos análogos. Se selecciona una secuencia de ADN capaz de amplificarse por estos cebadores como la secuencia específica de estirpe de trigo OMG para insertar en la sustancia patrón.

Una vez se han determinado el ADN de trigo endógeno y el ADN específico de trigo OMG para insertar en la sustancia patrón, se efectúa una PCR usando un genoma de trigo normal o genoma de trigo OMG como molde para clonar el ADN endógeno y el ADN específico de trigo OMG, y se escinden los fragmentos de ADN clonado y el sitio de clonación del ADN circular anteriormente mencionado con la misma enzima de restricción para ligar los fragmentos de ADN con el sitio escindido del ADN circular. Puede seleccionarse una enzima de restricción conocida según sea apropiado, y pueden usarse por ejemplo EcoRI, SpeI, EcoRV, SmaI, SacI, NotI, HindIII, XhoI o similares.

Pueden derivarse curvas de calibración de las secuencias parciales de la secuencia de ADN de trigo endógeno y de la secuencia de ADN específica de OMG preparando una serie de diluciones de dos o más concentraciones de una disolución que comprende la sustancia patrón resultante, y sometiendo cada una a PCR cuantitativa. Además, la sustancia patrón de la presente invención puede usarse como control positivo de la secuencia de ADN de trigo endógeno o la secuencia de ADN específica de OMG en PCR cualitativa.

La presente invención comprende un procedimiento para determinar la velocidad de contaminación de trigo OMG en una muestra de ensayo por PCR usando la sustancia patrón anteriormente mencionada.

En este procedimiento, se efectúa la PCR cuantitativa usando como moldes la sustancia patrón anteriormente mencionada y ADN extraído de la muestra de ensayo, y se prepara una curva de calibración para determinar el número de moléculas de ADN molde usando los resultados de la PCR cuantitativa para la sustancia patrón.

En la PCR cuantitativa, se usa el valor de CU como datos. El valor de CU es el número de ciclos (ciclo umbral) al que se alcanza una cantidad específica de producto de amplificación a medida que la amplificación se vuelve exponencial cuando se siguen los cambios en la cantidad de producto amplificado con el tiempo en PCR cuantitativa. La curva de calibración anteriormente mencionada puede usarse para convertir este valor de CU en el número inicial de moléculas de ADN (número de moléculas de ADN molde) contenidas en la muestra de ensayo antes de la PCR.

La curva de calibración puede prepararse según procedimientos conocidos o procedimientos similares, por ejemplo, con el valor de CU representado en el eje vertical y el logaritmo del número de moléculas de sustancia patrón en la serie de diluciones en el eje horizontal. Por ejemplo, puede prepararse preparando una serie de diluciones que contienen diversas concentraciones de sustancia patrón y derivando los valores de CU para cada una siguiendo durante un periodo fijo la PCR cuantitativa.

El número inicial de moléculas de una secuencia parcial de la secuencia de ADN de trigo endógeno contenida en la

muestra de ensayo y el número de moléculas de una secuencia parcial de una secuencia de ADN específica de trigo modificado genéticamente pueden derivarse usando la curva de calibración mencionada anteriormente a partir de los valores de CU o, en otras palabras, a partir de los resultados de la PCR cuantitativa efectuada en la muestra de ensayo.

- 5 El número resultante de moléculas de la secuencia parcial de una secuencia de ADN específica de trigo modificado genéticamente puede dividirse entre el número de moléculas de la secuencia parcial de una secuencia de ADN de trigo endógeno para obtener la relación A, mientras que el número de moléculas de una secuencia parcial de una secuencia de ADN específica de cada estirpe de trigo OMG obtenida mediante PCR cuantitativa usando semillas estándares de trigo modificado genéticamente puede dividirse entre el número de moléculas de la secuencia parcial de una secuencia de ADN de trigo endógeno obteniéndose la relación B, y la velocidad de contaminación de trigo modificado genéticamente en la muestra de ensayo puede determinarse calculando la fórmula $100 \times A/B$. Esta relación B se denomina la "relación de patrón interno" en el "JAS Analytical Handbook, Manual of Assessment and Analysis for Genetically Modified Foods", 2ª edición revisada, IAA Center for Food Quality, Labeling and Consumer Services, y es la relación de (gen recombinante)/(gen endógeno) en el ADN extraído de semillas de cada estirpe de OMG puro. La relación de patrón interno es constante en cada estirpe de semillas recombinantes.

Las etapas de PCR en el procedimiento de la presente invención para determinar la velocidad de contaminación de trigo OMG pueden efectuarse simultánea o separadamente. Cuando las etapas de PCR se efectúan separadamente, las condiciones deberían ser tales que produjeran aproximadamente la misma eficacia de amplificación de ácido nucleico que en la PCR para la determinación de la curva de calibración. Sería un ejemplo de dichas condiciones las mismas temperaturas y ciclos que en la PCR para preparar la curva de calibración.

Ejemplo 1. Detección del gen WaxyD

Se logró la detección amplificando la región Wx011 de 101 pb (SEC ID N°:2) y la región Wx012 de 102 pb (SEC ID N°:1), que son regiones no transcritas del gen WaxyD.

[1] Diseño de cebadores

- 25 Se diseñaron los cebadores usando el software de diseño de cebadores Primer Express (Applied Biosystems). Se diseñaron los cebadores con estricta adherencia a las normas básicas de preparación de cebadores, de modo que además de obtener un valor de Tm uniforme para cada cebador, el producto de amplificación de PCR sería de aproximadamente 100 a 150 pb para permitir la detección en alimentos procesados con fragmentación de ADN, y la longitud nucleotídica de cada cebador sería de 18 a 25 pb. Se obtuvieron como resultado el cebador 5' Wx011-5' (SEC ID N°:8) y el cebador 3' Wx011-3' (SEC ID N°:9) y el cebador 5' Wx012-5' (SEC ID N°:10) y el cebador 3' Wx012-3' (SEC ID N°:11).

[2] Extracción de ADN

- 35 Para las muestras de ADN molde de PCR, se usó ADN extraído de 2 marcas (1CW, WW) y 4 variedades (incluyendo N61) de trigo y harina de trigo comercial (Nisshin Flour Milling Co., Ltd. "Kameriya") para las muestras de trigo, mientras que se usaron como muestras comparativas ADN extraído de arroz, maíz, moha, setaria gigante, trigo sarraceno, 2 variedades de cebada, centeno, avena, soja, colza, tomates, berenjena y 1 marca (CAD) y 4 variedades (de aquí en adelante denominadas "las variedades de trigo duro A-D") de trigo duro.

