

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 548**

51 Int. Cl.:
C12N 15/82 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06724339 .4**
96 Fecha de presentación: **04.04.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1869187**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.12.2007**

54 Título: **Suceso de élite A2704-12 y métodos y estuches para identificar a dicho suceso en muestras biológicas**

30 Prioridad:
08.04.2005 EP 05075833
11.04.2005 US 670213 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.10.2012

73 Titular/es:
Bayer CropScience NV
J.E. Mommaertsiaan 14
1831 Diegem, BE

72 Inventor/es:
DE BEUCKELEER, Marc

74 Agente/Representante:
Lehmann Novo, Isabel

ES 2 388 548 T3

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

DESCRIPCIÓN

Suceso de élite A2704-12 y métodos y estuches para identificar a dicho suceso en muestras biológicas

Campo del invento

5 Este invento pertenece a métodos y estuches para identificar en muestras biológicas a la presencia de un material vegetal que comprende específicamente el suceso de transformación A2704-12, así como a plantas de soja transgénicas, a un material de plantas y a unas semillas que contienen dicho suceso. Las plantas de soja del invento combinan el fenotipo de tolerancia a herbicidas con un rendimiento agronómico, una estabilidad genética y una adaptabilidad a diferentes trasfondos genéticos que son equivalentes al linaje de planta de soja 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 y por su localización en el genoma de la planta. Al mismo tiempo, la presencia del transgén (en un ADN ajeno) en diferentes localizaciones en el genoma influirá sobre el fenotipo global de la planta de diferentes maneras. La introducción con éxito desde un punto 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 plantas transformadas genéticamente son solamente las primeras en una serie de etapas de selección, que incluyen extensos procesos de caracterización genética, crianza y evaluación en pruebas realizadas en el campo, conduciendo finalmente a la selección de un suceso de élite.

20 La identificación inequívoca de un suceso de élite se está volviendo crecientemente importante a la vista de discusiones acerca de nuevos productos de piensos y alimentos, segregación de productos de GMO (organismos modificados genéticamente) y que no son de GMO y la identificación de un material patentado. Idealmente, dicho método de identificación es a la vez rápido y sencillo, sin la necesidad de una extensa organización de laboratorio. Además, el método deberá proporcionar unos resultados que permitan una determinación inequívoca del suceso de élite sin ninguna interpretación por expertos, pero que se mantengan bajo escrutinio de los expertos si fuese necesario.

25 El A2704-12 se seleccionó como un suceso de élite en el desarrollo de plantas de soja (*Glycine max L.*) resistentes al herbicida Liberty®, por transformación de una planta de soja con un plásmido que comprende el gen *pat* sintético que codifica una tolerancia a fosfotricina, y que se puede vender comercialmente como una planta de soja Liberty Link®. Se describen aquí las herramientas para el uso en métodos simples e inequívocos para la identificación del suceso de élite A2704-12 en muestras biológicas.

30 Sumario del invento

35 El presente invento se refiere a unos métodos para la identificación del suceso de élite A2704-12 en muestras biológicas, tal como se definen en las reivindicaciones, cuyos métodos están basados en unos cebadores o unas sondas que reconocen específicamente a las secuencias flanqueadoras en 5' y/o 3' del A2704-12 y al ADN ajeno contiguo a ellas.

40 En el presente invento, se proporciona un método para identificar al suceso de élite A2704-12 en muestras biológicas, cuyo método comprende la detección de una región específica para el A2704-12 que comprende una parte de la región de ADN flanqueadora en 5' o 3' del suceso de élite A2704-12 y una parte de la región de ADN ajeno contiguo a ella del suceso de élite A2704-12, con por lo menos dos cebadores específicos o con una sonda específica, en el que dicha región de ADN flanqueadora en 5' comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 1 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 209, dicha región de ADN ajeno contiguo a dicha región flanqueadora en 5' comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 1 desde el nucleótido 210 hasta el nucleótido 720, dicha región de ADN flanqueadora en 3' comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 2 desde el nucleótido 569 hasta el nucleótido 1000, y dicha región de ADN ajeno contiguo a dicha región flanqueadora en 3' comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 2 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 568, en el que dicha sonda específica comprende una secuencia de entre 50 y 500 pb (pares de bases) que es idéntica por lo menos en un 80 % a dicha región específica para el A2704-12 que comprende una parte de la región de ADN flanqueadora en 5' o 3' del suceso de élite A2704-12 y una parte de la región de ADN ajeno contiguo a ella del suceso de élite A2704-12; y en el que uno de dichos cebadores específicos es un nucleótido de por lo menos 10 a 30 nucleótidos, que reconoce a una parte de la región de ADN flanqueadora en 5' o 3' del suceso de élite A2704-12, y en el que uno de dichos cebadores específicos es un oligonucleótido de por lo menos 10 a 30 nucleótidos, que reconoce a una parte de la región de ADN ajeno del suceso de élite A2704-12, contiguo a dicha región flanqueadora en 5' o 3', y formas de realización de dicho método tal como aquí se reivindican.

También se proporciona aquí un estuche para identificar al suceso de élite A2704-12 en muestras biológicas, comprendiendo dicho estuche un cebador que reconoce a la región flanqueadora en 5' de A2704-12, teniendo dicha región flanqueadora en 5' la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 1 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 209, o un cebador que reconoce a la región flanqueadora en 3' de A2704-12, teniendo dicha región flanqueadora en 3' la secuencia de nucleótidos del complemento de SEQ ID NO. 2 desde el nucleótido 569 hasta el nucleótido 1000, y un cebador que reconoce a una secuencia situada dentro del ADN ajeno, teniendo dicho ADN ajeno la secuencia de nucleótidos del complemento de SEQ ID NO. 1 desde el nucleótido 210 hasta el nucleótido 720 o la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 2 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 568, en el que dicho cebador es un oligonucleótido de por lo menos 10 a 30 nucleótidos, así como formas de realización relacionadas tal como aquí se reivindican.

Además se proporciona aquí un par de cebadores para usarse en un protocolo de identificación por PCR del A2704-12, teniendo dicho primer cebador una secuencia que, en condiciones optimizadas de PCR, reconoce a una secuencia situada dentro de la región flanqueadora en 5' o 3' de A2704-12, teniendo dicha región flanqueadora en 5' la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 1 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 209 y teniendo dicha región flanqueadora en 3' la secuencia de nucleótidos del complemento de SEQ ID NO. 2 desde el nucleótido 569 hasta el nucleótido 1000, y teniendo dicho segundo cebador una secuencia que, en condiciones optimizadas de PCR, reconoce específicamente a una secuencia de la región de ADN ajeno del suceso de élite A2704-12 contiguo a dicha región flanqueadora en 5' o 3', en el que dicha región de ADN ajeno contiguo a dicha región flanqueadora en 5' comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 1 desde el nucleótido 210 hasta el nucleótido 720, y dicha región de ADN ajeno contiguo a dicha región flanqueadora en 3' comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 2 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 568, y en el que cada uno de dichos cebadores es un oligonucleótido de por lo menos 10 a 30 nucleótidos, así como formas de realización relacionadas como se reivindican aquí.

De acuerdo con este invento se proporciona también un estuche para identificar al suceso de élite A2704-12 en muestras biológicas, comprendiendo dicho estuche una sonda específica, capaz de hibridarse específicamente con una región específica del A2704-12, en el que dicha sonda específica comprende una secuencia de entre 50 y 500 pb que tiene una identidad entre secuencias de por lo menos un 80 % con una secuencia que comprende una parte de la secuencia flanqueadora en 5' o la secuencia flanqueadora en 3' de A2704-12 y la secuencia del ADN ajeno contiguo a ella, en el que dicha secuencia flanqueadora en 5' comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 1 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 209, el ADN ajeno contiguo a ella comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 1 desde el nucleótido 210 hasta el nucleótido 720, y en el que dicha secuencia flanqueadora en 3' comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 2 desde el nucleótido 569 hasta el nucleótido 1000, y el ADN ajeno contiguo a ella comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 2 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 568, así como formas de realización relacionadas tal como aquí se reivindican.

Incluso adicionalmente se proporciona aquí una sonda específica para la identificación del suceso de élite A2704-12 en muestras biológicas, que comprende una secuencia de entre 50 y 500 pb que tiene una identidad entre secuencias de por lo menos un 80 % con una secuencia que comprende una parte de la secuencia flanqueadora en 5' o la secuencia flanqueadora en 3' de A2704-12 y la secuencia del ADN ajeno contiguo a ella, o el complemento de la misma, en el que dicha secuencia flanqueadora en 5' comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 1 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 209, el ADN ajeno contiguo a ella comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 1 desde el nucleótido 210 hasta el nucleótido 720, y en el que dicha secuencia flanqueadora en 3' comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 2 desde el nucleótido 569 hasta el nucleótido 1000, y el ADN ajeno contiguo a ella comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 2 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 568, así como formas de realización relacionadas tal como aquí se reivindican.

También se proporciona aquí el uso de los/las anteriores pares de cebadores o sondas, en un método para confirmar la pureza de las semillas en muestras de semillas, o en un método para escrutar semillas en cuanto a la presencia del A2704-12 en muestras de lotes de semillas.

Más específicamente, el invento se refiere a un método que comprende la amplificación de una secuencia de un ácido nucleico presente en muestras biológicas, usando una reacción en cadena de la polimerasa (PCR, acrónimo de Polymerase Chain Reaction), con por lo menos dos cebadores, en el que uno de dichos cebadores es un oligonucleótido de por lo menos 10 a 30 nucleótidos que reconoce a una parte de la región de ADN flanqueadora en 5' o 3' del suceso de élite A2704-12, y en el que uno de dichos cebadores es un oligonucleótido de por lo menos 10 a 30 nucleótidos que reconoce a una parte de la región de ADN ajeno del suceso de élite A2704-12 contiguo a dicha región flanqueadora 5' o 3', tal como por lo menos dos de dichos cebadores, uno de los cuales reconoce a la región flanqueadora en 5' o 3' del A2704-12, y el otro de los cuales reconoce a una secuencia situada dentro del ADN ajeno, preferiblemente para obtener un fragmento de ADN de entre 100 y 500 pb. Los cebadores pueden reconocer a una secuencia situada dentro de la región flanqueadora en 5' del A2704-12 (SEQ ID NO. 1, desde la posición 1 hasta la posición 209), o dentro de la región flanqueadora en 3' del A2704-12 (complemento de SEQ ID NO. 2 desde la posición 569 hasta la posición 1000) y una secuencia situada dentro del ADN ajeno (complemento de SEQ ID NO. 1 desde la posición 210 hasta la posición 720 o de SEQ ID NO. 2 desde la posición 1 a la posición 568), respectivamente. El cebador que reconoce a la región flanqueadora en 5' puede comprender la secuencia de

nucleótidos de SEQ ID NO.4 y el cebador que reconoce una secuencia situada dentro del ADN ajeno puede comprender la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 8 que aquí se describe.

