

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 432 406**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2008 E 08748863 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2013 EP 2132320**

54 Título: **Plantas de algodón resistentes a los insectos y métodos para identificación de las mismas**

30 Prioridad:

05.04.2007 EP 07075263

12.04.2007 US 923142 P

23.04.2007 EP 07075299

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

03.12.2013

73 Titular/es:

BAYER CROPSCIENCE NV (100.0%)

J.E. Mommaertsiaan 14

1831 Diegem, BE

72 Inventor/es:

TROLINDER, LINDA;

MOENS, SOFIE;

PAELINCK, DIMITRI;

HABEX, VEERLE y

VAN HERCK, HANS

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 432 406 T3

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

DESCRIPCIÓN

Plantas de algodón resistentes a los insectos y métodos para identificación de las mismas.

Campo de la Invención

5 Esta invención se refiere a plantas transgénicas de algodón, material y semillas de plantas, caracterizadas por albergar un evento de transformación específico, particularmente por la presencia de un gen que codifica una proteína que confiere resistencia a los insectos, en una localización específica en el genoma del algodón. Las plantas de algodón de la invención combinan el fenotipo de resistencia a los insectos con una eficiencia agronómica, estabilidad genética y adaptabilidad a diferentes sustratos genéticos equivalentes a la línea de algodón no transformada en ausencia de insectos. Esta invención proporciona adicionalmente métodos y kits para identificar la presencia de material de plantas que comprende específicamente el evento de transformación EE-GH5 en muestras biológicas.

Antecedentes de la Invención

15 La expresión fenotípica de un transgén en una planta está determinada a la vez por la estructura del gen propiamente dicha y por su localización en el genoma de planta. Al mismo tiempo, la presencia del transgén (en un DNA extraño) en diferentes localizaciones en el genoma influirá en el fenotipo global de planta de diferentes maneras. La introducción con éxito agronómica o industrialmente de un rasgo comercialmente interesante en una planta por manipulación genética puede ser un procedimiento laborioso que depende de diferentes factores. La transformación y regeneración real de plantas transformadas genéticamente son sólo el primero en una serie de pasos de selección, que incluyen caracterización genética extensa, mejora genética, y evaluación en pruebas de campo, conduciendo finalmente a la selección de un evento de élite.

20 La fibra de algodón es el artículo textil individual más importante mundialmente. Aproximadamente 80 millones de acres (32 millones de hectáreas) de algodón se recolectan anualmente a lo largo del globo terráqueo. El algodón es la quinta cosecha más importante en los Estados Unidos en términos de producción en hectáreas, con más de 15 millones de acres (6 millones de hectáreas) plantadas en 2000.

25 Las especies de insectos más dañinas que se alimentan de algodón son *Helicoverpa zea* (oruga de las mazorcas del maíz u oruga de las cápsulas del algodón), *Helicoverpa armigera* (oruga de las cápsulas del algodón americano), *Heliothis virescens* (oruga de los brotes del tabaco) y *Helicoverpa punctigera*.

30 La identificación inequívoca de un evento de élite está adquiriendo importancia creciente teniendo en cuenta las discusiones en Novel Food/Feed, segregación de productos GMO y no-GMO y la identificación de material patentado. Idealmente, dicho método de identificación es a la vez rápido y sencillo, sin necesidad de un montaje extenso de laboratorio. Adicionalmente, el método debería proporcionar resultados que permitan la determinación inequívoca del evento de élite sin interpretación de expertos, pero que se cumplan bajo escrutinio de expertos en caso necesario. Instrumentos específicos para uso en la identificación del evento de élite EE-GH5 en muestras biológicas se describen en esta memoria.

35 EE-GH5 ha sido identificado como un evento de élite de una población de plantas transgénicas de algodón en el desarrollo de algodón resistente a los insectos (*Gossypium hirsutum*) que comprende un gen que codifica una proteína cristalina insecticida de *Bacillus thuringiensis*. Las plantas transgénicas de algodón contienen un gen químico que codifica una proteína cristalina insecticida Bt (como se describe en WO 03/093484) bajo control de un promotor expresable en plantas.

40 Plantas de algodón que comprenden un gen de resistencia a los insectos han sido descritas en la técnica. Sin embargo, ninguna de las descripciones de la técnica anterior propone o sugiere la presente invención.

Sumario de la Invención

45 La presente invención se refiere a una planta transgénicas de algodón que comprende, integrada de manera estable en su genoma, un casete de expresión que comprende un gen de resistencia a los insectos que comprende la secuencia codificante del gen cry1Ab (como se describe en el Ejemplo 1.1 en esta memoria), que es resistente a los insectos y, en ausencia de presión de insectos, tiene una eficiencia agronómica que es sustancialmente equivalente a la línea isógena no transgénica como se caracteriza en las reivindicaciones. Bajo presión de insectos, la planta tendrá un fenotipo agronómico superior comparada con la planta no transgénica.

De acuerdo con la presente invención, la planta de algodón comprende el evento de élite EE-GH5.

50 Más específicamente, la presente invención se refiere a una planta transgénica de algodón, cuyo DNA genómico se caracteriza por el hecho de que, cuando se utiliza en un protocolo de identificación PCR como se describe en esta