- 40 Se lavaron el trigo y otras muestras de plantas con SDS al 1% (Wako Pure Chemical Ind.), se aclararon con agua destilada, se secaron concienzudamente y se pulverizaron entonces finamente usando un Multi-bead shocker (Yasui Machines). Se extrajo el ADN de 1 g de cada muestra pulverizada usando el DNeasy Plant Maxi Kit (QIAGEN) de acuerdo con los protocolos de extracción de ADN para maíz descritos en el "JAS Analytical Handbook, Manual of Assessment and Analysis for Genetically Modified Foods", 2ª edición revisada, IAA Center for Food Quality, Labeling and Consumer Services. Para el trigo duro, se seleccionaron aleatoriamente 4 granos de cada variedad y se extrajo el ADN cada grano usando el kit anteriormente mencionado de acuerdo con los protocolos adjuntos. Se midió la concentración del ADN extraído a partir de la absorción, se diluyó parte del mismo 10 ng/μl con agua pura y se usó como líquido de muestra de ADN molde en la reacción de PCR.

[3] Reacción de PCR y electroforesis

- 50 Se prepararon los líquidos de la reacción PCR como sigue. A saber, se añadieron 2,5 μl de líquido de muestra de ADN preparado a 10 ng/μl a un líquido que comprendía tampón de PCR (tampón de PCR II, Applied Biosystems), dNTP 200 μmol/l, MgCl₂ 1,5 mmol/l, cebadores 5' y 3' 0,5 μmol/l y 0,625 unidades de ADN polimerasa Taq (Ampli Taq Gold, Applied Biosystems), para un volumen total de 25 μl.

- 55 Usando un GeneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystems) como amplificador de PCR, se fijaron las condiciones de reacción como sigue. Se mantuvo la temperatura a 95°C durante 10 minutos para iniciar la reacción y se efectuó la amplificación por PCR en 40 ciclos de un ciclo constituido por 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 63°C y 30 segundos a 72°C. Se mantuvo entonces el líquido de reacción durante 7 minutos a 72°C para la reacción final, se almacenó a 4°C y se usó como líquido de reacción de amplificación por PCR.

Se sometió a electroforesis el líquido de reacción de amplificación por PCR en gel de agarosa al 0,8% que contenía bromuro de etidio. Se muestran en la Figura 1 los resultados de los ensayos de detección para trigo y otros cultivos para Wx011-5'/Wx011-3' y en la Figura 2 para Wx012-5'/Wx012-3'.

5 Usando el par cebador Wx011-5'/Wx011-3' o el par cebador Wx012-5'/Wx012-3', se detectó una sola banda del tamaño esperado en la muestra de trigo (carriles 1-4), pero esta banda no se observó en los carriles sin trigo. Esto muestra que la región Wx011 o la región Wx012 del ADN de trigo endógeno pueden detectarse sin cruzamiento con otros cultivos usando el par cebador Wx011-5'/Wx011-3' o Wx012-5'/Wx012-3'.

10 Se muestran en la Tabla 1 siguiente los resultados de trigo y trigo duro usando el par cebador Wx012-5'/Wx012-3'. Estos resultados confirman que el trigo y el trigo duro pueden detectarse sin cruzamiento usando el par cebador Wx012-5'/Wx012-3'.

Tabla 1

Nº de carril	ADN molde	Cebador de detección wx012 5'/3'
1	Variedad de trigo duro A	-
2	Variedad de trigo duro B	-
3	Variedad de trigo duro C	-
4	Variedad de trigo duro D	-
5	Trigo duro (CAD)	-
N	Control sin molde (agua)	-
P	Control positivo (trigo)	+

+: detectada banda de amplificación de tamaño óptimo

-: no detectada banda de amplificación de tamaño óptimo

Ejemplo 2. Confirmación del número de copias de la región Wx012

15 Se efectuó una hibridación Southern en las siguientes condiciones para confirmar el número de copias de Wx012.

Se usó ADN extraído de 2 variedades de trigo como muestras. Se extrajo ADN como en el ejemplo 1.

Se usó un Gene Images Alkphos Direct Labeling and Detection System (Amersham Biosciences) para hibridación y detección. Se usaron los reactivos, tampones y similares descritos en los protocolos del kit.

[1] Diseño de sonda

20 La longitud de una sonda para obtener una buena sensibilidad en hibridación Southern usando este kit es de 300 pb o más. Sin embargo, el Wx012 es de 102 pb de longitud, demasiado corto para hibridación Southern. Además, el genoma de trigo es grande, $1,7 \times 10^{10}$ pb, así que para potenciar adecuadamente la sensibilidad de detección, se diseñó una sonda WxS01 de 444 pb que comprendía la región Wx012 y se preparó por PCR usando el cebador 5' WxS01-5' (SEC ID N°:23) y el cebador 3' Wx012-3' (SEC ID N°:11). Se diseñaron los cebadores para obtener
25 WxS01 usando Genetyx Win de acuerdo con las normas básicas de preparación de cebadores, manteniendo un valor de Tm uniforme para cada cebador. Se muestra en la Figura 3 un esbozo del diseño de cebadores.

[2] Selección de las enzimas de restricción

30 Para las enzimas de restricción, se seleccionaron enzimas con la condición de que no escindieran la región diana y no estuvieran afectadas por la metilación, y de que fuera conocida la localización de un sitio de escisión que comprendiera la diana. Como resultado, se seleccionaron MboI, MvaI y EcoT14I por ser capaces de escindir ambos lados de la región diana en una sola reacción enzimática. Se muestran en la Figura 4 los sitios de escisión y tamaños de fragmento respectivos. Los sitios de enzima de restricción mostrados en la Figura 3 son localizaciones de la secuencia nucleotídica representada por la SEC ID N°:22.