5 El presente invento se refiere más específicamente a un método para identificar al suceso de élite A2704-12 en muestras biológicas, cuyo método comprende amplificar una secuencia de un ácido nucleico que está presente en una muestra biológica, usando una reacción en cadena de la polimerasa con dos cebadores que tienen la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 4 y de SEQ ID NO. 8 respectivamente, para obtener un fragmento de ADN de aproximadamente 185 pb.

10 El presente invento se refiere además a las secuencias flanqueadoras específicas de A2704-12 y al ADN ajeno contiguo a ellas que aquí se han descrito, que se pueden usar para desarrollar unos métodos de identificación específicos para el A2704-12 en muestras biológicas. Más particularmente, el invento se refiere a las regiones flanqueadoras en 5' y/o en 3' del A2704-12 y al ADN ajeno contiguo a ellas, que se puede usar para el desarrollo de cebadores y sondas específicos/as tal como aquí se han descrito adicionalmente. El invento se refiere además a unos métodos de identificación en cuanto a la presencia del A2704-12 en muestras biológicas basándose en el uso de dichos/as cebadores o sondas específicos/as. Los cebadores son por lo menos de 10 a 30 nucleótidos y pueden consistir en una secuencia de nucleótidos de 17 a aproximadamente 200 nucleótidos consecutivos seleccionados entre la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 1 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 209 o el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 2 desde el nucleótido 569 hasta el nucleótido 1000 combinado con unos cebadores que consisten en una secuencia de nucleótidos de 17 a aproximadamente 200 nucleótidos consecutivos seleccionados entre el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 1 desde el nucleótido 210 hasta el nucleótido 720 o la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 2 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 569. Los cebadores pueden comprender también estas secuencias de nucleótidos situadas en su extremo 3' final, y comprender además unas secuencias no relacionadas o unas secuencias derivadas de las mencionadas secuencias de nucleótidos, pero que comprenden unos malos emparejamientos.

25 El invento se refiere además a unos estuches para identificar al suceso de élite A2704-12 en muestras biológicas, comprendiendo dichos estuches por lo menos dos cebadores o por lo menos una sonda que reconoce específicamente a la región flanqueadora en 5' o 3' del A2704-12 y al ADN ajeno contiguo a ella, tal como se definen en las reivindicaciones.

30 El estuche del invento comprende, además de un cebador que reconoce específicamente a la región flanqueadora en 5' o 3' del A2704-12, un segundo cebador que reconoce específicamente a una secuencia situada dentro del ADN ajeno de A2704-12, para usarse en un protocolo de identificación por PCR, en el que cada uno de dichos cebadores es por lo menos de 10 a 30 nucleótidos. Preferiblemente, el estuche del invento comprende dos de dichos cebadores específicos, uno de los cuales reconoce a una secuencia situada dentro de la región flanqueadora en 5' de A2704-12, y el otro de los cuales reconoce a una secuencia situada dentro del ADN ajeno. Especialmente, el cebador que reconoce a la región flanqueadora en 5' puede comprender la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 4 y el cebador que reconoce al transgén puede comprender la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 8 o cualquier otro cebador que aquí se describa.

El invento se refiere además a un estuche para identificar al suceso de élite A2704-12 en muestras biológicas, comprendiendo dicho estuche los cebadores de PCR que tienen las secuencias de nucleótidos de SEQ ID No. 4 y de SEQ ID No. 8 para usarse en el protocolo de identificación por PCR del A2704-12 que aquí se describe.

40 El invento se refiere también a un estuche para identificar al suceso de élite A2704-12 en muestras biológicas, cuyo estuche comprende una sonda específica que comprende una secuencia de entre 50 y 500 pb que tiene una secuencia que corresponde a (o es complementaria con) una secuencia que tiene una identidad entre secuencias entre un 80 % y un 100 % con una región específica del A2704-12 que comprende una parte de la región flanqueadora en 5' o 3' del A2704-12 y una parte del ADN ajeno contiguo a ellas. De manera sumamente preferible, la sonda específica comprende una secuencia de entre 50 y 500 pb y tiene (o es complementaria con) una secuencia que tiene una identidad entre secuencias entre un 80 % y un 100 % con la secuencia situada entre los nucleótidos 160 y 260 de SEQ ID No. 1 o con la secuencia situada entre los nucleótidos 520 y 620 de SEQ ID No 2 .

50 Los métodos y estuches abarcados por el presente invento se pueden usar para diferentes finalidades, tales como, pero sin limitarse a, las siguientes: para identificar la presencia o ausencia del A2704-12 en plantas, en un material de plantas o en productos tales como, pero sin limitarse a, productos de piensos o alimentos (frescos o procesados) que comprenden o se derivan de un material de plantas; de manera adicional o alternativa, los métodos y los estuches del presente invento se pueden usar para identificar un material de planta transgénica para las finalidades de segregación entre un material transgénico y un material no transgénico; de manera adicional o alternativa, los métodos y 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 el A2704-12.

El invento se refiere además a los cebadores y a las sondas específicos/as desarrollados/as a partir de las secuencias flanqueadoras en 5' y/o 3' de A2704-12 y del ADN ajeno contiguo a ellas.

El invento se refiere también a un amplicón discriminador que identifica específicamente al suceso de élite A2704-12 de soja, cuyo amplicón es obtenible a partir de una muestra de ácido nucleico que comprende dicho suceso de élite por medio de una PCR usando un cebador que reconoce específicamente a una secuencia situada dentro de la región flanqueadora en 5' o 3' del suceso de élite y un cebador que reconoce específicamente al ADN ajeno contiguo a ella, en el que dicha región flanqueadora en 5' comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 209, el ADN ajeno contiguo a ella comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 1 desde el nucleótido 210 hasta el nucleótido 720, y en el que dicha región flanqueadora en 3' comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 569 hasta el nucleótido 1000, y el ADN ajeno contiguo a ella comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 568, y en el que dicho cebador específico es un oligonucleótido de por lo menos 10 a 30 nucleótidos. Unas plantas de soja, partes de las mismas, células, semillas y plantas de progenie que comprenden el suceso de élite A2704-12 se pueden identificar usando los métodos que aquí se describen.

15 **Descripción detallada**

La incorporación de una molécula de ADN recombinante en el genoma de una planta resulta típicamente de la transformación de una célula o de un tejido (o de otra manipulación genética). El sitio particular de incorporación es o bien debido a una integración "aleatoria" o está en una localización previamente determinada (si se usa un proceso de integración dirigida a una diana).

20 El ADN introducido en el genoma de la planta como un resultado de la transformación de una célula o de un tejido de planta con un ADN recombinante o "ADN transformante", y que se origina a partir de dicho ADN transformante, es citado en lo sucesivo como un "ADN ajeno" que comprende uno o más "transgenes". Un "ADN de planta" en el contexto del presente invento se referirá a un ADN que se origina a partir de la planta que está siendo transformada. El ADN de planta se encontrará usualmente en el mismo locus (lugar) genético en la correspondiente planta de tipo silvestre. 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 insertado un ADN recombinante es citado también como "sitio de inserción" o "sitio diana". La inserción del ADN recombinante dentro del genoma de la planta puede ser asociada con una delección (supresión) de ADN de planta, a la que se hace referencia como "delección del sitio diana". Una "región flanqueadora" o "secuencia flanqueadora" tal como se usa en el presente contexto, se refiere a una secuencia de por lo menos 20 pb, preferiblemente de por lo menos 50 pb, y hasta de 5.000 pb del genoma de la planta, que está situada o bien inmediatamente corriente arriba de y contigua a o inmediatamente corriente debajo de y contigua al 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 es introducido en una planta mediante un cruce tradicional, su sitio de inserción en el genoma de la planta o sus regiones flanqueadoras no se cambiarán generalmente. Una "región de inserción", tal como se usa aquí, se refiere a la región que corresponde a la región de por lo menos 40 pb, de manera preferible de por lo menos 100 pb, y hasta de 10.000 pb, que está abarcada por la secuencia que comprende la región flanqueadora secuencia arriba y/o la región flanqueadora secuencia abajo de un ADN ajeno en el genoma de la planta. Tomando en consideración unas diferencias secundarias debidas a mutaciones dentro de una especie, una región de inserción retendrá, después de haberse cruzado para dar una planta de la misma especie, una identidad entre secuencias de por lo menos un 85 %, preferiblemente de un 90 %, más preferiblemente de un 95%, y de manera sumamente preferible de 100 % con la secuencia que comprende las regiones flanqueadoras corriente arriba y corriente abajo del ADN ajeno en la planta obtenida originalmente a partir de una transformación.

45 Un suceso es definido como un locus genético (artificial) que, como un resultado de una transformación por ingeniería genética, es portador de un transgén que comprende por lo menos una copia de un gen que interesa. Los estados alélicos típicos de un suceso son la presencia o ausencia del ADN ajeno. Un suceso es caracterizado fenotípicamente por la expresión del transgén. Al nivel genético, un suceso es una parte de la constitución genética de una planta. Al nivel molecular, un suceso puede ser caracterizado por el mapa de restricción (p.ej. tal como se determina mediante una transferencia de borrón Southern), por las secuencias flanqueadoras corriente arriba y/o corriente abajo del transgén, la localización de los marcadores moleculares y/o la configuración molecular del transgén. Usualmente una transformación de una planta con un ADN transformante que comprende por lo menos un gen que interesa, conduce a una multitud de sucesos, cada uno de los cuales es único en su género.

55 Un suceso de élite, tal como se usa en el presente contexto, es un suceso que se selecciona entre un grupo de sucesos, obtenidos por transformación en el mismo ADN transformante o por cruce de retorno con plantas obtenidas por dicha transformación, basándose en la expresión y la estabilidad del (de los) transgén(es) y su compatibilidad con características agronómicas óptimas de la planta que los comprende. 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:

- a) Que la presencia del ADN ajeno no compromete a otras deseadas características de la planta, tales como las que se relacionan con el rendimiento agronómico o el valor comercial;
- b) Que el suceso está caracterizado por una configuración molecular bien definida que es heredada establemente y para la que se pueden desarrollar unas herramientas apropiadas para el control de la identidad;
- 5 c) Que el (los) gen(es) que interesa(n) muestra(n) una expresión fenotípica espacial y temporal correcta, apropiada y estable, tanto en una condición heterocigótica (o hemicigótica) y homocigótica del suceso, a un nivel comercialmente aceptable en una gama de condiciones ambientales en las que es probable que las plantas portadoras del suceso sean expuestas a un uso agronómico normal.

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

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

15 Un "suceso de élite" se refiere por lo tanto 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.

20 Las herramientas desarrolladas para identificar un suceso de élite, o la planta, el material de planta que comprende un suceso de élite, o 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 o las secuencias de la (las) región(es) flanqueadora(s) del ADN ajeno.