- memoria, utilizando dos cebadores dirigidos a la región flanqueante 5' o 3' de EE-GH5 y el DNA extraño, respectivamente, produce un fragmento que es específico para EE-GH5. Los cebadores pueden estar dirigidos contra la región flanqueante 5' dentro de SEQ ID No. 1 y el DNA extraño respectivamente, de tal modo que los cebadores comprenden o están constituidos por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 7 y SEQ ID No. 8 respectivamente, y producen un fragmento de DNA que tiene entre 100 y 700 pb, con preferencia aproximadamente 129 pb. Los cebadores pueden estar dirigidos también contra la región flanqueante 3' dentro de SEQ ID No. 2 y el DNA extraño respectivamente, de tal modo que los cebadores comprenden o están constituidos por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 3 y SEQ ID No. 6 respectivamente, y producen un fragmento de DNA que contiene entre 300 y 700 pb, con preferencia aproximadamente 369 pb.
- 10 La semilla de referencia que comprende el evento de élite de la invención ha sido depositada en la ATCC bajo el número de acceso PTA-8171, Una realización de la invención es la semilla que comprende el evento de élite EE-GH5 depositada con el número de acceso ATCC PTA-8171, que se desarrollarán en una planta de algodón resistente a los insectos, particularmente *Helicoverpa sp.* o *Heliothis sp.* La semilla del depósito ATCC número PTA8171, es un lote de siembra constituido por al menos aproximadamente 95% de almendras transgénicas homocigóticas para el transgén, que comprenden el evento de élite de la invención, que se desarrollarán en plantas resistentes a los insectos, siendo las plantas también plantas tolerantes a glufosinato. La semilla puede sembrarse y las plantas en crecimiento pueden tratarse con glufosinato como se describe en esta memoria para obtener 100% de plantas tolerantes a glufosinato, que comprenden el evento de élite de la invención. La invención se refiere adicionalmente a células, tejidos, progenie, y descendientes procedentes de una planta que comprende el evento de élite de la invención desarrollada a partir de la semilla depositada en la ATCC que tiene el número de acceso PTA-8171. Se describen también en esta memoria plantas que pueden obtenerse por propagación de y/o mejora genética de una planta de algodón que comprende el evento de élite de la invención desarrollado a partir de la semilla depositada en la ATCC que tiene el número de acceso PTA-8171. La invención se refiere también a plantas de algodón que comprenden el evento de élite EE-GH5.
- 25 La invención se refiere adicionalmente a un método para identificación de una planta transgénica, o células o tejidos de la misma, que comprenden el evento de élite EE-GH5, método que está basado en la identificación de la presencia de secuencias caracterizadoras de DNA o aminoácidos codificados por dichas secuencias de DNA en la planta transgénica, células o tejidos como se caracterizan en las reivindicaciones. De acuerdo con una realización preferida de la invención, tales secuencias caracterizadoras de DNA son secuencias de 15 pares de bases (pb), preferiblemente 20 pb, muy preferiblemente 30 pb o más que comprenden el sitio de inserción del evento, es decir a la vez una parte de DNA extraño y una parte del genoma de algodón (sea en la región flanqueante 5' o 3') contigua al mismo, que permiten la identificación específica del evento de élite.
- 35 La presente invención se refiere adicionalmente a métodos para identificar el evento de élite EE-GH5 en muestras biológicas, métodos que están basados en cebadores que reconocen específicamente la secuencias flanqueantes 5' y/o 3' de EE-GH5.
- Más específicamente, la invención se refiere a un método que comprende amplificar una secuencia de un ácido nucleico presente en muestras biológicas, utilizando una reacción en cadena de polimerasa con al menos dos cebadores, uno de los cuales reconoce la región flanqueante 5' o 3' de EE-GH5, reconociendo el otro una secuencia dentro del DNA extraño, preferiblemente para obtener un fragmento de DNA de entre 100 y 500 pb. Los cebadores pueden reconocer una secuencia dentro de la región flanqueante 5' de EE-GH5 (SEQ ID No. 1, desde la posición 1 a la posición 98 o SEQ ID No. 16 desde la posición 1 a la posición 563) o dentro de la región flanqueante 3' de EE-GH5 (complemento de SEQ ID No. 2 desde la posición 41 a la posición 452) y una secuencia dentro del DNA extraño (complemento de SEQ ID No. 1 desde la posición 99 a la posición 334 o SEQ ID No. 2 desde la posición 1 a la posición 40), respectivamente. El cebador que reconoce la región flanqueante 5' puede comprender la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 7 o SEQ ID No. 17, y el cebador que reconoce la secuencia dentro del DNA extraño puede comprender la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 18 o SEQ ID No. 19 descritas en esta memoria. El cebador que reconoce la región flanqueante 3' puede comprender la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 6 y el cebador que reconoce una secuencia dentro del DNA extraño puede comprender la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 3 descrita en esta memoria.
- 50 La presente invención se refiere más específicamente a un método para identificación del evento de élite EE-GH5 en diversas muestras, método que comprende amplificar una secuencia de un ácido nucleico presente en una muestra biológica, utilizando una reacción en cadena de polimerasa con dos cebadores que tienen resistencia a los nucleótidos de SEQ ID No. 3 y SEQ ID No. 6 respectivamente, para obtener un fragmento de DNA de aproximadamente 369 pb.
- 55 El evento de élite presente comprende una secuencia de DNA extraño en donde ha tenido lugar una ligera transposición cuando se compara con el DNA utilizado inicialmente para el procedimiento de transformación, siendo la transposición exclusiva para el evento de élite EE-GH5. De acuerdo con ello, la invención se refiere también a un

método para identificación del evento de élite EE-GH5 en muestras biológicas, método que comprende amplificar una secuencia de un ácido nucleico presente en una muestra biológica, utilizando una reacción en cadena de polimerasa con dos cebadores que flanquean la transposición exclusiva de DNA extraño en EE-GH5, tales como los cebadores que comprenden o tienen la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 10 y SEQ ID No. 11, para obtener un fragmento de DNA de aproximadamente 262 pares de bases.

La presente invención se refiere adicionalmente a las secuencias flanqueantes específicas de EE-GH5 descritas en esta memoria, que pueden utilizarse para desarrollar métodos de identificación específicos para EE-GH5 en muestras biológicas. Tales secuencias flanqueantes específicas pueden utilizarse también como material de control de referencia en ensayos de identificación. Más particularmente, la invención se refiere a las regiones flanqueantes 5' y/o 3' de EE-GH5 que pueden utilizarse para el desarrollo de cebadores y sondas específicos como se describen más adelante en esta memoria. Se describen también moléculas de ácido nucleico que abarcan las transposiciones específicas dentro del DNA extraño de EE-GH5, tales como una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de SEQ ID No. 12 desde la posición del nucleótido 52 a la posición del nucleótido 88, o que comprenden la secuencia de SEQ ID No. 12. También son adecuadas como material de referencia moléculas de ácido nucleico, con preferencia de aproximadamente 369 pares de bases, que comprenden la secuencia que puede ser amplificada por cebadores que tienen la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 3 y SEQ ID No. 6.

La invención se refiere adicionalmente a métodos de identificación para la presencia de EE-GH5 en muestras biológicas basados en el uso de tales cebadores o sondas específicos. Los cebadores pueden estar constituidos por una secuencia de nucleótidos de 17 a aproximadamente 200 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 1 desde el nucleótido 1 al nucleótido 98 de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 16 desde el nucleótido 1 al nucleótido 563 o el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 2 desde el nucleótido 41 al nucleótido 452) combinado con iniciadores constituidos por una secuencia de nucleótidos de 17 a aproximadamente 200 nucleótidos consecutivos seleccionados del complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 1 desde el nucleótido 99 al nucleótido 334 o la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 2 desde el nucleótido 1 al nucleótido 40. Los cebadores pueden comprender también estas secuencias de nucleótidos localizadas en su extremo 3' último, y comprender adicionalmente secuencias no afines o secuencias derivadas de las secuencias de nucleótidos mencionadas, pero que comprenden apareamientos erróneos.

La invención se refiere adicionalmente a kits para la identificación del evento de élite EE-GH5 en muestras biológicas, comprendiendo dichos kits al menos un cebador o sonda que reconoce específicamente la región flanqueante 5' o 3' de EE-GH5, o la transformación específica dentro de la secuencia de DNA extraño en EE-GH5.