[3] Hibridación Southern de trigo

35 Se hizo reaccionar ADN durante 15 horas a 37°C con las enzimas de restricción anteriormente mencionadas. Después de esta reacción, se sometió el producto a tratamiento con fenol-cloroformo y sedimentación con etanol, y se disolvió entonces en una disolución de TE. Se sometió a electroforesis la disolución de ADN resultante con gel de agarosa al 1,6% (LO3, TaKaRa Bio) usando una disolución de TAE como disolución de electroforesis. A continuación, se transcribió el ADN del gel durante una noche a una membrana (HyperBondN⁺, Amersham

Pharmacia) usando una disolución de 20xSSC.

Se efectuó la hibridación a 55°C usando el tampón de hibridación incluido en el kit. Se ajustó la sonda WxS01 a una concentración de 20 ng/ml y se hizo reaccionar durante una noche. Se lavó esta durante 20 minutos a 55°C usando el líquido de lavado primario y durante 10 minutos a temperatura ambiente usando el líquido de lavado secundario.

5 Después de lavar, se dejó durante 3 minutos sobre la membrana en la que se había iniciado la reacción de enzima de detección y se envolvió entonces en una envoltura Saran después de la cuidadosa eliminación del líquido de detección. Se reveló este durante 1 hora en una cámara oscura con película fotosensible (Hyper film, Amersham Pharmacia) y se evaluaron las bandas.

10 Como resultado, se detectaron 2 bandas después de escisión con Mbol, 3 después de escisión con Mval y 3 o 6 después de escisión con EcoT14I (FIG. 5). Puesto que se ha notificado que hay dos copias del gen Waxy en el genoma A y una copia en el genoma D (Ainsworth, C. *et al.*, *Plant Mol. Biol.* abril de 1993, 22(1): 67-82), esto confirma que la región con la que hibrida la sonda WxS01 está presente en dos copias del genoma A y una copia del genoma D.

[4] Hibridación Southern de trigo duro

15 Se efectuó la hibridación Southern como en [3] anteriormente, usando como molde trigo duro que no incluye un genoma D.

20 Como resultado, se detectó 1 banda después de escisión con Mbol, 2 después de escisión con Mval y 3 después de escisión con EcoT14I. Sin embargo, de las 3 bandas producidas por EcoT14I, una era más gruesa que las otras dos, representando la fusión de dos bandas, así que se determinó que se detectaron como máximo 4 bandas en el trigo duro de este ensayo (Figura 6). Estos resultados coinciden con [3] anteriormente, que muestra que están presentes 2 copias de WxS01 en el genoma A. Se confirmó también en el ejemplo 1 que la región Wx012 del ADN endógeno está presente solo en el genoma D. Estos resultados confirman que hay solo una copia de la región Wx012 en el genoma de trigo.

Ejemplo 3. Confirmación de la idoneidad de Wx012 por PCR cuantitativa

25 Se confirmó a continuación que Wx012 satisface las condiciones necesarias como secuencia endógena para la detección incluso en PCR cuantitativa.

[1] Diseño de sonda TaqMan

30 Se diseñó esta usando el software de diseño de cebador y sonda Primer Express (Applied Biosystems Japan). Se seleccionó una sonda apropiada comprobando las condiciones de selección de sonda descritas en los protocolos de software. Se representa la secuencia nucleotídica de la sonda diseñada por la SEC ID N°:42.

[2] Muestras de ensayo

Se usó ADN extraído de 12 plantas distintas de trigo (arroz, maíz, moha, setaria gigante, trigo sarraceno, cebada, centeno, avena, soja, colza, garbanzos y judías), 4 variedades típicas de trigo duro y 19 variedades típicas de trigo fuerte, de fuerza media y de fuerza baja para las muestras de ADN molde de PCR.

35 [3] Extracción de ADN

40 Se lavaron las muestras de trigo y otras plantas cada una con SDS al 1% (Wako Pure Chemical Ind.), se aclararon con agua destilada, se secaron concienzudamente y se pulverizaron finamente usando un Multi-bead shocker (Yasui Machine). Se extrajo el ADN de 1 g de cada una de las muestras de grano en polvo resultantes usando un DNeasy Plant Maxi Kit (Qiagen) de acuerdo con los protocolos de extracción de ADN de maíz descritos en procedimientos oficiales. En el caso del trigo duro, se seleccionaron aleatoriamente 4 granos de cada variedad, y se extrajo el ADN de cada grano de acuerdo con los protocolos del DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). En el caso de las 4 variedades de trigo, se extrajo el ADN usando un Genomic-tip 20/G (Qiagen) y el procedimiento CTAB de acuerdo con los protocolos descritos en procedimientos oficiales, y también con un DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) de acuerdo con los protocolos adjuntos. Se midió la concentración de ADN extraído mediante absorción, se diluyó parte a 20 ng/µl con agua pura y se usó como líquido de muestra de ADN molde para la reacción PCR.

[4] Reacción PCR cuantitativa

Se efectuó la PCR cuantitativa usando un ABI7700 (Applied Biosystems).

Se efectuó en cada muestra un análisis paralelo de dos o tres puntos. Se efectuó cada reacción usando un sistema de 25 µl por pocillo.

50 Se preparó el líquido de reacción PCR como sigue. Se diluyeron disoluciones de sonda TaqMan, cebador 5' y cebador 3' con agua pura a 2 µM, 5 µM y 5 µM, y se usó una disolución de cada una de estas y agua pura mezcladas en proporciones de 1:1:1:1 como disolución de mezcla de cebador-sonda.

5 Se preparó la cantidad necesaria de mezcla maestra mezclando TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems) y la disolución de mezcla de cebador-sonda una relación de 1,25:1. Se dispensaron 72 µl de la mezcla maestra para cada ADN molde, se añadieron 8 µl de cada ADN molde preparado a 20 ng/ml y se mezclaron concienzudamente. Se dispensaron 25 µl de esta mezcla en los pocillos designados de una placa de 96 pocillos, a 3 pocillos por muestra.

Se establecieron las condiciones de reacción como sigue. Se mantuvo la temperatura a 50°C durante 2 minutos y entonces a 95°C durante 10 minutos para iniciar la reacción, seguido de una reacción de amplificación de 40 ciclos de un ciclo de 30 segundos a 95°C y 1 minuto a 59°C, después de lo cual se mantuvo la temperatura a 50°C durante 4 minutos.

10 [5] Confirmación de la especificidad del trigo

Usando ADN de 19 variedades de trigo y otras 12 plantas, ADN extraído de 4 variedades de trigo duro y ADN extraído de otras 12 plantas distintas de trigo como moldes, se aplicó cada muestra a 3 pocillos y se efectuó la PCR cuantitativa.