25 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 al suceso de élite en muestras biológicas (tales como muestras de plantas, un material de planta o productos que comprenden el material de planta). Dicha PCR está basada en por lo menos dos "cebadores" específicos, uno que reconoce a una secuencia situada dentro de la región flanqueadora en 5' o 3' del suceso de élite y el otro que reconoce a una secuencia situada dentro del ADN ajeno. Los cebadores tienen preferiblemente una secuencia de entre 15 y 35 nucleótidos que en condiciones optimizadas de PCR "reconocen específicamente" a una secuencia situada dentro de la región flanqueadora en 5' o 3' del suceso de élite y el ADN ajeno del suceso de élite respectivamente, de manera tal que un fragmento específico ("fragmento de integración" o amplicón discriminante) 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 en el genoma de la planta o en el ADN ajeno, se amplifica en condiciones optimizadas de PCR.

35 Unos cebadores de PCR apropiados para el invento pueden ser los siguientes:

- unos oligonucleótidos que fluctúan en longitud desde 17 nt (nucleótidos) hasta aproximadamente 210 nt, que comprenden una secuencia de nucleótidos de por lo menos 17 nucleótidos consecutivos, preferiblemente 20 nucleótidos consecutivos, seleccionados entre la secuencia flanqueadora en 5' (SEQ ID No 1 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 209) en su extremo 3' (cebadores que reconocen a secuencias flanqueadoras en 5'); o
- 40 - unos oligonucleótidos que fluctúan en longitud desde 17 nt hasta aproximadamente 450 nt, que comprenden una secuencia de nucleótidos de por lo menos 17 nucleótidos consecutivos, preferiblemente 20 nucleótidos consecutivos, seleccionados entre la secuencia flanqueadora en 3' (el complemento de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 569 hasta el nucleótido 1000) en su extremo 3' (cebadores que reconocen a secuencias flanqueadoras en 3'); o
- 45 - unos oligonucleótidos que fluctúan en longitud desde 17 nt hasta aproximadamente 510 nt, que comprenden una secuencia de nucleótidos de por lo menos 17 nucleótidos consecutivos, preferiblemente 20 nucleótidos, seleccionados entre las secuencias de ADN insertadas (el complemento de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 210 hasta el nucleótido 720) en su extremo 3' (cebadores que reconocen a un ADN ajeno) o
- 50 - unos oligonucleótidos que fluctúan en longitud desde 17 nt hasta aproximadamente 570 nt, que comprenden una secuencia de nucleótidos de por lo menos 17 nucleótidos consecutivos, preferiblemente 20 nucleótidos, seleccionados entre las secuencias de ADN insertadas (SEQ ID No 2 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 569).

55 Los cebadores, desde luego, pueden ser más largos que los mencionados 17 nucleótidos consecutivos, y pueden tener una longitud p.ej. de 20, 21, 30, 35, 50, 75, 100, 150 o 200 nt, o pueden incluso ser más largos. Los cebadores pueden consistir por entero en una secuencia de nucleótidos seleccionada entre las secuencias de nucleótidos de

- secuencias flanqueadoras y secuencias de ADN ajeno que se mencionan. Sin embargo, la secuencia de nucleótidos de los cebadores en su extremo 5' (es decir fuera de los 17 nucleótidos consecutivos situados en 3') es menos crítica. Por lo tanto, la secuencia en 5' de los cebadores puede consistir en una secuencia de nucleótidos seleccionada entre las secuencias flanqueadoras o el ADN ajeno, según sea apropiado, pero pueden contener varios (p.ej. 1, 2, 5, 10 malos emparejamientos). La secuencia en 5' de los cebadores puede consistir incluso por entero en una secuencia de nucleótidos no relacionada con las secuencias flanqueadoras ni con el ADN ajeno, tal como p.ej. una secuencia de nucleótidos que representa a sitios de reconocimiento por enzimas de restricción. Dichas secuencias no relacionadas o secuencias de ADN flanqueadoras con malos emparejamientos deberían preferiblemente ser no más largas que 100, más preferiblemente no más largas que 50 o incluso que 25 nucleótidos.
- Además, unos cebadores apropiados pueden comprender o consistir en una secuencia de nucleótidos que en su extremo 3' franquea la región de unión entre las secuencias derivadas del ADN de planta y las secuencias de ADN ajeno (situadas en los nucleótidos 209-210 en SEQ ID No 1 y en los nucleótidos 568-569 en SEQ ID No 2) con la condición de que los mencionados 17 nucleótidos consecutivos situados en 3' no se deriven exclusivamente ni o bien del ADN ajeno o de las secuencias derivadas de la planta en SEQ ID No 1 o 2.
- Por lo tanto los cebadores de PCR apropiados para el invento pueden ser también los siguientes:
- unos oligonucleótidos que fluctúan en longitud desde 17 nt hasta aproximadamente 210 nt, que comprenden una secuencia de nucleótidos de por lo menos 17 nucleótidos consecutivos, preferiblemente 20 nucleótidos consecutivos, seleccionados entre SEQ ID No 1 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 215) en su extremo 3'; o
 - unos oligonucleótidos que fluctúan en longitud desde 17 nt hasta aproximadamente 450 nt, que comprenden una secuencia de nucleótidos de por lo menos 17 nucleótidos consecutivos, preferiblemente 20 nucleótidos consecutivos, seleccionados entre el complemento de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 554 hasta el nucleótido 1000) en su extremo 3'; o
 - unos oligonucleótidos que fluctúan en longitud desde 17 nt hasta aproximadamente 510 nt, que comprenden una secuencia de nucleótidos de por lo menos 17 nucleótidos consecutivos, preferiblemente 20 nucleótidos, seleccionados entre el complemento de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 195 hasta el nucleótido 720) en su extremo 3'; o
 - unos oligonucleótidos que fluctúan en longitud desde 17 nt hasta aproximadamente 570 nt, que comprenden una secuencia de nucleótidos de por lo menos 17 nucleótidos consecutivos, preferiblemente 20 nucleótidos, seleccionados entre SEQ ID No 2 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 584).

Quedará puesto en claro inmediatamente para un profesional experto que unos pares de cebadores de PCR apropiadamente seleccionados no deberían tampoco comprender secuencias complementarias entre ellas.

- Para la finalidad del invento, el "complemento de una secuencia de nucleótidos representada en SEQ ID No: X" es la secuencia de nucleótidos que se puede derivar de la secuencia de nucleótidos representada reemplazando los nucleótidos por su nucleótido complementario de acuerdo con las reglas de Chargaff ($A \leftrightarrow T$; $G \leftrightarrow C$) y leyendo la secuencia en la dirección de 5' a 3', es decir en una dirección opuesta a la secuencia de nucleótidos representada.

- Ejemplos de apropiados cebadores son las secuencias de oligonucleótidos de SEQ ID No 3, SEQ ID No 4, SEQ ID No 5 (cebadores que reconocen a una secuencia flanqueadora en 5'), SEQ ID No 6, SEQ ID No 7, SEQ ID No 8, SEQ ID No 9, SEQ ID No 10, SEQ ID No 11 (cebadores que reconocen a un ADN ajeno para usarse con los cebadores que reconocen a una secuencia flanqueadora en 5'), SEQ ID No 12, SEQ ID No 13, SEQ ID No 14, SEQ ID No 15 (cebadores que reconocen a un ADN ajeno para usarse con los cebadores que reconocen a secuencias flanqueadoras en 3'), SEQ ID No 16, SEQ ID No 17, SEQ ID No 18 o SEQ ID No 19 (cebadores que reconocen a la secuencia flanqueadora en 3').

- Otros ejemplos de apropiados cebadores de oligonucleótidos comprenden en su extremo 3' las siguientes secuencias o consisten en dicha secuencia:

- a. Cebadores que reconocen a una secuencia flanqueadora en 5'
- la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 23 hasta el nucleótido 42
 - la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 68 hasta el nucleótido 87
 - la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 69 hasta el nucleótido 87
 - la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 69 hasta el nucleótido 88
 - la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 134 hasta el nucleótido 153
 - la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 22 hasta el nucleótido 42
 - la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 30 hasta el nucleótido 49
 - la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 67 hasta el nucleótido 87
 - la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 70 hasta el nucleótido 87
 - la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 70 hasta el nucleótido 88
 - la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 76 hasta el nucleótido 95
 - la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 78 hasta el nucleótido 97

ES 2 388 548 T3

- el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 220 hasta el nucleótido 237
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 221 hasta el nucleótido 238
- 5 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 220 hasta el nucleótido 240

ES 2 388 548 T3

- el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 253 hasta el nucleótido 274
- 5 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 268 hasta el nucleótido 289
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 377 hasta el nucleótido 394
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 375 hasta el nucleótido 395
- 10 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 440 hasta el nucleótido 458
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 442 hasta el nucleótido 460
- 15 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 440 hasta el nucleótido 460
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 442 hasta el nucleótido 462
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 492 hasta el nucleótido 513
- 20 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 503 hasta el nucleótido 522
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 556 hasta el nucleótido 574
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 556 hasta el nucleótido 576
- 25 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 562 hasta el nucleótido 579
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 563 hasta el nucleótido 581
- 30 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 563 hasta el nucleótido 583
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 562 hasta el nucleótido 583
- 35 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 608 hasta el nucleótido 625
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 608 hasta el nucleótido 629
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 644 hasta el nucleótido 662
- 40 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 651 hasta el nucleótido 668
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 651 hasta el nucleótido 672
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 655 hasta el nucleótido 676
- 45 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 655 hasta el nucleótido 677
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 659 hasta el nucleótido 680
- 50 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 657 hasta el nucleótido 688
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 223 hasta el nucleótido 242
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 267 hasta el nucleótido 288
- 55 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 368 hasta el nucleótido 389
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 375 hasta el nucleótido 396
- 60 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 376 hasta el nucleótido 397
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 440 hasta el nucleótido 457
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 442 hasta el nucleótido 459
- 65

- el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 442 hasta el nucleótido 463
- 5 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 534 hasta el nucleótido 553
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 558 hasta el nucleótido 575
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 556 hasta el nucleótido 577
- 10 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 563 hasta el nucleótido 580
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 563 hasta el nucleótido 584
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 644 hasta el nucleótido 661
- 15 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 645 hasta el nucleótido 662
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 644 hasta el nucleótido 665
- 20 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 645 hasta el nucleótido 666
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 325 hasta el nucleótido 342
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 503 hasta el nucleótido 520
- 25 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 534 hasta el nucleótido 554
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 221 hasta el nucleótido 242
- 30 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 505 hasta el nucleótido 522
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 534 hasta el nucleótido 551
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 534 hasta el nucleótido 555
- 35 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 536 hasta el nucleótido 557
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 551 hasta el nucleótido 570
- 40 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 551 hasta el nucleótido 571
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 551 hasta el nucleótido 572

45 c. Cebadores que reconocen a una secuencia de ADN ajeno para usarse con cebadores que reconocen a una secuencia flanqueadora en 3':