El kit de la invención comprende, además de un cebador que reconoce específicamente la región flanqueante 5' o 3' de EE-GH5, un segundo cebador que reconoce específicamente una secuencia dentro del DNA extraño de EE-GH5, para uso en un protocolo de identificación PCR. Los kits de la invención pueden comprender al menos dos cebadores específicos, uno de los cuales reconoce una secuencia dentro de la región flanqueante 5' de EE-GH5, reconociendo el otro una secuencia comprendida dentro del DNA extraño. El iniciador que reconoce la región flanqueante 5' puede comprender la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 3, y el cebador que reconoce el transgén puede comprender la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 6 o cualquier otro cebador como se describe en esta memoria.

La invención se refiere adicionalmente a un kit para la identificación del evento de élite EE-GH5 en muestras biológicas, comprendiendo dicho kit los cebadores PCR que tienen la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 3 y SEQ ID No. 6 para uso en el protocolo de identificación PCR de EE-GH5 descrito en esta memoria. La invención se refiere adicionalmente a un kit para la identificación de evento de élite EE-GH5 en muestras biológicas, comprendiendo dicho kit los cebadores PCR que tienen la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 10 y SEQ ID No. 11.

Se describe también en esta memoria un kit para la identificación del evento de élite EE-GH5 en muestras biológicas, kit que comprende una sonda específica que tiene una secuencia que corresponde (o es complementaria a) una secuencia que tiene entre 80% y 100% de identidad de secuencia con una región específica de EE-GH5. La secuencia de la sonda puede corresponder a una región específica que comprende parte de la región flanqueante 5' o 3' de EE-GH5 o a una región correspondiente a la transposición de DNA extraño específico para EE-GH5. La sonda específica puede tener (o puede ser complementaria a) una secuencia que tiene entre 80% y 100% de identidad de secuencia con la secuencia entre los nucleótidos 78 y 119 de SEQ ID No. 1 o SEQ ID No. 2 desde el nucleótido 20 al 61 o SEQ ID No. 12 desde el nucleótido 52 al nucleótido 88.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se dan a conocer secuencias de DNA que comprenden el sitio de inserción del evento y longitud suficiente de polinucleótidos tanto del DNA genómico del algodón como del DNA extraño (transgén) como se caracterizan en las reivindicaciones, de tal modo que son útiles como cebador o sonda para la detección de EE-GH5. Tales secuencias pueden comprender al menos 9 nucleótidos del DNA genómico del algodón y un número similar de nucleótidos del DNA extraño (transgén) de EE-GH5 con el mismo a cada lado del

sitio de inserción respectivamente. Muy preferiblemente, tales secuencias de DNA comprenden al menos 9 nucleótidos del DNA genómico del algodón y un número similar de nucleótidos del DNA extraño contiguo con el sitio de inserción en SEQ ID No. 1 o SEQ ID No. 2.

5 Los métodos y kits abarcados por la presente invención pueden utilizarse para propósitos diferentes tales como, pero sin carácter limitante, los siguientes: identificar la presencia o ausencia de EE-GH5 en plantas, material de planta o en productos tales como, pero sin carácter limitante, productos alimenticios o piensos (frescos o procesados) que comprenden o se derivan de material de plantas; adicional o alternativamente, los métodos y kits de la presente invención pueden utilizarse para identificar material de plantas transgénico para propósitos de segregación entre material transgénico y no transgénico; adicional o alternativamente, los métodos y kits de la presente invención pueden utilizarse para determinar la calidad (es decir el porcentaje de material puro) del material de planta que comprende EE-GH5.

Se describen también en esta memoria las regiones flanqueantes 5' y/o 3' de EE-GH5 así como los cebadores y sondas específicos desarrollados a partir de las secuencias flanqueantes 5' y/o 3' de EE-GH5 y la región de transposición específica EE-GH5, así como cebadores o sondas específicos desarrollados a partir de dicha región.

15 Finalmente, se da a conocer en esta memoria DNA genómico obtenido a partir de plantas que comprenden el evento de élite EE-GH5. Dicho DNA genómico puede utilizarse como material de control de referencia en los ensayos de identificación que se describen en esta memoria.

Breve descripción de los dibujos

Los ejemplos que siguen pueden comprenderse en asociación con las figuras que se acompañan, en las cuales:

20 **Fig. 1: representa esquemáticamente la relación entre las secuencias nucleotídicas citadas y los cebadores.** Barra negra: DNA extraño; barra negra rayada: transposición en el DNA extraño específica para EE-GH5; barra clara: DNA de origen de planta; barra clara rayada: delección de la diana pre-inserción; flechas: cebadores oligonucleotídicos, las cifras bajo las barras representan posiciones de nucleótido; (c) se refiere al complemento de la secuencia nucleotídica indicada.

25 **Fig. 2: representa resultados obtenidos por el protocolo de identificación PCR desarrollado para EE-GH5.** Secuencia de carga del gel: pista 1: marcador de peso molecular (escalera de 100 pares de bases); pistas 2 a 3: muestras de DNA de la plantas de algodón que comprenden el evento transgénico EE-GH5; pistas 4 a 10: muestras de DNA de la plantas transgénicas de algodón que no comprenden el evento de élite EE-GH5, pero que comprenden un gen de resistencia a los insectos similar; pista 11: ausencia de control de DNA molde; pista 12: marcador de peso molecular.

30 **Fig. 3: representa resultados obtenidos por el protocolo de clasificación de cigosidad PCR desarrollado para EE-GH5.** Secuencia de carga del gel, pista 1: marcador de peso molecular (escalera de 100 pb); pistas 2 y 3: muestras de DNA de la plantas de algodón que comprenden el evento transgénico EE-GH5 en forma heterocigótica; pista 4: fallo; pista 5: muestra de DNA de control de una planta de algodón de tipo salvaje; pistas 6-7: muestra de DNA de la plantas de algodón que comprenden el evento transgénico EE-GH5 en forma homocigótica; pista 8: ausencia de control del DNA molde; pista 9: marcador de peso molecular.

Descripción detallada

La incorporación de una molécula de DNA recombinante en el genoma de planta es típicamente resultado de la transformación de una célula o tejido. El sitio particular de incorporación se debe usualmente a integración "aleatoria".