15 Como resultado de la PCR cuantitativa usando los cebadores Wx012-5'/3' y la sonda TaqMan Wx012-T, no se detectó una curva de amplificación para NTC, pero se obtuvieron buenas curvas de amplificación para las 19 variedades de ADN de trigo. No se detectó amplificación en el caso del ADN de los 12 tipos de plantas distintos de trigo ni del ADN de las 4 variedades de trigo duro.

[6] Confirmación de la linealidad de la curva de calibración

20 Se preparó ADN de trigo a 300 ng/µl, 150 ng/µl, 75 µl, 30 µl, 10 ng/µl, 4 ng/µl, 1 ng/µl y 0,1 ng/µl, y se usó como molde patrón en PCR cuantitativa. Se derivó una curva de calibración de los resultados según el "JAS Analytical Handbook", y se confirmó el coeficiente de correlación.

Se muestra la curva de calibración resultante en la Figura 8. Cuando se aplicó el ADN de trigo preparado a 1-300 ng/µl o 0,1-75 ng/µl como ADN de molde patrón, se obtuvo una curva de calibración altamente lineal, indicando que estos pueden usarse en ensayo cuantitativo.

25 **Ejemplo 4. Detección del gen TaSUT1D**

Se amplificaron por PCR la región sut01 (SEC ID N°:3) del gen TaSUT1D y la región sut02 (SEC ID N°:4) constituida por la secuencia nucleotídica descrita.

30 Se diseñaron los pares cebadores como en el caso de WaxyD anteriormente, y se usaron el cebador 5' sut01-5' (SEC ID N°:12) y el cebador 3' sut01-3' (SEC ID N°:13) y el cebador 5' sut02-5' (SEC ID N°:14) y el cebador 3' sut02-3' (SEC ID N°:15) en el ensayo de PCR. Se muestran los resultados en la Tabla 2.

Tabla 2

ADN molde	Cebadores de detección de TaSUT	
	sut01-5'/3'	sut02-5'/3'
Trigo	+	+
Arroz	-	-
Maíz	-	-
Soja	-	-
Centeno	-	-
Avena	-	-
Cebada	-	-
Colza	-	-
Moha	-	-
Setaria gigante	-	-
Trigo duro marca E	-	-

(continuación)		
NTC (agua)	-	-
+: detectada banda de amplificación de tamaño óptimo -: no detectada banda de amplificación NTC: sin control de molde (agua)		

Se detectó una sola banda (131 pb o 101 pb) del tamaño previsto usando cada par cebador en el caso del trigo, aunque no se detectó banda en el caso de otros granos y trigo duro (configuración genómica AaBb). Cuando se efectuó el mismo ensayo usando múltiples variedades de trigo, se detectó la única banda prevista en cada uno.

5 Se ha mostrado ya que la región a partir de la cual se diseñaron estos pares cebadores (nº de acceso AF408845, 3924-4397; 474 pb) está presente en una copia de cada uno de los genomas A, B y D. Las regiones amplificadas sut01 y sut02 de sut01-5'/3' y sut02-5'/3' son específicas de trigo (configuración genómica AaBbDd) en la PCR cualitativa y no se detectan en trigo duro (configuración genómica AaBb), confirmando que la región sut01 y la región sut02 están probablemente presentes en solo una copia en el genoma D. Esto confirma que el ADN de trigo endógeno (gen TaSUT1D) puede detectarse usando el par cebador sut01-5'/3' o sut02-5'/3' sin cruzamiento con otros cultivos.

Ejemplo 5. Detección del gen CbpIII

Se amplificó por PCR la región CbpIII014 (SEC ID Nº:5) del gen CbpIII.

15 Se diseñó el par cebador como en el caso de WaxyD anteriormente, y se efectuó el ensayo de PCR usando el cebador 5' cbp014-6' (SEC ID Nº:16) y el cebador 3' cbp014-3' (SEC ID Nº:17). Se muestran los resultados en la Figura 7. Se detectó una sola banda del tamaño previsto (101 pb) en los carriles de trigo (carriles 1-4), pero no se detectó banda en los carriles sin trigo. Esto confirma que el ADN de trigo endógeno (gen Cbp) puede detectarse usando el par cebador cbp014-5'/cbp014-3' sin cruzamiento con otros cultivos.

Ejemplo 6. Detección de la secuencia GSS

20 Se amplificaron por PCR la región gss01 (SEC ID Nº:6), la región gss02 (SEC ID Nº:30) y la región gss03 (SEC ID Nº:31) de la secuencia GSS.

Se diseñaron los pares cebadores como en el caso de WaxyD, y se efectuó la PCR usando los cebadores gss01-5' (SEC ID Nº:18) y gss01-03' (SEC ID Nº:19) como par cebador de la región gss01, los cebadores gss02-5' (SEC ID Nº:34) y gss02-3' (SEC ID Nº:35) como par cebador de la región gss02 y los cebadores gss03-5' (SEC ID Nº:36) y gss03-3' (SEC ID Nº:37) como par cebador de la región gss03. Se muestran los resultados en la Tabla 3.

25 **Tabla 3. Confirmación de la especificidad de los cebadores de detección de GSS**

ADN molde	Cebadores de detección de GSS		
	gss01-5'/3'	gss02-5'/3'	gss03-5'/3'
Trigo	+	+	+
Trigo duro	-	Extra	+
Arroz	-	-	-
Cebada	-	-	-
Maíz	-	+	-
Soja	-	-	-
Trigo sarraceno	-	-	-
Avena	-		
Centeno	-		
Setaria gigante	-		

Moha	-		
Colza	-		
NTC	-	-	-

+: detectada banda de amplificación de tamaño óptimo
 -: no detectada banda de amplificación
 Extra: detectada banda de tamaño diferente del tamaño óptimo
 NTC: sin control de molde (agua)

En el caso del trigo, se detectó una sola banda del tamaño previsto usando los tres pares cebadores. Apareció algo de cruzamiento con trigo duro y maíz con los pares cebadores gss02 y gss03, pero no apareció dicho cruzamiento con los cebadores gss01, confirmando que los cebadores gss01 son capaces de detectar el gen de trigo endógeno.