- el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 955 hasta el nucleótido 974
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 955 hasta el nucleótido 973
- 50 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 955 hasta el nucleótido 972
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 958 hasta el nucleótido 975
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 958 hasta el nucleótido 977
- 55 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 917 hasta el nucleótido 934
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 947 hasta el nucleótido 968
- 60 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 951 hasta el nucleótido 968
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 951 hasta el nucleótido 972
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 958 hasta el nucleótido 976
- 65

- la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 241 hasta el nucleótido 261
- la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 243 hasta el nucleótido 261
- la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 244 hasta el nucleótido 261
- la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 240 hasta el nucleótido 261
- 5 - la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 126 hasta el nucleótido 145
- la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 208 hasta el nucleótido 225
- la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 124 hasta el nucleótido 145
- la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 75 hasta el nucleótido 94
- la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 231 hasta el nucleótido 250
- 10 - la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 243 hasta el nucleótido 262
- la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 230 hasta el nucleótido 250
- la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 232 hasta el nucleótido 250
- la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 242 hasta el nucleótido 262
- la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 244 hasta el nucleótido 262
- 15 - la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 229 hasta el nucleótido 250
- la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 241 hasta el nucleótido 262
- la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 245 hasta el nucleótido 262
- la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 287 hasta el nucleótido 306
- la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 288 hasta el nucleótido 306
- 20 - la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 230 hasta el nucleótido 247
- la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 285 hasta el nucleótido 306
- la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 289 hasta el nucleótido 306
- la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 282 hasta el nucleótido 303
- la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 288 hasta el nucleótido 307
- 25 - la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 287 hasta el nucleótido 307
- la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 289 hasta el nucleótido 307
- la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 286 hasta el nucleótido 307
- la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 290 hasta el nucleótido 307
- la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 229 hasta el nucleótido 248
- 30 - la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 230 hasta el nucleótido 248
- la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 227 hasta el nucleótido 248
- la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 231 hasta el nucleótido 248.

Tal como se usa en el presente contexto, "la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. Z desde la posición X a la posición Y" indica la secuencia de nucleótidos que incluye a ambos puntos extremos de nucleótidos.

- 35 Preferiblemente, el fragmento de integración tiene una longitud de entre 50 y 500 nucleótidos, de manera sumamente preferible de entre 100 y 350 nucleótidos. Los cebadores específicos pueden tener una secuencia que es idéntica entre un 80 % y un 100 % con una secuencia situada dentro de la región flanqueadora en 5' o 3' del suceso de élite y el ADN ajeno del suceso de élite, respectivamente, con la condición de que los malos emparejamientos permitan todavía una identificación específica del suceso de élite con estos cebadores en
- 40 condiciones optimizadas de PCR. La gama de malos emparejamientos permisibles, sin embargo, puede ser determinada experimentalmente, y éstos son conocidos para una persona experta en la especialidad.

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

Cebador 1	Desde la posición	Cebador 2	Hasta la posición	Longitud del amplicón
HCA148	12	KVM174	225	213
HCA148	12	KVM177	253	241
HCA148	12	DPA024	316	304
HCA148	12	MDB390	396	384
HCA148	12	HCA023	511	499
HCA148	12	DPA007	634	622
DPA021	134	KVM174	225	91
DPA021	134	KVM177	253	119
DPA021	134	DPA024	316	182
DPA021	134	MDB390	396	262
DPA021	134	HCA023	511	377
DPA021	134	DPA007	634	500
KVM176	187	KVM174	225	38
KVM176	187	KVM177	253	66
KVM176	187	DPA024	316	129

Cebador 1	Desde la posición	Cebador 2	Hasta la posición	Longitud del amplicón
KVM176	187	MDB390	396	209
KVM176	187	HCA023	511	324
KVM176	187	DPA007	634	447
YTP007	116	HCA074	628	512
YTP007	116	SMO017	667	551
YTP007	116	SMO027	710	594
YTP007	116	SMO033	867	751
MDB452	187	HCA074	628	441
MDB452	187	SMO017	667	480
MDB452	187	SMO027	710	523
MDB452	187	SMO033	867	680
HCA014	398	HCA074	628	230
HCA014	398	SMO017	667	269
HCA014	398	SMO027	710	312
HCA014	398	SMO033	867	469
MDB402	528	HCA074	628	100
MDB402	528	SMO017	667	139
MDB402	528	SMO027	710	182
MDB402	528	SMO033	867	339

La detección de fragmentos de integración puede realizarse de diversas maneras, p.ej. mediante estimación de los tamaños después de un análisis con un gel. Los fragmentos de integración pueden ser también secuenciados directamente. Otros métodos específicos para secuencias, destinados a la detección de fragmentos de ADN amplificados, son también conocidos en la especialidad.

Puesto que la secuencia de los cebadores y su localización relativa 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 A2704-12 en muestras desconocidas, se incluye un testigo de un conjunto de cebadores con los que se puede amplificar un fragmento situado dentro de un gen "de trabajos domésticos" (es decir que se expresa siempre de una manera constitutiva en todos los tejidos) de la especie de planta del suceso. Los genes de trabajos domésticos son unos genes que son expresados en la mayor parte de los tipos de células y que están implicados con actividades metabólicas básicas comunes a todas las células. Preferiblemente, el fragmento amplificado procedente del gen de trabajos domésticos es un fragmento que es de mayor tamaño que el fragmento de integración amplificado. Dependiendo de las muestras que se hayan de analizar, se pueden incluir otros testigos.

Unos protocolos de PCR clásicos se describen en la especialidad, tal como en el "PCR Applications Manual" [manual de aplicaciones de PCR] (Roche Molecular Biochemicals, 2ª edición, 1999). Las condiciones óptimas para la PCR, incluyendo la secuencia de los cebadores específicos, son especificadas 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 específicas de laboratorio, y que pueden ser modificados ligeramente para obtener resultados similares. Por ejemplo, el uso de un método diferente para la preparación de un ADN puede requerir un ajuste de, por ejemplo, la cantidad de cebadores, la polimerasa y las condiciones de reanillamiento usadas. Similarmente, la selección de otros cebadores puede imponer otras condiciones óptimas para el protocolo de identificación por PCR. Estos ajustes serán evidentes para una persona experta en la especialidad, y se detallan además en unos actuales manuales de aplicación de PCR, tal como el citado anteriormente.

Alternativamente, se pueden usar unos cebadores específicos para amplificar un fragmento de integración que se puede usar como una "sonda específica" para identificar al A2704-12 en muestras biológicas. La puesta en contacto de un ácido nucleico de una muestra biológica con la sonda, en unas condiciones que permiten la hibridación de la muestra 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 puede ser detectada (p.ej. por marcación del ácido nucleico o de la sonda), con lo que la formación de este híbrido indica la presencia del A2704-12. Dichos métodos de identificación que se basan en una hibridación con una sonda específica (ya sea sobre un vehículo de 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 situada dentro de la región flanqueadora en 5' o 3' del suceso de élite y que preferiblemente también comprende una parte del ADN ajeno contiguo a ella (seguidamente denominada como "región específica"). Preferiblemente, la sonda específica comprende una secuencia de entre 50 y 500 pb, preferiblemente de 100 a 350 pb que es idéntica (o complementaria) en por lo menos un 80 %, de manera preferible entre un 80 y un 85 %, de manera más preferible entre un 85 y un 90 %, de manera especialmente preferible entre un 90 y un 95 %, de manera sumamente preferida

entre un 95 % y un 100 % con la secuencia de nucleótidos de una región específica. Preferiblemente, la sonda específica comprenderá una secuencia de aproximadamente 15 a aproximadamente 100 nucleótidos contiguos, idéntica (o complementaria) con respecto a una región específica del suceso de élite.

5 Un “estuche” tal como se usa en el presente contexto, se refiere a un conjunto de reactivos destinados a la finalidad de realizar el método del invento, más particularmente, la identificación del suceso de élite A2704-12 en muestras biológicas. Más particularmente, una forma preferida de realización del estuche del invento comprende por lo menos uno o dos cebadores específicos, tal como más arriba se han descrito. Opcionalmente, el estuche puede comprender además cualquier otro reactivo aquí descrito en el protocolo de identificación por PCR. Alternativamente, de acuerdo con otra forma de realización de este invento, el estuche puede comprender una sonda específica, tal como más arriba se ha descrito, que se hibrida específicamente con un ácido nucleico de 10 muestras biológicas para identificar la presencia del A2704-12 en ella. 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 A2704-12 en muestras biológicas, usando la muestra específica.

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

Tal como se usa en el presente contexto, el concepto de “identidad entre secuencias” con respecto a 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 se realiza por el algoritmo de Wilbur y Lipmann (Wilbur y Lipmann, 1983, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 80:726) usando un tamaño de ventana de 20 nucleótidos, una longitud de palabra de 4 nucleótidos, y una penalidad por intersticio de 4. Un análisis asistido por ordenador y una interpretación de datos de secuencias, incluyendo una alineación de secuencias como antes se ha descrito, se pueden realizar p.ej. convenientemente usando el programa de la Intelligenetics TM Suite (de Intelligenetics Inc., CA) o el paquete de programa lógico para el análisis de secuencias del Genetics Computer Group (GCG, Centro de Biotecnología de la Universidad de Wisconsin). Las secuencias son indicadas como “esencialmente similares” cuando dichas secuencias tienen una identidad entre secuencias de por lo menos aproximadamente un 75 %, particularmente de por lo menos aproximadamente un 80 %, más particularmente de por lo menos aproximadamente un 85 %, bastante particularmente de aproximadamente un 90 %, especialmente de alrededor de un 95 %, más especialmente de alrededor de un 100 %. Está claro que cuando se dice que unas secuencias de ARN son similares esencialmente o tienen un cierto grado de identidad entre secuencias con secuencias de ADN, la timidina (T) en la secuencia de ADN es considerada igual al uracilo (U) en la secuencia de ARN.

35 El término “cebador” como se usa en el presente contexto, abarca cualquier ácido nucleico que sea capaz de cebar la síntesis de un ácido nucleico naciente en un proceso dependiente de un molde, tal como una PCR. Típicamente, los cebadores son unos oligonucleótidos de 10 a 30 nucleótidos, pero se pueden emplear secuencias más largas. Los cebadores se pueden proporcionar en una forma de doble hebra (bicatenaria), aunque se prefiere la forma de una sola hebra (monocatenaria). Las sondas se pueden usar como cebadores, pero están diseñadas para unirse con el ADN o ARN diana y no necesitan ser usadas en un proceso de amplificación.

40 El término “que reconoce” como se usa en el presente contexto cuando se hace referencia a cebadores específicos, se refiere al hecho de que los cebadores específicos se hibridan específicamente con una secuencia de ácido nucleico en el suceso de élite en las condiciones que se exponen en el método (tales como las condiciones del protocolo de identificación por PCR), con lo que la especificidad es determinada por la presencia de testigos positivos y negativos.