El DNA introducido en el genoma de planta como resultado de transformación de una célula o tejido de planta con un DNA recombinante o "DNA transformante", y originario de dicho DNA transformante se designa en lo sucesivo como "DNA extraño" que comprende uno o más "transgenes". La expresión "DNA pre-inserción de planta" en el contexto de la presente invención hará referencia al DNA originario de planta que se transforma. El DNA de la planta se encontrará usualmente en el mismo locus genético en la planta de tipo salvaje correspondiente. El DNA extraño puede ser caracterizado por la localización y la configuración en el sitio de incorporación de la molécula de DNA recombinante en el genoma de planta. El sitio en el genoma de planta en el que se ha insertado un DNA recombinante se designa también como el "sitio de inserción" o "sitio diana". La inserción del DNA recombinante en la región del genoma de planta a la que se hace referencia como "DNA pre-inserción de planta" puede estar asociada con una delección de DNA de la planta, a la que se hace referencia como "delección del sitio diana". Una "región flanqueante" o "secuencia flanqueante" como se utiliza en esta memoria se refiere a una secuencia de al menos 20 pares de bases, preferiblemente al menos 50 pares de bases y hasta 5.000 pares de bases de DNA diferente del DNA introducido, preferiblemente DNA del genoma de la planta que está localizado inmediatamente

aguas arriba de y contiguo con o inmediatamente aguas abajo de y contiguo con el DNA extraño. Los procedimientos de transformación que conducen a la integración aleatoria del DNA extraño darán como resultado transformantes con regiones flanqueantes diferentes, que son características y exclusivas para cada transformante. Cuando el DNA recombinante se introduce en una planta por cruzamiento tradicional, su sitio de inserción en el

5 genoma de planta, o sus regiones flanqueantes, no cambiarán por regla general. Una "región de inserción" como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la región correspondiente a la región de al menos 40 pares de bases, preferiblemente al menos 100 pares de bases, y hasta 10.000 pares de bases, abarcada por la secuencia que comprende la región flanqueante aguas arriba y/o aguas abajo de un DNA extraño en el genoma de planta. Tomando en consideración diferencias menores debidas a mutaciones dentro de una especie, una región de

10 inserción retendrá, después de cruzamiento con una planta de la misma especie, al menos 85%, preferiblemente 90%, más preferiblemente 95%, y muy preferiblemente 100% de identidad de secuencia con la secuencia que comprende las regiones flanqueantes aguas arriba y aguas abajo del DNA extraño en la planta obtenida originalmente por transformación.

Un evento se define como un locus genético (artificial) que, como resultado de ingeniería genética, lleva un transgén que comprende al menos una copia de un gen de interés. Los estados alélicos típicos de un evento son la presencia o ausencia del DNA extraño. Un evento se caracteriza fenotípicamente por la expresión del transgén. Al nivel genético, un evento forma parte de la constitución genética de una planta. Al nivel molecular, un evento puede

15 caracterizarse por el mapa de restricción (v.g., como se determina por transferencia Southern), por las secuencias flanqueantes aguas arriba y/o aguas abajo del transgén, la localización de marcadores moleculares y/o la configuración molecular del transgén. Usualmente, la transformación de una planta con un DNA transformante que comprende al menos un gen de interés conduce a una población de transformantes que comprenden una multitud de eventos separados, cada uno de los cuales es exclusivo.

Un evento de élite, como se utiliza en esta memoria, es un evento que se selecciona de un grupo de eventos, obtenido por transformación con el mismo DNA transformante o por retro-cruzamiento con plantas obtenidas por dicha transformación, basado en la expresión y estabilidad del o de los transgenes y su compatibilidad con

25 características agronómicas óptimas de planta que lo comprende. Así, los criterios para selección de eventos de élite son uno o más, preferiblemente dos o más, ventajosamente todos los siguientes:

a) que la presencia del DNA extraño no pone en compromiso otras características deseadas de planta, tales como las relacionadas con la eficiencia agronómica o el valor comercial;

30 b) que el evento se caracteriza por una configuración molecular bien definida que se hereda de manera estable y para la cual pueden desarrollarse instrumentos apropiados para control de identidad;

c) que el gen o genes de interés exhibe(n) una expresión espacial y temporal fenotípica correcta, apropiada y estable, tanto en condición heterocigótica (o hemicigótica) como homocigótica del evento, a un nivel comercialmente aceptable en un intervalo de condiciones ambientales a las cuales es probable que se vean expuestas las plantas

35 portadoras del evento en el uso agronómico normal.

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

El estatus de un evento como evento de élite se confirma por introgresión del evento de élite en diferentes sustratos genéticos relevantes y observación del cumplimiento con uno, dos o la totalidad de los criterios, v.g., a), b) y c)

40 anteriores.

Un "evento de élite" se refiere por tanto a un locus genético que comprende un DNA extraño, que responde a los criterios arriba descritos. Una planta, material de planta, o progenie tal como semillas puede comprender uno o más eventos de élite en su genoma.

Los instrumentos desarrollados para identificar un evento de élite o la planta, material de planta que comprende un evento de élite, o productos que comprenden material de planta que comprende el evento de élite están basados en

45 las características específicas del genoma del evento de élite, tales como un mapa de restricción específico de la región genómica que comprende el DNA extraño, marcadores moleculares o la secuencia de la o las regiones flanqueantes del DNA extraño.

Una vez que una o ambas regiones flanqueantes del DNA extraño han sido secuenciadas, pueden desarrollarse cebadores y sondas que reconocen específicamente esta(estas) secuencia(s) en el ácido nucleico (DNA o RNA) de una muestra por medio de una técnica de biología molecular. Por ejemplo, puede desarrollarse un método PCR para

50 identificar el evento de élite en muestras biológicas (tales como muestras de plantas, material de planta o productos que comprenden material de planta). Una PCR de este tipo está basada en al menos dos "cebadores" específicos, uno de los cuales reconoce una secuencia dentro de la región flanqueante 5' o 3' del evento de élite, en tanto que el

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

Cebadores de PCR adecuados para la invención pueden ser los siguientes:

- 10 - oligonucleótidos de longitud comprendida entre 17 nt y aproximadamente 100 nt, que comprenden una secuencia de nucleótidos de al menos 17 nucleótidos consecutivos, preferiblemente 20 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia flanqueante 5' (SEQ ID No. 1 desde el nucleótido 1 al nucleótido 98 o SEQ ID No. 16 desde el nucleótido 1 al 563) en su extremo 3' (cebadores que reconocen la secuencia flanqueante 5'); o
- 15 - oligonucleótidos comprendidos en longitud desde 17 nt a aproximadamente 200 nt, que comprenden una secuencia de nucleótidos de al menos 17 nucleótidos consecutivos, preferiblemente 20 nucleótidos consecutivos, seleccionados de la secuencia flanqueante 3' (complemento de SEQ ID No. 2 desde el nucleótido 41 al nucleótido 452) en su extremo 3' (cebadores que reconocen secuencias flanqueantes 3'); o
- 20 - oligonucleótidos comprendidos en longitud desde 17 nt a aproximadamente 200 nt, que comprenden una secuencia de nucleótidos de al menos 17 nucleótidos consecutivos, preferiblemente 20 nucleótidos seleccionados de las secuencias de DNA insertadas (complemento de SEQ ID No. 1 desde el nucleótido 99 al nucleótido 334) en su extremo 3' (cebadores que reconocen DNA extraño); o
- 25 - oligonucleótidos comprendidos en longitud desde 17 nt a aproximadamente 40 nt, que comprenden una secuencia de nucleótidos de al menos 17 nucleótidos consecutivos, preferiblemente 20 nucleótidos seleccionados de las secuencias de DNA insertadas (SEQ ID No. 2 desde el nucleótido 1 al nucleótido 40).