Ejemplo 7

5 Se amplificaron por PCR la región Lr101 (SEC ID N°:7), la región Lr102 (SEC ID N°:32) y la región Lr103 (SEC ID N°:33) de la secuencia Lr1.

10 Se diseñaron los pares cebadores como en el caso de WaxyD, y se efectuó la PCR usando el par de cebadores representado por las SEC ID N°:20 y SEC ID N°:21 para la región Lr101, el par de cebadores representado por las SEC ID N°:38 y SEC ID N°:39 para la región Lr102 y el par de cebadores representado por las SEC ID N°:40 y SEC ID N°:41 para la región Lr103. Se muestran los resultados en la Tabla 4.

Tabla 4. Confirmación de la especificidad de los cebadores de detección de Lr1

ADN molde	Cebadores de detección de Lr1		
	Lr101-5'/3'	Lr102-5'/3'	Lr103-5'/3'
Trigo	+	+	+
Trigo duro	-	+	Extra
Arroz	-	-	-
Cebada	-	-	-
Maíz	-	-	-
Soja	-	-	-
Trigo sarraceno	-	-	-
Avena	-		
Centeno	-		
Setaria gigante	-		
Moha	-		
Colza	-		
NTC	-	-	-

+: detectada banda de amplificación de tamaño óptimo
 -: no detectada banda de amplificación
 Extra: detectada banda de tamaño diferente del tamaño óptimo
 NTC: sin control de molde (agua)

En el caso del trigo, se detectó una sola banda del tamaño previsto usando los tres pares cebadores. Apareció algo de cruzamiento con trigo duro con los pares cebadores Lr102 y Lr103, pero no apareció dicho cruzamiento con los cebadores Lr101, confirmando que los cebadores Lr101 son capaces de detectar el gen endógeno de trigo.

Ejemplo comparativo

5 Se efectuaron ensayos de detección de ADN de trigo endógeno por PCR usando (1) un par cebador de cebador 5' Cbp013-5' (SEC ID N°:24)/cebador 3' Cbp013-3' (SEC ID N°:25) diseñado basándose en la secuencia nucleotídica del gen CbpIII, (2) un par cebador de cebador 5' TthV011-5' (SEC ID N°:26)/cebador 3' TthV011-3' (SEC ID N°:27) diseñado basándose en la secuencia nucleotídica del gen TthV (Castagnaro A. *et al.*, J. Mol. Biol. 20 de abril de 1992, 224(4): 1003-9) y un par cebador de cebador 5' TthV012-5' (SEC ID N°:28)/cebador 3' TthV012-3' (SEC ID N°:29) diseñado basándose en la secuencia nucleotídica del gen TthV similarmente a (3).

La extracción de ADN, PCR, electroforesis y similares se efectuaron como en los ejemplos anteriormente mencionados.

10 Usando el par cebador (1), se detectó una sola banda del tamaño previsto en trigo, pero se confirmó también la banda en arroz, cebada, maíz, centeno, cebada “minorimugi”, avena y moha, indicando cruzamiento con múltiples cultivos. Usando el par cebador (2), se detectó una sola banda del tamaño previsto en trigo, pero hubo cruzamiento con cebada. Usando el par cebador (3), se detectó una sola banda del tamaño previsto en trigo, pero hubo cruzamiento con centeno y “minorimugi” (un tipo de cebada). Se muestran los resultados en la Tabla 5 siguiente.

15 **Tabla 5**

ADN molde	Cebadores de CbpIII		Cebadores de TthV	
	Cbp013-5'/3'	TthV011-5'/3'	TthV012-5'/3'	
Trigo	+	+	+	
Arroz	Extra	-	-	
Cebada	Extra	+	-	
Maíz	Extra	-	-	
Soja	-	-	-	
Patatas	-		-	
Tomates	-	-	-	
Berenjena	-	-	-	
Centeno	Extra		+	
Cebada (“Minorimugi”)	Extra		+	
Avena	Extra		-	
Moha	Extra		-	
Setaria gigante	-		-	
Trigo sarraceno	-		-	
Colza	-		-	
NTC	-	-	+	

+: detectada banda de amplificación de tamaño óptimo
 -: no detectada banda de amplificación
 NTC: sin control de molde (agua)
 En Blanco: no ensayado

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> NISSHIN SEIFUN GROUP INC
 Incorporated Administrative Agency National Agriculture and Food Research Organization
- <120> Procedimiento para la detección y cuantificación de ADN de trigo endógeno
- 5 <130> PN512748EPA
 <140> División de EP 05728798.9
 <141> 04-06-2005
 <150> JP 2004-115687
 <151> 04-09-2004
- 10 <160> 42
 <170> Patent In versión 3.1
 <210> 1
 <211> 102
 <212> ADN
- 15 <213> *Triticum aestivum*
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Wx012, gen WaxyD1, región no transcrita
 <400> 1
 ggtcgcagga acagaggtgt tcaaggcggc cgaataggt tgccgcctgc ggcggaatcg 60
 ccaccacccg tgaagttcac cgtttcgcaa tggaggaaca cc 102
- 20 <210> 2
 <211> 101
 <212> ADN
 <213> *Triticum aestivum*
- 25 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Wx011, gen WaxyD1, región no transcrita
 <400> 2
 agaagaaaa ggaagttctg gtgcatggag cgtccatcca gtctgcaggg ttctcgtatg 60
 gggagatagc cgcttgttgt agcgaagaag ggccgatata t 101
- 30 <210> 3
 <211> 131
 <212> ADN
 <213> *Triticum aestivum*
 <220>

ES 2 376 300 T3

<221> misc_feature
 <223> sut01, TaSUT1D
 <400> 3

gccccaaacca aaacgctatg actaatttca cttgattttg ccatggaatt tttaggggcc 60
 agcgcgtgct ctgatggctg atttatcagg taacttttca tgacagttca gttatgctag 120
 cgggttcagg c 131

5 <210> 4
 <211> 101
 <212> ADN
 <213> *Triticum aestivum*
 <220>

10 <221> misc_feature
 <223> sut02, gen TaSUT1D
 <400> 4

tcacttgatt ttgccatgga atttttaggg tccagcgcgt gctctgatgg ctgatttacc 60
 aggtaacttt tcatgacagt tcagttatgc tagcgggttc a 101