45 El término “que se hibrida” tal como se usa en el presente contexto cuando se hace referencia a sondas específicas, se refiere al hecho de que la sonda se une a una región específica en la secuencia de ácido nucleico del suceso de élite en condiciones clásicas de rigurosidad. El concepto de “condiciones clásicas de rigurosidad” como se usa en el presente caso se refiere a las condiciones para hibridación que aquí se describen o a las condiciones convencionales de hibridación 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 puede comprender las siguientes etapas: 1) inmovilizar fragmentos del ADN genómico de una planta sobre un filtro, 2) hibridar previamente el filtro durante 1 a 2 horas a 42°C en formamida al 50 %, 5 X de SSPE, 2 X del reactivo de Denhardt y 0,1 % de SDS, o durante 1 a 2 horas a 68°C en 6 X de SSC, 2 X del reactivo de Denhardt y 0,1 % de SDS, 3) añadir la sonda de hibridación que ha sido marcada, 4) incubar durante 50 16 a 24 horas, 5) lavar el filtro durante 20 min, a la temperatura ambiente en 1 X de SSC, 0,1 % de SDS, 6) lavar el filtro tres veces durante 20 min, cada vez a 68°C en 0,2 X de SSC, 0,1 % de SDS, y 7) exponer el filtro durante 24 a 55 48 horas a una película de rayos X a -70°C con una pantalla intensificadora.

Tal como se usa en el presente contexto, una muestra biológica es una muestra de una planta, un material de planta o productos que comprenden un material de planta. El término "planta" está destinado a abarcar tejidos de plantas de soja (*Glycine max*), en cualquier etapa de madurez, así como cualesquiera células, tejidos, u órganos tomados de, o derivados de, cualquiera de dichas plantas, incluyendo, sin ninguna limitación, cualesquiera semillas, hojas, tallos, flores, raíces, células individuales, gametos, cultivos de células, cultivos de tejidos o protoplastos. Un "material de planta", tal como se usa en el presente contexto, se refiere a un material que se obtiene o se deriva de una planta. Los productos que comprenden un material de planta se refieren a piensos, alimentos u otros productos que se producen usando un material de planta o que pueden ser contaminados por un material de planta. Se entiende que, en el contexto del presente invento, dichas muestras biológicas son ensayadas en cuanto a la presencia de ácidos nucleicos específicos para el A2704-12, que implican la presencia de ácidos nucleicos en las muestras. Por lo tanto los métodos aquí citados para identificar al suceso de élite A2704-12 en muestras biológicas, se refieren a la identificación en muestras biológicas de ácidos nucleicos que comprenden el suceso de élite.

Tal como se usa aquí, el concepto de "comprende" ha de interpretarse como que especifica la presencia de las características, números enteros, etapas, reactivos que se señalan, o a componentes a los que se hace referencia pero no excluye la presencia o la adición de una(o) o más características, números enteros, etapas 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 aminoácidos, puede comprender más nucleótidos o aminoácidos que los realmente citados, es decir puede estar embebido en un ácido nucleico o en una proteína de mayor tamaño. Un gen quimérico que comprende una secuencia de ADN, que está definida de manera funcional o estructural, puede comprender secuencias adicionales de ADN, etc.

El presente invento se refiere también al desarrollo de un suceso de élite A2704-12 en plantas de soja, a las plantas que comprenden este suceso, a la progenie obtenida a partir de estas plantas y a las células de plantas, o al material de planta que se deriva de este proceso. Las plantas que comprenden el suceso de élite A2704-12 se obtuvieron tal como se describe en el Ejemplo 1.

Unas plantas de soja o un material de plantas que comprende el A2704-12 se pueden identificar de acuerdo con el protocolo de identificación por PCR que se describe para el A2704-12 en el Ejemplo 2. Dicho brevemente, un ADN genómico de plantas de soja, presente en la muestra biológica, es amplificado por una PCR usando un cebador que reconoce específicamente a una secuencia situada dentro de la secuencia flanqueadora en 5' o 3' de A2704-12, tal como el cebador con la secuencia de SEQ ID NO: 4, y un cebador que reconoce a una secuencia en el ADN ajeno, tal como el cebador con la secuencia de SEQ ID NO: 8. Unos cebadores de ADN que amplifican a una parte de una secuencia endógena de plantas de soja se usan como un testigo positivo para la amplificación por PCR. Si después de la amplificación por PCR, el material proporciona un fragmento del tamaño esperado, el material contiene un material de planta procedente de una planta de soja que alberga al suceso de élite A2704-12.

Las plantas que albergan al A2704-12 son caracterizadas 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 cuando se requiere una discriminación entre plantas resistentes y plantas sensibles, sin aniquilar a las sensibles. Alternativamente, la tolerancia puede ser ensayada mediante una aplicación por atomización de Liberty®. Los tratamientos por atomización deberían hacerse entre los estadios de hojas V3 y V4 para obtener unos óptimos 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 (4 veces la tasa de campo normal), no mata a las plantas. Una aplicación por esparcimiento debería ser aplicada en un caudal de 28-34 onzas (oz) (967.21 – 1.057,4 gramos) de Liberty®. Lo mejor es aplicar a un volumen de 20 galones (74,7 litros) de agua por acre (0,47 áreas) usando una tobera del tipo de ventilador plano sin tener cuidado de no dirigir directamente aplicaciones por rociado dentro del verticilo de las plantas para evitar la quemadura por agentes tensioactivo en las hojas. El efecto herbicida deberá aparecer dentro de las 48 horas y ser visible con claridad dentro de los 5-7 días.

Unas plantas que albergan el A2704-12 pueden ser caracterizadas además por la presencia en sus células de la fosfinotricina acetil transferasa tal como se determina por el ensayo de PAT (De Block y colaboradores, 1987).

Las plantas que albergan al A2704-12 son caracterizadas también por tener unas características agronómicas que son comparables a las de unas variedades de plantas de soja comercialmente disponibles en los EE.UU., en ausencia de presión por malezas y con el 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 plantas de soja 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 del genoma de estas plantas, da como resultado unas plantas que presentan una expresión fenotípica estable del gen que interesa sin comprometer de manera significativa a cualquier aspecto agronómico deseado de las plantas.

Los siguientes ejemplos describen la identificación del desarrollo de herramientas para la identificación del suceso de élite A2704-12 en muestras biológicas.

5 A menos que se señale otra cosa distinta, todas las técnicas de ADN recombinante se llevan a cabo de acuerdo con protocolos clásicos, tal se describen en la obra de 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 la obra de Ausubel y colaboradores (1994) *Current Protocols in Molecular Biology* [Protocolos actuales en biología molecular], Current Protocols [protocolos actuales], EE.UU. Materiales y métodos clásicos para el trabajo molecular con plantas se describen en la cita de Plant Molecular Biology Labfax (1993) por R.D.D. Croy publicada por BIOS Scientific Publications Ltd (Reino Unido) y Blackwell Scientific Publications, Reino Unido.

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

SEQ ID No. 1:	secuencia de nucleótidos que comprende una región flanqueadora en 5' de A2704-12
SEQ ID No. 2:	secuencia de nucleótidos que comprende una región flanqueadora en 3' de A2704-12
SEQ ID No. 3:	cebador HCA148
SEQ ID No. 4:	cebador DPA021
SEQ ID No. 5:	cebador KVM176
SEQ ID No. 6:	cebador KVM174
SEQ ID No. 7:	cebador KVM177
SEQ ID No. 8:	cebador DPA024
SEQ ID No. 9:	cebador MDB390
SEQ ID No. 10:	cebador HCA023
SEQ ID No. 11:	cebador DPA007
SEQ ID No. 12:	cebador YTP007
SEQ ID No. 13:	cebador MDB452
SEQ ID No. 14:	cebador HCA014
SEQ ID No. 15:	cebador MDB402
SEQ ID No. 16:	cebador HCA074
SEQ ID No. 17:	cebador SMO017
SEQ ID No. 18:	cebador SMO027
SEQ ID No. 19:	cebador SMO033
SEQ ID No. 20:	cebador 1 para una amplificación del fragmento testigo
SEQ ID No. 21:	cebador 2 para una amplificación del fragmento testigo

Breve descripción de los dibujos

15 Los siguientes Ejemplos, no pensados para limitar al invento a la forma de realización específica descrita, se pueden comprender en conjunción con la Figura aneja, incorporada aquí por su referencia, en que:

En la Fig. 1: Representación esquemática de la relación existente entre las secuencias de nucleótidos y los cebadores que se citan barra negra: ADN ajeno; barra clara: ADN de origen de planta; los datos numéricos que aparecen por debajo de las barras representan posiciones de nucleótidos; (c) se refiere al complemento de la secuencia de nucleótido indicada.

20 **En la Fig. 2:** Protocolo de identificación por PCR desarrollado para el A2704-12: Secuencia de carga del gel: Pista 1: muestra de ADN procedente de plantas de soja que comprenden el suceso transgénico A2704-12; pista 2: muestra de ADN procedente de una planta de soja transgénica que no comprende el suceso de élite A2704-12; pista 3: muestras de ADN testigo procedentes de plantas de soja de tipo silvestre; pista 4: no hay testigo de molde; pista 5: marcador del peso molecular.

25

Ejemplos

1. Identificación de las regiones de flanqueadores del suceso de élite A2704-12

30 Una planta de soja resistente a herbicidas fue desarrollada por transformación de la planta de soja con un vector que comprende la secuencia de codificación de un gen *pat* que codifica la enzima fosfinotricina acetil transferasa bajo el control del promotor 35S constitutivo procedente del virus del Mosaico de la Coliflor.

El suceso de élite A2704-12 fue seleccionado basándose en un extenso proceso de selección basado en la expresión y la estabilidad buenas del gen de resistencia a herbicidas y en su compatibilidad con unas características agronómicas óptimas.

5 La secuencia de las regiones que flanquean al ADN ajeno en el suceso A2704-12 fue determinada usando el método de PCR térmico asimétrico entrelazado (TAIL acrónimo de Thermal Assimetric InterLaced) descrito por Liu y colaboradores (1995, Plant J. 8(3):457-463). Este método utiliza tres cebadores anidados en reacciones sucesivas conjuntamente con un cebador degenerado arbitrario más corto, de manera tal que las eficiencias de amplificación relativa de productos específicos y no específicos se puede controlar por vía térmica. Los cebadores específicos fueron seleccionados para el reanillamiento con el borde del ADN ajeno y basándose en sus condiciones de reanillamiento. Una pequeña cantidad (5 µl) de productos de PCR no purificados, secundarios y terciarios, se analizó sobre un gel de agarosa al 1 %. El producto de PCR terciario se usó para una amplificación preparativa, se purificó y se secuenció en un aparato secuenciador automático usando el estuche de ciclo DyeDeoxy Terminator.

1.1. Región flanqueadora en (5') derecha

15 El fragmento identificado como que comprende la región flanqueadora en 5', obtenido por el método de TAIL-PCR, fue secuenciado completamente (SEQ ID No. 1). La secuencia situada entre los nucleótidos 1 y 209 corresponde al ADN de la planta, mientras que la secuencia situada entre los nucleótidos 210 y 720 corresponde al ADN ajeno.