Los cebadores pueden ser por supuesto más largos que los 17 nucleótidos consecutivos mencionados, y pueden, v.g., tener una longitud de 20, 21, 30, 35, 50, 75, 100, 150, 200 nt o ser más largos aún. Los cebadores pueden estar constituidos enteramente por secuencias de nucleótidos seleccionadas de las secuencias de nucleótidos mencionadas de secuencias flanqueantes y secuencias de DNA extraño. En cambio, la secuencia de nucleótidos de los cebadores en su extremo 5' (es decir fuera de los 17 nucleótidos consecutivos localizados en 3') es menos crítica. Así, la secuencia 5' de los cebadores puede estar constituida por una secuencia de nucleótidos seleccionada de las secuencias flanqueantes de DNA extraño, en caso apropiado, pero puede contener varios (v.g., 1, 2, 5, 10) apareamientos erróneos. La secuencia 5' de los cebadores puede estar constituida incluso enteramente por una secuencia de nucleótidos no relacionada con las secuencias flanqueantes o el DNA extraño, tal como v.g. una secuencia de nucleótidos que represente sitios de reconocimiento por enzimas de restricción. Tales secuencias no relacionadas con secuencias de DNA flanqueantes con apareamientos erróneos deberían ser preferiblemente no más largas que 100, más preferiblemente no más largas que 50 o incluso 25 nucleótidos.

Además, cebadores adecuados pueden comprender o estar constituidos por una secuencia de nucleótidos en su extremo 3' que abarca la región de unión entre las secuencias derivadas de DNA de la planta y las secuencias de DNA extraño (localizadas en los nucleótidos 98-99 en SEQ ID No. 1 y los nucleótidos 40-41 en SEQ ID No. 2) con tal que los 17 nucleótidos consecutivos mencionados localizados en 3' no se deriven exclusivamente del DNA extraño o de secuencias derivadas de plantas en SEQ ID No. 1 ó 2.

Resultará también inmediatamente claro para el profesional experto que pares de cebadores PCR seleccionados adecuadamente no deben comprender tampoco secuencias complementarias unas a otras.

Para el propósito de la invención, el "complemento de una secuencia de nucleótidos representada en SEQ ID No. X" es la secuencia de nucleótidos que puede derivarse 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 5' a 3', es decir en dirección opuesta de la secuencia de nucleótidos representada.

50 Ejemplos de cebadores adecuados son las secuencias de oligonucleótidos de SEQ ID No. 7 o SEQ ID No. 17 (cebadores de reconocimiento de la secuencia flanqueante 5'), SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 18 o SEQ ID No. 19 (cebadores de reconocimiento de DNA extraño para uso con los cebadores de reconocimiento de la secuencia flanqueante 5'), SEQ ID No. 3 (cebadores de reconocimiento de DNA extraño para uso con los cebadores de reconocimiento de la secuencia flanqueante 3'), SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 6 (cebadores de

reconocimiento de la secuencia flanqueante 3') y SEQ ID Nos. 10 y 11 (cebadores de reconocimiento de la transposición específica de DNA extraño en EE-GH5).

Otros ejemplos de cebadores oligonucleotídicos adecuados comprenden en su extremo 3' las secuencias siguientes o están constituidos por secuencias de este tipo:

- 5 a. cebadores de reconocimiento de la secuencia flanqueante 5':
- la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 58 al nucleótido 77
 - la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 16 desde el nucleótido 85 al nucleótido 104
 - la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 16 desde el nucleótido 150 al nucleótido 166
 - la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 16 desde el nucleótido 150 al nucleótido 171
- 10 - la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 16 desde el nucleótido 154 al nucleótido 171
- la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 16 desde el nucleótido 87 al nucleótido 104
 - la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 16 desde el nucleótido 189 al nucleótido 206
- b. cebadores de reconocimiento de la secuencia de DNA extraño para uso con los cebadores de reconocimiento de la secuencia flanqueante 5':
- 15 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 149 al nucleótido 170
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 169 al nucleótido 186
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 193 al nucleótido 212
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 161 al nucleótido 178
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 194 al nucleótido 211
- 20 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 193 al nucleótido 211
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 163 al nucleótido 185
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 194 al nucleótido 210
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 193 al nucleótido 210
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 193 al nucleótido 209
- 25 c. cebadores de reconocimiento de la secuencia flanqueante 3':
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 149 al nucleótido 168
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 154 al nucleótido 173
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 140 al nucleótido 159
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 141 al nucleótido 160
- 30 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 147 al nucleótido 166
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 148 al nucleótido 167
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 149 al nucleótido 167
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 153 al nucleótido 172
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 154 al nucleótido 174
- 35 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 160 al nucleótido 177
- el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 232 al nucleótido 251

ES 2 432 406 T3

- el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 140 al nucleótido 160
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 141 al nucleótido 161
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 147 al nucleótido 165
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 149 al nucleótido 166
 - 5 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 148 al nucleótido 166
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 147 al nucleótido 167
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 148 al nucleótido 168
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 153 al nucleótido 173 .
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 154 al nucleótido 175
 - 10 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 156 al nucleótido 175
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 232 al nucleótido 250
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 140 al nucleótido 157
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 140 al nucleótido 161
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 141 al nucleótido 162
 - 15 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de S.EQ ID No 2 desde el nucleótido 148 al nucleótido 165
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 149 al nucleótido 165
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 147 al nucleótido 168
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 148 al nucleótido 169
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 156 al nucleótido 174
 - 20 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 153 al nucleótido 174
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 232 al nucleótido 249
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 234 al nucleótido 251
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 141 al nucleótido 163
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 148 al nucleótido 164
 - 25 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 147 al nucleótido 169
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 153 al nucleótido 175
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 156 al nucleótido 177
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 181 al nucleótido 198
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 181 al nucleótido 202
 - 30 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 234 al nucleótido 250
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 140 al nucleótido 162
 - el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 181 al nucleótido 203
- d. Cebadores de reconocimiento de la secuencia de DNA extraño para uso con los cebadores de reconocimiento de la secuencia flanqueante 3':
- 35 - la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 30 al nucleótido 49

- la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 30 al nucleótido 48
- la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 32 al nucleótido 48
- la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 32 al nucleótido 49
- la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 31 al nucleótido 49
- 5 - la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 31 al nucleótido 48
- la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 2 desde el nucleótido 30 al nucleótido 46

Como se utiliza en esta memoria, "la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. Z desde la posición X a la posición Y" indica la secuencia de nucleótidos que incluye ambos puntos finales nucleotídicos.

- 10 Preferiblemente, el fragmento amplificado tiene una longitud comprendida entre 50 y 500 nucleótidos, muy preferiblemente entre 100 y 350 nucleótidos. Los cebadores específicos pueden tener una secuencia que es entre 80 y 100% idéntica a una secuencia comprendida dentro de la región flanqueante 5' ó 3' del evento de élite y el DNA extraño del evento de élite, respectivamente, con tal que los apareamientos erróneos permitan todavía la identificación específica del evento de élite con estos cebadores en condiciones PCR optimizadas. El intervalo de apareamientos erróneos permisible, sin embargo, puede ser determinado con facilidad experimentalmente y son
- 15 conocidos por una persona experta en la técnica.