<210> 5

15 <211> 100
 <212> ADN
 <213> *Triticum aestivum*
 <220>

<221> misc_feature

20 <223> CbplII014, gen CbplII
 <400> 5

ccgcgatatg atcgataccg accaaagaag gggggaaaac tcgctaaggc gccegttgcc 60
 gtctcaagga gtgtctatct gtatctgtct gtttccttcc 100

<210> 6
 <211> 111

25 <212> ADN
 <213> *Triticum aestivum*
 <220>

<221> misc_feature
 <223> gss01, Genome Survey Sequence

30 <400> 6

ES 2 376 300 T3

gtgaagggca cacgatgtgc acgcgctggt gagggcgccc gcagaatcgg cgatggctgc 60
 tagttacagc ggaacacgcc aaacacagat gttggaagge ccttcatcaa g 111
 <210> 7
 <211> 111
 <212> ADN
 5 <213> *Triticum aestivum*
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Lr101, gen Lr1
 <400> 7
 cgcgggtgga gtccattatc caatgtcgtt tgggttcttt cccctgcaag tatctcggac 60
 10 ttcaacttgc cattagacaa ctaacgaggg cggaatggca gcctatgttg g .111
 <210> 8
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> ADN artificial
 15 <220>
 <223> sonda Wx011-5' de PCR
 <400> 8
 agaaagaaaa ggaagttctg gtgc 24
 <210> 9
 20 <211> 24
 <212> ADN
 <213> ADN artificial
 <220>
 <223> cebador Wx011-3' de PCR
 25 <400> 9
 atatatcggc ccttcttcgc taca 24
 <210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> ADN artificial
 <220>
 <223> cebador Wx012-5' de PCR
 <400> 10

	ggtcgcagga acagaggtgt	21
	<210> 11	
	<211> 20	
	<212> ADN	
5	<213> ADN artificial	
	<220>	
	<223> cebador Wx012-3' de PCR	
	<400> 11	
	gggtgttcttc cattgcgaaa	20
10	<210> 12	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> ADN artificial	
	<220>	
15	<223> cebador sut01-5' de PCR	
	<400> 12	
	gcccaaacca aaacgctatg a	21
	<210> 13	
	<211> 20	
20	<212> ADN	
	<213> ADN artificial	
	<220>	
	<223> cebador sut01-3' de PCR	
	<400> 13	
25	gacctgaaccc gctagcataa	20
	<210> 14	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> ADN artificial	
30	<220>	
	<223> cebador sut02-5' de PCR	
	<400> 14	
	tcacttgatt ttgccatgga at	22
	<210> 15	
35	<211> 22	

ES 2 376 300 T3

	<212>	ADN	
	<213>	ADN artificial	
	<220>		
	<223>	cebador sut02-3' de PCR	
5	<400>	15	
		tgaaccctgct agcataactg aa	22
	<210>	16	
	<211>	20	
	<212>	ADN	
10	<213>	ADN artificial	
	<220>		
	<223>	cebador CbpIII014-5' de PCR	
	<400>	16	
		ccgcgatatg atcgataccg	20
15	<210>	17	
	<211>	25	
	<212>	ADN	
	<213>	ADN artificial	
	<220>		
20	<223>	cebador CbpIII014-3' de PCR	
	<400>	17	
		ggaaaggaaa cagacagcta cagat	25
	<210>	18	
	<211>	20	
25	<212>	ADN	
	<213>	ADN artificial	
	<220>		
	<223>	cebador GSS01-5' de PCR	
	<400>	18	
30		gtgaaggcca cacgatgtgc	20
	<210>	19	
	<211>	20	
	<212>	ADN	
	<213>	ADN artificial	
35	<220>		
	<223>	cebador GSS01-3' de PCR	

ES 2 376 300 T3

<400> 19
cttgatgaag ggccttccaa 20

<210> 20
 <211> 20
 5 <212> ADN
 <213> ADN artificial
 <220>
 <223> cebador Lr101-5' de PCR
 <400> 20
 10 **cgcggggtgga gtccattatc** 20

<210> 21
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> ADN artificial
 15 <220>
 <223> cebador Lr101-3' de PCR
 <400> 21
ccaacatagg ctgccattcc 20

<210> 22
 20 <211> 1499
 <212> ADN
 <213> *Triticum aestivum*
 <220>
 <221> misc_feature
 25 <223> región no transcrita, gen WaxyD1
 <400> 22
cgcgccctg gctcaccagt atgatggccg gcgcgcacgt gctcgcgcgc accagccgct 60

ES 2 376 300 T3

tcgagccctg cggcctcctc cagctccagg ggatgcgcta cggaacggta aacttttctt 120
tcttgccaag tcttacttc ctgagcaatc atgagccatg cccatgaccg aagtttcttc 180
caaattttca gccgtgcgcg tgcgcgtcca cggcggggtt tgtcgacacg atcgtggagg 240
gcaagaccgg gttccacatg ggccggctca gtgtcgatgt aagttcatca atctcttcaa 300
taaattcttc atcttgttca tcttgggagc tcaggcagat catcaaaccg gtttctttt 360
tctctttggt ggccagtgca acgtggtgga gccggccgac gtgaagaagg tggtgaccac 420
cctgaagcgc gccgtcaagg tcgtcggcac gccggcatac catgagatgg tcaagaactg 480
catgatacag gatctctctt ggaaggtaag tcagtctctg gtctggttta ggatgcattt 540
tccagaacaa ctaagagtta agactacaat ggtgctcttg ttcgatgtat ccattaatgg 600
tggcttgcgc atatggtgca ggggccagcc aagaactggg aggacgtgct tctggaactg 660
ggtgtcgagg ggagcgagcc gggggtcctc gccgaggaga ttgcgcctgt cggcatggag 720
aacgtgcctg ctccctgaag agagaaagaa aaggaagttc tggtgcatgg agcgtccctc 780
cagtctgcag gtttctctga tggggagata gccgcttgtt gtacggaaga agggccgata 840
tatataatat atagacttat aagtacttaa cttttgttgt gccgcttgc tcttttacia 900
acaaaaaaga agttaggggt tgtgcttgtt atagtgtgct gaactgtgct tgcattttgg 960
tgtggtatat tgcaataaac aaaggatttg ttatgtgttt ttgctattgg ttctccgtgt 1020
ttgagccgaa tcaagttatt ttgtgggggt ttcaaaggta catttttgtg ttcttggagg 1080
tggcagcttc ggtcgcagga acagaggtgt tcaaggcggc cgaaataggt tgcgcctgc 1140
ggcggaatcg ccaccaccg tgaagttcac cgtttcgcaa tggaggaaca cctaggtgta 1200
agtttcaaaa tggcggcgcg atgaccgcca agatcaatgc gacacaacca ggaaatgaca 1260
gatgaccgcc aagatcaacg cacacaacaa atgacgcaag gggagcgtat atggtgaaa 1320
cagcttcact attttcttg ctagtacagt actacttgtt cagtttctg ttaaactgtg 1380
agtctgtgac gcgctaaact tatttaatga gttgtgcagc agcaacttat ttaatgtaag 1440
tcatgcaaag aggccagctt ctaaatactt cctaaaatac aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1499