1.2. Región flanqueadora en (3') izquierda

20 El fragmento identificado como que comprende la región flanqueadora en 3', obtenido por el método de TAIL-PCR, fue secuenciado completamente (SEQ ID No. 2). La secuencia situada entre los nucleótidos 1 y 568 corresponde al ADN ajeno, mientras que la secuencia situada entre los nucleótidos 569 y 1000 corresponde al ADN de la planta.

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

2.1. Cebadores

25 Fueron desarrollados unos cebadores específicos que reconocen a unas secuencias situadas dentro del suceso de élite. Más particularmente, se desarrolló un cebador que reconoce a una secuencia situada dentro de la región flanqueadora en 5' de A2704-12. Luego se seleccionó un segundo cebador dentro de la secuencia del ADN ajeno, de manera tal que los cebadores franquean una secuencia de aproximadamente 183 nucleótidos. Se encontró que los siguientes cebadores dan unos resultados particularmente claros y reproducibles en una reacción de PCR en un ADN de A2704-12.

30 DPA021: 5'- ggC.gTT.CgT.AgT.gAC.TgA.gg -3' (SEQ ID No.: 4)
(diana: ADN de planta)

DPA024: 5'-gTT.TTA.CAA.CgT.CgT.gAC.Tgg-3' (SEQ ID No.: 8)
(diana: ADN de inserto)

35 Unos cebadores que se dirigen a una secuencia endógena son incluidos preferiblemente 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 PCR que se ha de generar. Los cebadores endógenos fueron seleccionados para que reconozcan a un gen doméstico en *Glycine max*:

SOY01: 5'-gTC.AgC.CAC.ACA.gTg.CCT.AT-3' (SEQ ID No.: 20)
(situado en el gen 1 de actina de *Glycine max* (número de acceso J01298))

40 SOY02: 5'-gTT.ACC.gTA.CAg.gTC.TTT.CC-3' (SEQ ID No.: 21)
(situado en el gen 1 de actina de *Glycine max* (número de acceso J01298))

2.2. Fragmentos amplificados

Los fragmentos amplificados esperados en la reacción de PCR son:

45 Para el par de cebadores SOY01-SOY02: 413 pb (testigo endógeno)
Para el par de cebadores DPA021-DPA024: 185 pb (suceso de élite A2704-12)

2.3. ADN de molde

Se preparó un ADN de molde a partir de la punción de una hoja de acuerdo con Edwards y colaboradores, (Nucleic Acid Research, 19, página 1349, 1991). Cuando se usa un ADN preparado con otros métodos, se debería realizar una tanda de ensayo utilizando diferentes cantidades del molde. Usualmente 50 ng de ADN de molde genómico proporcionan los mejores resultados.

5 2.4. Testigos positivos y negativos asignados

Para evitar falsos positivos o negativos, se determinó que los siguientes testigos positivos y negativos deberían ser incluidos en una tanda de PCR:

- 10 - Un testigo Master Mix (testigo negativo de ADN). Éste es una PCR en la que no se añade nada de ADN a la reacción. Cuando se observa el resultado esperado, de que no hay productos de PCR, esto indica que el cóctel de PCR no estaba contaminado con el ADN de diana.
- Un testigo positivo de ADN (muestra de ADN genómico de la que se sabe que contiene las secuencias transgénicas). Una amplificación satisfactoria de este testigo positivo demuestra que la PCR había sido realizada en unas condiciones que permiten la amplificación de secuencias dianas.
- 15 - Un testigo de ADN del tipo silvestre. Éste es una PCR en la que el ADN de molde proporcionado es un ADN genómico preparado a partir de una planta no transgénica. Cuando se observa el resultado esperado, de que no hay amplificación de un producto de PCR transgénico sino una amplificación del producto de PCR endógeno, esto indica que no hay ninguna amplificación del trasfondo transgénico detectable en una muestra de ADN genómico.

2.5. Condiciones de la PCR

20 Se obtuvieron resultados óptimos en las siguientes condiciones:

- La mezcla para PCR para reacciones de 25 µl contiene:

- 25 2,5 µl de ADN de molde
- 2,5 µl de 10X tampón de amplificación (suministrado con polimerasa de Taq)
- 0,5 µl de dNTP's 10 mM
- 0,5 µl de DPA021 (10 pmoles/µl)
- 0,5 µl de DPA024 (10 pmoles/µl)
- 0,25 µl de SOY01 (10 pmoles/µl)
- 0,25 µl de SOY02 (10 pmoles/µl)
- 30 0,1 µl de la polimerasa de ADN Taq (5 unidades/µl)
- agua hasta llegar a 25 µl

- el perfil de termociclado que se ha de seguir para obtener resultados óptimos es el siguiente:

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 s. a 92°C
30 s. a 57°C
1 min. a 72°C
durante 25 ciclos

Seguido por: 5 minutos a 72°C

2. 6. Análisis de un gel de agarosa

35 Para visualizar de una manera óptima los resultados de la PCR se determinó que deberían ser aplicados entre 10 y 20 µl de las muestras de PCR sobre un gel de agarosa al 1,5 % (tampón de Tris-borato) con un apropiado marcador del peso molecular (p.ej. 100 pb de la escalera (ladder) de PHARMACIA).

2.7. Validación de los resultados

Se determinó que los datos procedentes de muestras de ADN de planta transgénica dentro de una única tanda de PCR y de un único cóctel de PCR no deberían ser aceptables a menos que 1) el testigo positivo de ADN muestre los esperados productos de 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 un fragmento endógeno).

Cuando se sigue el Protocolo de identificación por PCR para el A2704-12 tal como más arriba se describe, unas pistas que muestran cantidades visibles de los productos de PCR transgénicos y endógenos con los tamaños esperados, indican que la correspondiente planta, a partir de la que se había preparado el ADN de molde genómico, ha heredado el suceso de élite A2704-12. Las pistas que no muestran cantidades visibles de uno cualquiera de los productos de PCR transgénicos y que muestran unas cantidades visibles del producto de 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. Las 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 sea generado un producto de PCR. Estas plantas no pueden ser calificadas. La preparación de un ADN genómico debería ser repetida y se ha de realizar una nueva tanda de PCR, con los apropiados testigos.

2.8. Uso de un protocolo de PCR discriminante para identificar al A2704-12

Antes de intentar escrutar materiales desconocidos, ha de realizarse una tanda de ensayo, con todos los testigos apropiados. El protocolo desarrollado puede requerir una optimización para unos componentes que pueden diferir entre laboratorios (preparación del ADN de molde, polimerasa de ADN de Taq, calidad de los cebadores, dNTP's, termociclador, etc.).

Una amplificación de la secuencia endógena desempeña un cometido clave en el protocolo. Han de conseguirse unas condiciones de PCR y termociclado que amplifiquen unas cantidades equimolares de la secuencia tanto endógena como de la transgénica en un molde de ADN genómico transgénico conocido. Cuando el fragmento endógeno dirigido a una diana no es amplificado o cuando las secuencias hacia las que se dirige no son amplificadas con las mismas intensidades de la tinción con bromuro de etidio, tal como se juzga mediante una electroforesis en gel de agarosa, se puede requerir una optimización de las condiciones de PCR.

Unos materiales de hojas de *Glycine max* procedente de un cierto número de plantas, algunas de los cuales comprendían el A2704-12 se ensayaron de acuerdo con el protocolo más arriba descrito. Unas muestras procedentes del suceso de élite A2704-12 y procedentes de *Glycine max* tipo silvestre se consideraron como testigos positivos y negativos respectivamente.

La Figura 2 ilustra el resultado obtenido con el protocolo de identificación por PCR de sucesos de élite para el A2704-12 en un cierto número de muestras de plantas de soja (pistas 1 hasta 14). Se encontró que las muestras en la pista 1 contienen el suceso de élite cuando es detectada la banda de 185 pb, mientras que las muestras en las pistas 2, 3 y 4 no comprenden el A2704-12. La pista 2 comprende otro suceso de élite de planta de soja, la pista 3 representa un testigo de *Glycine max* no transgénica, la pista 4 representa una muestra testigo negativa (agua) y la pista 5 representa el Marcador de Peso Molecular (100 pb).

3. **Uso de un fragmento de integración específico como una sonda para la detección de un material que comprende el A2704-12**

Un fragmento de integración específico del A2704-12 se obtiene mediante una amplificación por PCR usando los cebadores específicos DPA021 (SEQ ID No. 4) y DPA024 (SEQ ID No. 8) o por síntesis química, y es marcado. Este fragmento de integración es usado como una sonda específica para la detección del A2704-12 en muestras biológicas. El ácido nucleico es extraído a partir de las muestras de acuerdo con procesos clásicos. Este ácido nucleico es luego puesto en contacto con la sonda específica en unas condiciones de hibridación que son optimizadas para permitir la formación de un híbrido. La formación del híbrido es luego detectada para indicar la presencia del ácido nucleico de A2704-12 en la muestra. Opcionalmente, el ácido nucleico en las muestras es amplificado usando los cebadores específicos antes de ponerlos en contacto con la sonda específica. Alternativamente, el ácido nucleico es marcado antes del contacto con la sonda específica en lugar del fragmento de integración. Opcionalmente, la sonda específica es unida a un vehículo de soporte sólido (tal como, pero sin limitarse a un filtro, una franja o perlas) antes del contacto con las muestras.