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

Cebador 1	Desde la posición	Cebador 2	Hasta la posición	Longitud del amplicón
HVH024	58	DPA312	186	128
GHI057	1	MAE115	175	175
GHI057	1	HVH022	251	251
GHI057	1	GHI065	369	369

- 20 La detección de fragmentos de integración puede ocurrir de diversas maneras, v.g. por estimación de tamaño después de análisis en gel. Los fragmentos de integración pueden ser secuenciados también directamente. Otros métodos específicos de la secuencia para detección de fragmentos de DNA amplificados se conocen también en la técnica.

- 25 Dado que la secuencia de los cebadores y su localización relativa en el genoma son exclusivas para el evento de élite, la amplificación del fragmento de integración ocurrirá únicamente en muestras biológicas que comprenden (el ácido nucleico de) el evento de élite. Preferiblemente, cuando se realiza una PCR para identificar la presencia de EE-GH5 en muestras desconocidas, se incluye un control de un juego de cebadores con el cual puede amplificarse un fragmento dentro de un "gen propio" de la especie de planta del evento. Los genes internos son gens que son expresados en la mayoría de los tipos de células y que conciernen a actividades metabólicas básicas comunes a todas las células. Preferiblemente, el fragmento amplificado del gen propio. es un fragmento que es mayor que el
- 30 fragmento de integración amplificado. Dependiendo de las muestras a analizar, pueden incluirse otros controles.

- Se describen en la técnica protocolos PCR estándar, por ejemplo en "PCR Applications Manual" (Roche Molecular Biochemicals, 2ª edición, 1999) y otras referencias. Las condiciones óptimas para la PCR, con inclusión de la secuencia de los cebadores específicos, se especifican en un "protocolo de identificación PCR" para cada evento de élite. Sin embargo, se comprende que puede ser necesario ajustar cierto número de parámetros en el protocolo de
- 35 identificación PCR a condiciones específicas de laboratorio, que pueden modificarse ligeramente para obtener resultados similares. Por ejemplo, el uso de un método diferente para preparación de DNA puede requerir el ajuste de, por ejemplo, la cantidad de cebadores, polimerasa y las condiciones de reasociación utilizadas. Análogamente, la selección de otros cebadores puede dictar otras condiciones óptimas para el protocolo de identificación PCR. Estos ajustes serán sin embargo evidentes para una persona experta en la técnica, y se detallan adicionalmente en
- 40 manuales de aplicaciones PCR actuales tales como el citado anteriormente.

Alternativamente, se pueden utilizar cebadores específicos para amplificar un fragmento de integración que pueda ser utilizado como "sonda específica" para identificación de EE-GH5 en muestras biológicas. La puesta en contacto de ácido nucleico de una muestra biológica, con la sonda, en condiciones que permitan la hibridación de la sonda con su fragmento correspondiente en el ácido nucleico, da como resultado la formación de un híbrido ácido nucleico/sonda. La formación de este híbrido puede detectarse (v.g. marcación del ácido nucleico o sonda), con lo cual la formación de este híbrido indica la presencia de EE-GH5. Métodos de identificación de este tipo basados en hibridación con una sonda específica (sea en un portador de fase sólida o en solución) han sido descritos en la técnica. La sonda específica es preferiblemente una secuencia que, en condiciones optimizadas, se hibrida específicamente a una región dentro de la región flanqueante 5' ó 3' del evento de élite y que comprende también preferiblemente parte del DNA extraño contiguo a ella (al que se hace referencia en lo sucesivo en esta memoria como "región específica"). Preferiblemente, la sonda específica comprende una secuencia de entre 50 y 500 pb, preferiblemente de 100 a 350 pb que es al menos 80%, preferiblemente entre 80 y 85%, más preferiblemente entre 85 y 90%, de modo especialmente preferible entre 90 y 95%, muy preferiblemente entre 95% y 100% idéntica (o complementaria) a la secuencia de nucleótidos de una región específica. Preferiblemente, la sonda específica comprenderá una secuencia de aproximadamente 15 a aproximadamente 100 nucleótidos contiguos idénticos (o complementarios) a una reacción específica del evento de élite.

Los oligonucleótidos adecuados como cebadores PCR para detección del evento de élite EE-GH5 pueden utilizarse también para desarrollar un protocolo basado en PCR a fin de determinar el estatus de cigosidad del evento de élite. A este fin, se diseñan dos cebadores que reconozcan el locus de tipo salvaje de tal manera que los mismos están dirigidos uno hacia otro y tienen el sitio de inserción localizado entre ellos. Estos cebadores pueden ser cebadores que reconocen específicamente las secuencias flanqueantes 5' y 3' contenidas dentro de SEQ ID No. 1, ó 2, respectivamente. Estos cebadores pueden ser también cebadores que reconocen específicamente la secuencia flanqueante 5' ó 3' (tal como un cebador que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 7 o SEQ ID Nos. 4-6) así como un cebador que reconoce la región delecionada durante la inserción de EE-GH5 dentro del DNA pre-inserción de planta). Este juego de cebadores, junto con un tercer cebador complementario a las secuencias de DNA transformante (tal como un cebador que tenga la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 3) permite la amplificación por PCR de diagnóstico del locus específico EE-GH5, así como del locus de tipo salvaje. Si la planta es homocigótica para el locus transgénico o el locus de tipo salvaje correspondiente, la PCR de diagnóstico dará lugar a un solo producto PCR típico, preferiblemente típico en longitud, para el locus transgénico o el locus de tipo salvaje. Si la planta es hemocigótica para el locus transgénico, aparecerán dos productos PCR específicos del locus, reflejando ambos la amplificación del locus transgénico como la del tipo salvaje.

Adicionalmente, métodos de detección específicos para el evento de élite EE-GH5 que difieren de los métodos de amplificación basados en PCR pueden desarrollarse también utilizando la información de secuencia específica del evento de élite proporcionada en esta memoria. Tales métodos de detección alternativos incluyen métodos lineales de detección de amplificación de señal basados en la escisión invasiva de estructuras de ácido nucleico particulares, conocidas también como tecnología Invader™ (como se describe (v.g. en la Patente US 5.985.557 "Invasive Cleavage of Nucleic Acids", 6.001.567 "Detection of Nucleic Acids Sequences by Invader Directed Cleavage"). A este fin, la secuencia diana puede hibridarse con un cebador oligonucleótido de ácido nucleico marcado que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 1 desde el nucleótido 99 al nucleótido 116 o su complemento o dicha sonda de ácido nucleico marcado que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 2 desde el nucleótido 23 al nucleótido 40 o su complemento, y está hibridada ulteriormente con un segundo oligonucleótido de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 1 desde el nucleótido 81 al nucleótido 98 o su complemento o dicha sonda de ácido nucleico marcado que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 2 desde el nucleótido 41 al nucleótido 58 o su complemento, en donde los oligonucleótidos primero y segundo están solapados por al menos un nucleótido. La estructura dúplex o tríplex que se produce por esta hibridación permite la escisión selectiva de la sonda con una enzima (Cleavase®) que deja intacta la secuencia diana. La sonda marcada escindida se detecta subsiguientemente, potencialmente por un paso intermedio que da como resultado una amplificación ulterior de la señal.