<210> 23

<211> 22

<212> ADN

5 <213> ADN artificial

<220>

<223> cebador WxS01-5' de PCR

<400> 23

aaaaggaagt tctggtgcat gg

22

10 <210> 24

<211> 17
 <212> ADN
 <213> ADN artificial
 <220>
 5 <223> CbpIII013-5'
 <400> 24
 ctggccacat ggtcccc 17
 <210> 25
 <211> 17
 10 <212> ADN
 <213> ADN artificial
 <220>
 <223> cebador CbpIII013-3' de PCR
 <400> 25
 15 acgtcgtcgc tggctcc 17
 <210> 26
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> ADN artificial
 20 <220>
 <223> TthV011-5'
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> TthV011-5'
 25 <400> 26
 agagtgcgat cgtgtgccta 20
 <210> 27
 <211> 26
 <212> ADN
 30 <213> ADN artificial
 <220>
 <223> cebador TthV011-3' de PCR
 <400> 27
 tggagctatg cttcatgatt gcctaa 26
 35 <210> 28
 <211> 20

ES 2 376 300 T3

<212> ADN
 <213> ADN artificial
 <220>
 <223> cebador TthV012-5' de PCR
 5 <400> 28
 caggtgcaag tagagggcgt 20
 <210> 29
 <211> 21
 <212> ADN
 10 <213> ADN artificial
 <220>
 <223> cebador TthV012-3' de PCR
 <400> 29
 tctgcgcact ggaacactgt a 21
 15 <210> 30
 <211> 111
 <212> ADN
 <213> *Triticum aestivum*
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <223> gs002, Genome Survey Sequence
 <400> 30
 gctgcaatga gcatgtcgtg catgctgaa gggcacacga tgtgcacgcg ctggtgagg 60
 cgcccgcaga atcggcgatg gctgctagtt acagcggaac acgccaaca c 111
 <210> 31
 25 <211> 111
 <212> ADN
 <213> *Triticum aestivum*
 <220>
 <221> misc_feature
 30 <223> gs003, Genome Survey Sequence
 <400> 31
 cggaacacgc caaacacaga tgttgaagg cccttcacga agctgtcagc aaactgggag 60
 ttggtgggga tgtgttgac acggacttca ccaagagcag cgaactcccg a 111
 <210> 32

ES 2 376 300 T3

<211> 111
 <212> ADN
 <213> *Triticum aestivum*
 <220>
 5 <221> misc_feature
 <223> Lr102, gen Lr1
 <400> 32
 tggcagccta tgttgatca tgctaagaag tctgccccgg cctggcaaag aggcctcacc 60
 catcgccctg gacggctcgt tttggtcaaa tcagtgattg cggctaaacc c . 111
 <210> 33
 10 <211> 111
 <212> ADN
 <213> *Triticum aestivum*
 <220>
 <221> misc_feature
 15 <223> Lr103, gen Lr1
 <400> 33
 gtctgggaat ccgcaacctt cagttgcaag gtttggcggt gagagtgaga tgggaatgat 60
 tgagacggac tgatccggag aggccatggc aaggcctccg atggcagtag a 111
 <210> 34
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> ADN artificial
 <220>
 <223> cebador gss02-5' de PCR
 <400> 34
 25 gctgcaatga gcatgtcgtg 20
 <210> 35
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> ADN artificial
 30 <220>
 <223> cebador gss02-3' de PCR
 <400> 35
 gtgtttggcg tgttccgct 19
 <210> 36

ES 2 376 300 T3

<211> 20
 <212> ADN
 <213> ADN artificial
 <220>
 5 <223> cebador gss03-5' de PCR
 <400> 36
cggaacacgc caaacacaga 20
 <210> 37
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> ADN artificial
 <220>
 <223> cebador gss03-3' de PCR
 <400> 37
 15 **tcgggagttc gctgctcttg** 20
 <210> 38
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> ADN artificial
 20 <220>
 <223> cebador Lr102-5' de PCR
 <400> 38
tggcagccta tgttgatca 20
 <210> 39
 25 <211> 20
 <212> ADN
 <213> ADN artificial
 <220>
 <223> cebador Lr102-3' de PCR
 30 <400> 39
gggtttagec gcaatcactg 20
 <210> 40
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> ADN artificial
 <220>

ES 2 376 300 T3

<223> cebador Lr103'-5' de PCR
<400> 40
gtctggaat ccgcaacctt 20

<210> 41
5 <211> 20
<212> ADN
<213> ADN artificial
<220>
<223> cebador Lr103-3' de PCR
10 <400> 41
tctactgcca tcggaggcct 20

<210> 42
<211> 23
<212> ADN
15 <213> ADN artificial
<220>
<223> sonda de PCR para la detección de Wx102
<400> 42
caaggcggcc gaaatagggt gcc 23