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> Bayer BioScience N.V.
De Beukeleer, Marc
- <120> Suceso de élite A2407-12 y métodos y estuches para identificar a dicho suceso en muestras biológicas
- <130> BCS 05-2008
- 10 <150> EP05075833.3
<151> 2005-04-08
- <150> US60/670,213
<151> 2005-04-11
- 15 <160> 21
- <170> PatentIn version 3.3
- 20 <210> 1
<211> 720
<212> ADN
<213> Artificial
- 25 <220>
<223> secuencia de nucleótidos que comprende la región flanqueadora en 5' de EE-GM1
- 30 <220>
<221> característica diversa
<222> (1) .- (209)
<223> ADN de planta
- 35 <220>
<221> característica diversa
<222> (210) .. (720)
<223> ADN de inserto
- <400> 1
gagaagaaaa aggaagggcat taagagacc cctctggcaca accctagaca ctctaagatc 60
ctttttcaaa cctgctccca ccatttcgag tcaagagata gataaataga cacatctcat 120
tgcaccgatc gggggcgctc gtagtgactg aggggggtcaa agaccaagaa gtgagttatt 180
tatcagccaa gcattctatt ctctttatgt cgtgctgggc ctcttcgcta ttacgccagc 240
tggcgaaaagg gggatgtgct gcaagggcat taagtgggt aacgccaggg ttttcccagt 300
cacgacgttg taaaacgacg gccagtgaat tcccatggag tcaaagattc aaatagagga 360
cctaacagaa ctgcgccgtaa agactggcga acagttcata cagagtctct tacgactcaa 420
tgacaagaag aaaatcttcg tcaacatggt ggagcacgac acgcttctct actccaaaaa 480
tatcaaagat acagtctcag aagaccaaag ggcaattgag acttttcaac aaagggtaat 540
atccggaaac ctctctggat tccattgccc agctatctgt cactttattg tgaagatagt 600
ggaaaaggaa ggtggctcct acaaatgcca tcattgcat aaaggaaagg ccatcgttga 660
40 aqatqcctct gccgacagtg gtcccaaaga tggaccccca cccacgagga gcatcgtgga 720
- 45 <210> 2
<211> 1000
<212> ADN
<213> Artificial
- <220>
<223> secuencia de nucleótidos que comprende la región flanqueadora en 3' de EE-GM1

ES 2 388 548 T3

<220>
 <221> característica diversa
 <222> (1) ... (568)
 <223> ADN de inserto
 5

<220>
 <221> característica diversa
 <222> (569) .. (1000)
 <223> ADN de inserto
 10

<400> 2
 ttcggtgtag gtcggttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg ttcagcccga 60
 ccgctgcgccc ttatccgcta actatcgtct tgagtccaac ccggtaaagac acgacttattc 120
 gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac 180
 agagtctctt aagtggggc ctaactacgg ctacactaga agaacagtat ttggtatctg 240
 cgctctgctg aagccagtta ccttcggaaa aagagttggt agctcttgat ccggcaaaaa 300
 aaccaccgct ggtagcggtg gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa 360
 aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa 420
 ctcacgtaa gggatttttg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt 480
 aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat gagtaaaactt ggtctgacag 540
 ttaccaatgc ttaatcagtg aggcaccttt aatctagatg atctgtctca actttaccaa 600
 aagttttgag cacatgtttg gattcacctt aaataatcta aaatcacagc ttgtttgatc 660
 ccaaaggagt taattctaag taaaattgat tgagttaaaa caattgtgtt agatagagaa 720
 attttctttg aataaaaaaca tctagacaca aatcatttca ctccaataa attttaaca 780
 aaataaattt tgcaattcat tcatccaaac aaacatttga attaactata atcaattcaa 840
 attgttacag tgtgttgcatt tcatatcatt cctaataagt ctacattaaa gattaagagt 900
 gagaatgaga ggaagagaga acggtttcag ggtaaacctt ttgtttggaa gaaccatcaa 960
 acagtggcaa cggatcatcc ttgctgcaaa acatagcttt 1000

<210> 3
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15

<220>
 <223> cebador de oligonucleótido HCA148
 20

<400> 3
 ggaaggcatt aagagaccct 20

<210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25

<220>
 <223> cebador de oligonucleótido DPA021
 30

<400> 4
 ggcgttcgta gtgactgagg 20

	<210> 5	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótido KVM176	
	<400> 5	
	ccaagcattc tattcttctt atgtc	25
10	<210> 6	
	<211> 16	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótido KVM174	
	<400> 6	
	aagaggcccg caccga	16
20	<210> 7	
	<211> 16	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótido KVM177	
	<400> 7	
	ccccctttcg ccagct	16
30	<210> 8	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
35	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótido DPA024	
	<400> 8	
	gttttacaac gtcgtgactg g	21
40	<210> 9	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
45	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótido MDB390	
	<400> 9	
	aactgttcgc cagtctttac gg	22
50	<210> 10	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
55	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótido HCA023	

	<400> 10		
	cctttggtct tctgagactg		20
	<210> 11		
	<211> 20		
5	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> cebador de oligonucleótido DPA007		
10			
	<400> 11		
	atgatggcat ttgtaggagc		20
	<210> 12		
	<211> 21		
15	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> cebador de oligonucleótido YPT007		
20			
	<400> 12		
	ttatcgccac tggcagcagc c		21
	<210> 13		
	<211> 23		
25	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> MDB452		
30			
	<400> 13		
	cttgaagtgg tggcctaact acg		23
	<210> 14		
	<211> 19		
35	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> cebador de oligonucleótido HCA014		
	<400> 14		
40	tctgacgctc agtggaacg		19
	<210> 15		
	<211> 23		
45	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> cebador de oligonucleótido MDB402		
	<400> 15		
50	cttgggtctga cagttaccaa tgc		23
	<210> 16		
	<211> 21		
55	<212> ADN		
	<213> Artificial		

	<220>		
	<223>	cebador de oligonucleótido HCA074	
	<400>	16	
		ggtgaatcca aacatgtgct c	21
5	<210>	17	
	<211>	21	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
10	<220>		
	<223>	cebador de oligonucleótido SMO017	
	<400>	17	
		cctttgggat caaacaagct g	21
15	<210>	18	
	<211>	24	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
20	<220>		
	<223>	cebador de oligonucleótido SMO027	
	<400>	18	
		aacacaattg ttttaactca atca	24
25	<210>	19	
	<211>	24	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
30	<220>		
	<223>	cebador de oligonucleótido SMO033	
	<400>	19	
		gatatgaatg caacacactg taac	24
35	<210>	20	
	<211>	20	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
40	<220>		
	<223>	cebador de oligonucleótido SOY01	
	<400>	20	
		gtcagccaca cagtcctat	20
45	<210>	21	
	<211>	20	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
50	<220>		
	<223>	cebador de oligonucleótido SOY02	
	<400>	21	
		gttaccgtac aggtctttcc	20
55			

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar al suceso de élite A2704-12 en muestras biológicas, cuyo método comprende la detección de una región específica para el A2704-12, que comprende una parte de la región de ADN flanqueadora en 5' o 3' del suceso de élite A2704-12 y una parte de la región de ADN ajeno contiguo a ella del suceso de élite A2704-12, con por lo menos dos cebadores específicos o con una sonda específica, en el que dicha región de ADN flanqueadora en 5' comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 1 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 209, dicha región de ADN ajeno contiguo a dicha región flanqueadora en 5' comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 1 desde el nucleótido 210 hasta el nucleótido 720, dicha región de ADN flanqueadora en 3' comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 2 desde el nucleótido 569 hasta el nucleótido 1000, y dicha región de ADN ajeno contiguo a dicha región flanqueadora en 3' comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 2 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 568, en el que dicha sonda específica comprende una secuencia de entre 50 y 500 pb que es idéntica por lo menos en un 80 % a dicha región específica para el A2704-12 que comprende una parte de la región de ADN flanqueadora en 5' o 3' del suceso de élite A2704-12 y una parte de la región de ADN ajeno contiguo a ella del suceso de élite A2704-12; y en el que uno de dichos cebadores específicos es un oligonucleótido de por lo menos 10 a 30 nucleótidos que reconoce a una parte de la región de ADN flanqueadora en 5' o 3' del suceso de élite A2704-12, y en el que uno de dichos cebadores específicos es un oligonucleótido de por lo menos 10 a 30 nucleótidos, que reconoce a una parte de la región de ADN ajeno del suceso de élite A2704-12 contiguo a dicha región flanqueadora en 5' o 3'.
2. El método de la reivindicación 1, comprendiendo dicho método amplificar un fragmento de ADN de entre 100 y 500 pb a partir de un ácido nucleico presente en dichas muestras biológicas usando una reacción en cadena de la polimerasa con por lo menos dos cebadores, reconociendo uno de dichos cebadores a la región flanqueadora en 5' de A2704-12, teniendo dicha región flanqueadora en 5' la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 1 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 209, o a la región flanqueadora en 3' de A2704-12, teniendo dicha región flanqueadora en 3' la secuencia de nucleótidos del complemento de SEQ ID NO. 2 desde el nucleótido 569 hasta el nucleótido 1000, reconociendo el otro cebador de dichos cebadores a una secuencia situada dentro del ADN ajeno que tiene la secuencia de nucleótidos del complemento de SEQ ID NO. 1 desde el nucleótido 210 hasta el nucleótido 720 o la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 2 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 568.
3. El método de la reivindicación 2, en el que dicho cebador que reconoce a la región flanqueadora en 5' consiste en una secuencia de nucleótidos de 17 a 200 nucleótidos consecutivos seleccionados entre la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 1 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 209, o dicho cebador que reconoce a la región flanqueadora en 3' de A2704-12 consiste en una secuencia de nucleótidos de 17 a 200 nucleótidos consecutivos seleccionados entre la secuencia de nucleótidos del complemento de SEQ ID NO. 2 desde el nucleótido 569 hasta el nucleótido 1000, y dicho cebador que reconoce a una secuencia dentro del ADN ajeno consiste en 17 a 200 nucleótidos consecutivos seleccionados entre la secuencia de nucleótidos del complemento de SEQ ID NO. 1 desde el nucleótido 210 hasta el nucleótido 720 o la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 2 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 568.
4. El método de la reivindicación 2, en el que dicho cebador que reconoce a la región flanqueadora en 5' comprende en su extremo 3' final una secuencia de nucleótidos de por lo menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionados entre la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 1 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 209, o dicho cebador que reconoce a la región flanqueadora en 3' de A2704-12 comprende en su extremo 3' final una secuencia de nucleótidos de por lo menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionados entre la secuencia de nucleótidos del complemento de SEQ ID NO. 2 desde el nucleótido 569 hasta el nucleótido 1000, y dicho cebador que reconoce a una secuencia situada dentro del ADN ajeno comprende en su extremo 3' por lo menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionados entre la secuencia de nucleótidos del complemento de SEQ ID NO. 1 desde el nucleótido 210 hasta el nucleótido 720 o la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 2 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 568.
5. El método de la reivindicación 4, en el que dichos cebadores comprenden las secuencias de SEQ ID NO. 4 y SEQ ID NO. 8, respectivamente.
6. El método de la reivindicación 5, cuyo método comprende amplificar un fragmento de aproximadamente 185 pb usando el protocolo de identificación del A2704-12.
7. Un estuche para identificar el suceso de élite en muestras biológicas, comprendiendo dicho estuche un cebador que reconoce a la región flanqueadora en 5' de A2704-12 teniendo dicha región flanqueadora en 5' la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 209, o un cebador que reconoce a la región flanqueadora en 3' de A2704-12, teniendo dicha región flanqueadora en 3' la secuencia de nucleótidos del complemento de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 569 hasta el nucleótido 1000, y un cebador que reconoce a una secuencia situada dentro del ADN ajeno, teniendo dicho ADN ajeno la secuencia de nucleótidos del complemento de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 210 hasta el nucleótido 720 o la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde

el nucleótido 1 hasta el nucleótido 568, en el dicho cebador es un oligonucleótido de por lo menos 10 a 30 nucleótidos.

5 8. El estuche de la reivindicación 7, en el dicho cebador que reconoce a la región flanqueadora en 5' consiste en una secuencia de nucleótidos de 17 a 200 nucleótidos consecutivos seleccionados entre la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 209, o dicho cebador que reconoce a la región flanqueadora en 3' de A2704-12 consiste en una secuencia de nucleótidos de 17 a 200 nucleótidos consecutivos seleccionados entre la secuencia de nucleótidos del complemento de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 569 hasta el nucleótido 1000, y dicho cebador que reconoce a una secuencia dentro del ADN ajeno consiste en 17 a 200 nucleótidos consecutivos seleccionados entre la secuencia de nucleótidos del complemento de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 210 hasta el nucleótido 720 o la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 568.