Un "kit", como se utiliza en esta memoria, se refiere a un juego de reactivos para el propósito de realización del método de la invención, más particularmente, la identificación del evento de élite EE-GH5 en muestras biológicas o la determinación del estatus de cigosidad del material de planta que contiene EE-GH5. Más particularmente, una realización preferida del kit de la invención comprende al menos uno o dos cebadores específicos, como se ha descrito arriba para la identificación del evento de élite, o tres cebadores específicos para la determinación del estatus de cigosidad. Opcionalmente, el kit puede comprender además cualquier otro reactivo descrito en esta memoria en el protocolo de identificación PCR. Alternativamente, de acuerdo con otra realización de esta invención, el kit puede comprender una sonda específica, como se ha descrito arriba, que se hibrida específicamente con ácido nucleico de muestras biológicas para identificar la presencia de EE-GH5 en ellas. Opcionalmente, el kit puede comprender además cualquier otro reactivo (tal como, pero sin carácter limitante, tampón de hibridación, marcador) para la identificación de EE-GH5 en muestras biológicas, utilizando la sonda específica.

El kit de la invención puede utilizarse, y sus componentes pueden ajustarse específicamente, para propósitos de control de calidad (v.g., pureza de lotes de semillas), detección de la presencia o ausencia del evento de élite en material de planta o material que comprende o se deriva de material de planta, tal como, pero sin carácter limitante, productos alimenticios o piensos.

- 5 Como se utiliza en esta memoria, "identidad de secuencia" con relación a las secuencias de nucleótidos (DNA o RNA) 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 and Lipmann, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:726) utilizando un tamaño de ventana de 20 nucleótidos, una longitud de palabra de 4 nucleótidos, y una penalidad por laguna de 4. El análisis asistido por
10 computadora y la interpretación de los datos de secuencia, con inclusión de la alineación de las secuencias como se describe arriba, pueden, v.g., realizarse convenientemente utilizando el paquete de software de análisis de secuencias del Genetics Computer Group (GCG, Centro de Biotecnología de la Universidad de Wisconsin). Las secuencias se consideran "esencialmente similares" cuando dichas secuencias tienen una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 75%, en particular al menos aproximadamente 80%, de modo más particular al
15 menos aproximadamente 85%, de modo muy particular aproximadamente 90%, en especial aproximadamente 95%, y de modo más especial aproximadamente 100%. Está claro que cuando se dice que secuencias de RNA son esencialmente similares o tienen cierto grado de identidad de secuencia con secuencias de DNA, la timidina (T) en la secuencia de DNA se considera igual al uracilo (U) en la secuencia de RNA.

- 20 El término "cebador", como se utiliza en esta memoria, abarca cualquier ácido nucleico que es capaz de cebar la síntesis de un ácido nucleico naciente en un proceso dependiente molde, tal como PCR. Típicamente, los cebadores son oligonucleótidos de 10 a 30 nucleótidos, pero puede emplearse secuencias más largas. Los cebadores pueden proporcionarse en forma bicatenaria, aunque se prefiere la forma monocatenaria. Pueden utilizarse sondas como cebadores, pero están diseñadas para fijarse a DNA o RNA diana y no precisan ser utilizadas en un proceso de amplificación.

- 25 El término "reconocimiento", como se utiliza en esta memoria cuando se hace referencia a cebadores específicos, se refiere al hecho de que los cebadores específicos se hibridan específicamente a una secuencia de ácido nucleico en el evento de élite en las condiciones indicadas en el método (tales como las condiciones del protocolo de identificación PCR), con lo cual la especificidad está determinada por la presencia de promotores positivos y negativos.

- 30 El término "hibridación", como se utiliza en esta memoria cuando se hace referencia a sondas específicas, se refiere al hecho de que la sonda se fija a una región específica en la secuencia de ácido nucleico del evento de élite en condiciones de severidad estándar. Las condiciones de severidad estándar como se utilizan en esta memoria se refieren a las condiciones para hibridación descritas en esta memoria o a las condiciones convencionales de hibridación como han sido descritos por Sambrook et al., 1989 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición,
35 Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY) que pueden comprender por ejemplo los pasos siguientes: 1) inmovilización de fragmentos de DNA genómicos de planta sobre un filtro, 2) prehibridación del filtro durante 1 a 2 horas a 42°C en formamida al 50%, 5 X SSPE, 2X reactivo de Denhardt y 0,1% SDS, o durante 1 a 2 horas a 68°C en 6X SSC, 2 X reactivo de Denhardt y 0,1% SDS, 3) adición de la sonda de hibridación que se ha marcado, 4) incubación durante 16 a 24 horas, 5) lavado del filtro durante 20 min a la temperatura ambiente en 1X SSC, 0,1%
40 SDS, 6) lavado del filtro 3 veces durante 20 min cada vez a 68°C en 0,2 X SSC, 0,1% SDS, y 7) exposición del filtro durante 24 a 48 horas a film de rayos X a -70°C con un filtro intensificador.

- Como se utiliza en esta memoria, una muestra biológica es una muestra de una planta, material de planta o productos que comprenden material de planta. El término "planta" tiene por objeto abarcar tejidos de planta de algodón (*Gossypium hirsutum*), en cualquier etapa de madurez, así como cualesquiera células, tejidos, u órganos
45 tomados o derivados de cualquiera de tales plantas, incluyendo sin limitación, cualesquiera semillas, hojas, tallos, flores, raíces, células individuales, gametos, cultivos de células, cultivos de tejido o protoplastos. "Material de planta", como se utiliza en esta memoria, hace referencia a un material que se obtiene o se deriva de una planta. Productos que comprenden material de planta se refieren a productos alimenticios, piensos u otros productos que se obtienen utilizando material de plantas o pueden estar contaminados por material de plantas. Debe entenderse que, en el
50 contexto de la presente invención, tales muestras biológicas se testan respecto a la presencia de ácidos nucleicos específicos para EE-GH5, que implican la presencia de ácidos nucleicos en las muestras. Así, los métodos a que se hace referencia en esta memoria para identificación del evento de élite EE-GH5 muestras biológicas, se refieren a la identificación en muestras biológicas de ácidos nucleicos que comprenden el evento de élite.