20

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para detectar o cuantificar ADN de trigo endógeno en una muestra de ensayo usando PCR, que comprende:
 - 5 una etapa de amplificación de un ácido nucleico de una región que comprende al menos un 80% o más de una secuencia nucleotídica representada por la SEC ID N°:3 o la SEC ID N°:4, usando un ácido nucleico en dicha muestra o ácido nucleico extraído de dicha muestra como molde con un par cebador capaz de amplificar dicha región, y
 - detectar o cuantificar el ácido nucleico amplificado.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el par cebador se selecciona del grupo que consiste en:
 - (i) un par cebador constituido por un ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica representada por la SEC ID N°:12 y un ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica representada por la SEC ID N°:13,
 - (ii) un par cebador constituido por un ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica representada por la SEC ID N°:14 y un ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica representada por la SEC ID N°: 15, y
 - 15 (iii) pares cebadores constituidos por pares de ácidos nucleicos que comprenden cada uno la secuencia continua de al menos un 80% de la secuencia nucleotídica de un ácido nucleico del par cebador (i) o (ii).
3. El procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que los cebadores en el par cebador son ácidos nucleicos de 15 a 40 nucleótidos de longitud.
4. Un par cebador para detectar o cuantificar trigo en una muestra de ensayo por PCR, en el que dicho par cebador es capaz de amplificar una región constituida por al menos un 80% de una secuencia nucleotídica representada por la SEC ID N°:3 o la SEC ID N°:4.
- 20 5. El par cebador según la reivindicación 4, seleccionado del grupo que consiste en:
 - (i) un par cebador constituido por un ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica representada por la SEC ID N°:12 y un ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica representada por la SEC ID N°:13,
 - 25 (ii) un par cebador constituido por un ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica representada por la SEC ID N°:14 y un ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica representada por la SEC ID N°: 15, y
 - (iii) pares cebadores constituidos por pares de ácidos nucleicos que comprenden cada uno la secuencia continua de al menos un 80% de la secuencia nucleotídica de un ácido nucleico del par cebador (i) o (ii).
6. Un kit para la detección o ensayo de una secuencia de ADN de trigo endógeno en una muestra de ensayo por PCR, que comprende un par cebador según la reivindicación 4 o 5.
- 30 7. Un procedimiento para determinar la velocidad de mezclado de trigo modificado genéticamente en una muestra de ensayo, que comprende:
 - efectuar una PCR cuantitativa usando, como moldes, un ADN circular que comprende una región que está constituida por al menos el 80% de una secuencia nucleotídica representada por SEC ID N° 3 o SEC ID N° 4 capaz de ser amplificada por PCR usando un par cebador de acuerdo con la Reivindicación 4 ó 5 y ADN extraído de la muestra de ensayo;
 - 35 preparar una curva de calibración para determinar el número de moléculas de ADN molde, usando los resultados de la PCR cuantitativa para ADN circular;
 - determinar el número de moléculas que tienen una secuencia parcial de un ADN de trigo endógeno y el número de moléculas que tienen una secuencia parcial de una secuencia de ADN presente específicamente en al menos una clase de trigo modificado genéticamente contenida en la muestra de ensayo, usando la curva de calibración y los resultados de la PCR cuantitativa para la muestra de ensayo, y
 - 40 determinar la velocidad de mezclado A obtenida dividiendo el número de moléculas que tienen una secuencia parcial de una secuencia de ADN presente específicamente en el trigo modificado genéticamente entre el número de moléculas que tienen una secuencia parcial de una secuencia de ADN de trigo endógeno.
 - 45
8. El procedimiento según la reivindicación 7, que comprende adicionalmente
 - determinar la velocidad de mezclado de trigo modificado genéticamente en una muestra calculando la fórmula $100 \times A/B$, usando la relación A y la relación B obtenida dividiendo el número de moléculas obtenido por PCR cuantitativa usando como molde ADN extraído de semillas patrón de trigo modificado genéticamente, que tienen una secuencia

parcial de una secuencia de ADN presente específicamente en una estirpe particular de trigo modificado genéticamente, entre el número de moléculas que tienen una secuencia parcial de una secuencia de ADN de trigo endógeno.

5 9. Un procedimiento según la reivindicación 7 u 8, en el que se usa en dicha PCR cuantitativa al menos un par cebador seleccionado de los pares cebadores descritos en la reivindicación 4 o 5.

10. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 – 9, en el que el ADN circular comprende adicionalmente uno o más trozos de ADN que comprenden cada uno una secuencia particular de una estirpe de trigo modificado genéticamente.

Figura 1



Figura 2



Figura 3

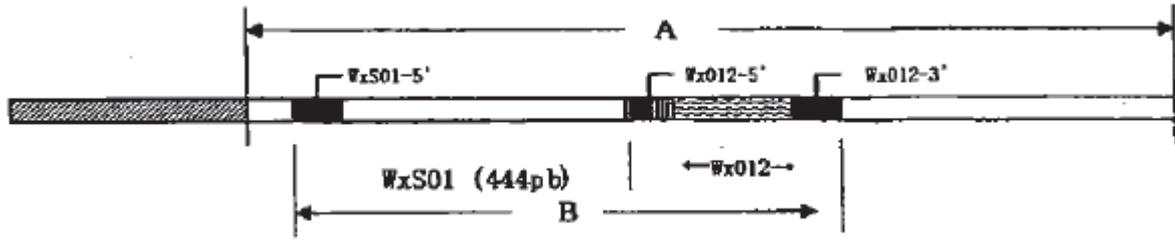


Figura 4

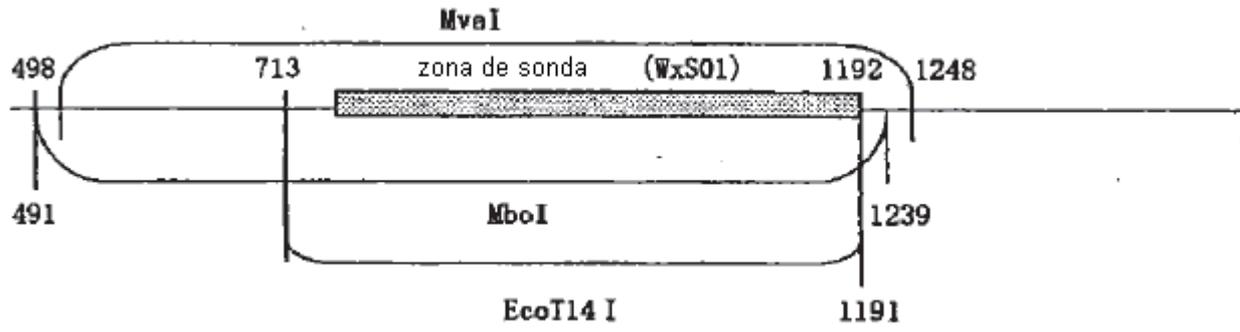


Figura 5



Figura 6



Figura 7



Figura 8