15 9. El estuche de la reivindicación 7, en el dicho cebador que reconoce a la región flanqueadora en 5' comprende en su extremo 3' final una secuencia de nucleótidos de por lo menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionados entre la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 209, o dicho cebador que reconoce a la región flanqueadora en 3' de A2704-12 comprende en su extremo 3' final una secuencia de nucleótidos de por lo menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionados entre la secuencia de nucleótidos del complemento de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 569 hasta el nucleótido 1000, y dicho cebador que reconoce a una secuencia dentro del ADN ajeno comprende en su extremo 3' por lo menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionados entre la secuencia de nucleótidos del complemento de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 210 hasta el nucleótido 720 o la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 568.

20 10. El estuche de la reivindicación 7, que comprende un cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID No 4 y un cebador que consiste en la secuencia de SEQ ID No 8.

25 11. Un par de cebadores destinado a usarse en un protocolo de identificación por PCR del A2704-12, teniendo dicho primer cebador una secuencia que, en condiciones optimizadas de PCR, reconoce específicamente a una secuencia situada dentro de la región flanqueadora en 5' o 3' de A2704-12, teniendo dicha región flanqueadora en 5' la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 209 y teniendo dicha región flanqueadora en 3' la secuencia de nucleótidos del complemento de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 569 hasta el nucleótido 1000, y teniendo dicho segundo cebador una secuencia que, en condiciones optimizadas de PCR, reconoce específicamente a una secuencia de la región de ADN ajeno del suceso de élite A2704-12, contiguo a dicha región flanqueadora en 5' o 3', en el que dicha región de ADN ajeno contiguo a dicha región flanqueadora en 5' comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 210 hasta el nucleótido 720, y dicha región de ADN ajeno contiguo a dicha región flanqueadora en 3' comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 568, y en el que cada uno de dichos cebadores es un oligonucleótido de por lo menos 10 a 30 nucleótidos.

35 12. El par de cebadores de la reivindicación 11, en el que dicho primer cebador consiste en una secuencia de nucleótidos de 17 a 200 nucleótidos consecutivos seleccionados entre la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 209 o una secuencia de nucleótidos de 17 a 200 nucleótidos consecutivos seleccionados entre la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 569 hasta el nucleótido 1000.

40 13. El par de cebadores de la reivindicación 11, en el que dicho primer cebador comprende en su extremo 3' final una secuencia de nucleótidos de por lo menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionados entre la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 209 o una secuencia de nucleótidos de por lo menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionados entre la secuencia de nucleótidos del complemento de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 569 hasta el nucleótido 1000.

14. Un cebador que comprende en su extremo 3' final la secuencia de SEQ ID No 4.

45 15. El par de cebadores de la reivindicación 11, que comprende un primer cebador que comprende en su extremo 3' final la secuencia de SEQ ID No 4 y un segundo cebador que comprende en su extremo 3' final la secuencia de SEQ ID No 8.

16. El método de la reivindicación 1, en el que dicho método comprende hibridar un ácido nucleico de muestras biológicas con una sonda específica para el A2704-12.

50 17. El método de la reivindicación 16, en el que la secuencia de dicha sonda específica tiene una identidad entre secuencias de por lo menos un 80 % con la SEQ ID No 1 del nucleótido 160 hasta el 260 o con la SEQ ID No 2 desde el nucleótido 520 hasta el 620, o con el complemento de dichas secuencias.

18. Un estuche para identificar el suceso de élite A2704-12 en muestras biológicas, comprendiendo dicho estuche una sonda específica, capaz de hibridarse específicamente con una región específica del A2704-12, en el que dicha sonda específica comprende una secuencia de entre 50 y 500 pb que tiene una identidad entre secuencias de por lo menos un 80 % con una secuencia que comprende una parte de la secuencia flanqueadora en 5' o la secuencia flanqueadora en 3' del A2704-12 y la secuencia del ADN ajeno contiguo a ella, en el que dicha secuencia flanqueadora en 5' comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 209, el ADN ajeno contiguo a ella comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 210 hasta el nucleótido 720, y en el que dicha secuencia flanqueadora en 3' comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 569 hasta el nucleótido 1000, y el ADN ajeno contiguo a ella comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 568.
19. El estuche de la reivindicación 18, en el que la secuencia de dicha sonda específica tiene una identidad entre secuencias de por lo menos un 80 % con la SEQ ID No 1 desde el nucleótido 160 hasta el 260 o con la SEQ ID No 2 desde el nucleótido 520 hasta el 620, o con el complemento de dichas secuencias.
20. Una sonda específica para la identificación del suceso de élite A2704-12 en muestras biológicas, que comprende una secuencia de entre 50 y 500 pb que tiene una identidad entre secuencias de por lo menos un 80 % con una secuencia que comprende una parte de la secuencia flanqueadora 5' o la secuencia flanqueadora en 3' del A2704-12 y la secuencia del ADN ajeno contiguo a ella, o el complemento de la misma, en la que dicha secuencia flanqueadora en 5' comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 209, el ADN ajeno contiguo a ella comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 210 hasta el nucleótido 720, y en la que dicha secuencia flanqueadora en 3' comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 569 hasta el nucleótido 1000, y el ADN ajeno contiguo a ella comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 568.
21. La sonda de la reivindicación 20 que tiene una identidad entre secuencias de por lo menos un 80 % con la SEQ ID No 1 desde el nucleótido 160 hasta el nucleótido 260 o con la SEQ ID No 2 desde el nucleótido 520 hasta el nucleótido a 620, o con el complemento de dichas secuencias.
22. El uso del par de cebadores de una cualquiera de las reivindicaciones 11 hasta 13 o de la reivindicación 15, o de la sonda de la reivindicación 20 ó 21, en un método para confirmar la pureza de las semillas en muestras de semillas.
23. El uso del par de cebadores de una cualquiera de las reivindicaciones 11 hasta 13 o de la reivindicación 15 o de la sonda de la reivindicación 20 o 21, en un método para escrutar semillas en cuanto a la presencia del A2704-12 en muestras de lotes de semillas.
24. Un amplicón discriminante que identifica específicamente al suceso de élite A2704-12 de plantas de soja, cuyo amplicón es obtenible a partir de una muestra de ácido nucleico que comprende dicho suceso de élite por medio de una PCR usando un cebador que reconoce específicamente a una secuencia situada dentro de la región flanqueadora en 5' o 3' del suceso de élite y un cebador que reconoce específicamente al ADN ajeno contiguo a ella, en el que dicha región flanqueadora en 5' comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 209, el ADN ajeno contiguo a ella comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 210 hasta el nucleótido 720, y en el que dicha región flanqueadora en 3' comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 569 hasta el nucleótido 1000, y el ADN ajeno contiguo a ella comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 568, y en el que dicho cebador específico es un oligonucleótido de por lo menos 10 a 30 nucleótidos.

Fig. 1

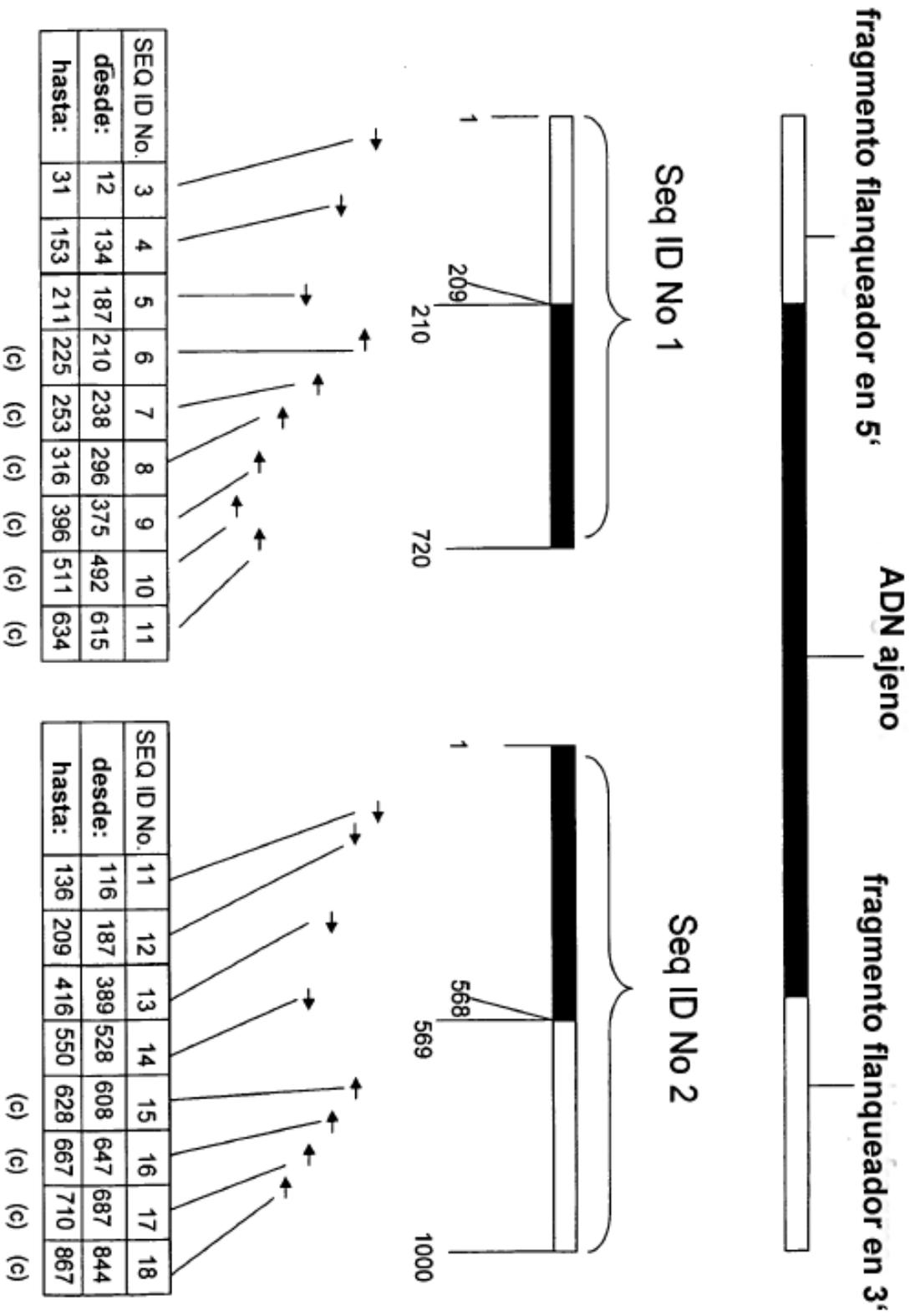


Fig. 2