- 55 Como se utiliza en esta memoria, "que comprende" debe interpretarse como especificación de la presencia de las características, entidades, pasos, reactivos o componentes indicados a que se ha hecho referencia, pero no excluye la presencia o adición de una o más características, entidades, pasos o componentes, o grupos de los mismos. Así, v.g., un ácido nucleico o proteína que comprende una secuencia de nucleótidos o aminoácidos, puede comprender

más nucleótidos o aminoácidos que los citados explícitamente, es decir, puede estar incrustado en un ácido nucleico o proteína de mayor tamaño. Un gen quimérico que comprende una secuencia de DNA que está definida funcional o estructuralmente, puede comprender secuencias de DNA adicionales, etc.

5 La presente invención se refiere también al desarrollo de un evento de élite EE-GH5 en algodón, a las plantas que comprenden este evento, a la progenie obtenida a partir de estas plantas y a las células de las plantas, o material de plantas derivado de este evento. Plantas que comprenden el evento de élite EE-GH5 se obtuvieron como se describe en el Ejemplo 1.

10 Plantas o material de plantas de algodón que comprenden EE-GH5 pueden identificarse de acuerdo con el protocolo de identificación PCR descrito para EE-GH5 en el Ejemplo 2. Resumidamente, el DNA genómico de algodón presente en la muestra biológica se amplifica por PCR utilizando un cebador que reconoce específicamente una secuencia dentro de la secuencia flanqueante 5' ó 3' de EE-GH5 tal como el cebador con la secuencia de SEQ ID No. 6, y un cebador que reconoce una secuencia en el DNA extraño, tal como el cebador con la secuencia de SEQ ID No. 3. Cebadores de DNA que amplifican parte de una secuencia endógena de algodón se utilizan como control positivo para la amplificación PCR. Si, después de la amplificación PCR, el material produce un fragmento del tamaño esperado, el material contiene material de planta de una planta de algodón que alberga el evento de élite EE-GH5.

20 Las plantas que albergan EE-GH5 se caracterizan por su resistencia a los insectos, así como por su tolerancia a glufosinato. Las plantas que albergan EE-GH5 se caracterizan también por tener características agronómicas que son comparables a variedades de algodón disponibles comercialmente en los Estados Unidos, en ausencia de presión de insectos. Se ha observado que la presencia de un DNA extraño en la región de inserción del genoma de la planta de algodón descrito en esta memoria, confiere características fenotípicas y moleculares particularmente interesantes a las plantas que comprenden este evento.

Los ejemplos siguientes describen la identificación del evento de élite EE-GH5 y el desarrollo de instrumentos para la identificación específica del evento de élite EE-GH5 en muestras biológicas.

25 A no ser que se especifique otra cosa en los ejemplos, todas las técnicas recombinantes se llevan a cabo de acuerdo con protocolos estándar como se describen en "Sambrook J and Russell DW (eds.) (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York" y en "Ausubel FA, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA and Struhl K (eds.) (2006) Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, New York".

30 Materiales estándar y referencias se describen en "Croy RDD (ed.) (1993) Plant Molecular Biology LabFax, BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford and Blackwell Scientific Publications, Oxford" y en "Brown TA, (1998) Molecular Biology LabFax, 2nd Edition, Academic Press, San Diego". Materiales estándar y métodos para reacciones en cadena de polimerasa (PCR) se pueden encontrar en "McPherson MJ and Meller SG (2000) PCR (The Basics), BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford" y en "PCR Applications Manual, 3rd Edition (2006), Roche Diagnostics GmbH, Mannheim o en www.roche-applied-science.com".

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

SEQ ID No. 1: secuencia de nucleótidos que comprende una región flanqueante 5' de EE-GH5

SEQ ID No. 2: secuencia de nucleótidos que comprende una región flanqueante 3' de EE-GH5

SEQ ID No. 3: cebador GHI057

40 SEQ ID No. 4: cebador MAE115

SEQ ID No. 5: cebador HVH022

SEQ ID No. 6: cebador GHI065

SEQ ID No. 7: cebador HVH024

SEQ ID No. 8: cebador DPA312

SEQ ID No. 9: cebador GHI066

SEQ ID No. 10: cebador GHI047

SEQ ID No. 11 : cebador GHI048

SEQ ID No. 12:	Secuencia de nucleótidos del fragmento amplificado de DNA de algodón que comprende EE-GH5 utilizando GHI047 y GHI048
SEQ ID No. 13:	cebador 1 para amplificación del fragmento de control
SEQ ID No. 14:	cebador 2 para amplificación del fragmento de control
SEQ ID No. 15:	Secuencia de nucleótidos de la secuencia diana genómica de la planta antes de la inserción de EE-GH5
SEQ ID No. 16:	Secuencia de nucleótidos que comprende una región flanqueante 5' de EE-GH5 (larga)
SEQ ID No. 17:	cebador HVH036
SEQ ID No. 18:	cebador SHA028
SEQ ID No. 19:	cebador MAE067

Ejemplos

1. Identificación del evento de élite EE-GH5

5 Se desarrolló algodón resistente a los insectos por transformación de algodón con un vector que comprendía la secuencia codificante de un gen cry1ab modificado bajo el control de un promotor S7 del virus de la atrofia subterránea del trébol.

10 El evento de élite EE-GH5 se seleccionó basándose en un procedimiento de selección exhaustivo basado en expresión satisfactoria y estabilidad del gen de resistencia a los insectos, y se evaluaron su compatibilidad con características agronómicas óptimas tales como altura de la planta, altura hasta el nudo, retención de las cápsulas, firmeza, vigor, longitud de fibra, resistencia de fibra y rendimiento de hilas.

El evento seleccionado se introdujo en sustratos genéticos comerciales diferentes, y se compararon los resultados de las pruebas en campo en localidades diferentes. Las plantas se expusieron a plagas de insectos utilizando tratamientos diferentes. Las plantas exhibían un control satisfactorio de los insectos.

15 Adicionalmente, el evento tenía morfología normal de hoja, flor y cápsula, fertilidad excelente, y no presentaba enfermedad alguna o susceptibilidad anormal a los insectos en sustratos genéticos múltiples. Durante la introgresión en sustratos genéticos múltiples no se observaron en ningún caso problemas o anomalías aberrantes.

2. Identificación de las regiones flanqueantes del evento de élite EE-GH5

20 La secuencia de las regiones que flanqueaban el DNA extraño en el evento de élite EE-GH5 se determinó utilizando el método térmico asimétrico entrelazado (TAIL-)PCR descrito por Liu et al. (1995, Plant J. 8 (3): 457-463) siempre que era posible. Este método utiliza 3 cebadores anidados en reacciones sucesivas junto con un cebador degenerado arbitrario más corto de tal manera que las eficiencias de amplificación relativas de los productos específicos y no específicos pueden ser controladas térmicamente. Los cebadores específicos se seleccionaron para reasociación al borde del DNA extraño y se basaban en sus condiciones de reasociación. Una pequeña cantidad (5 µl) de productos PCR impurificados, secundarios y terciarios se analizaron en un gel de agarosa al 1%. El producto PCR terciario se purificó y se secuenció.

2.1. Región flanqueante derecha (5')

30 Se secuenció el fragmento identificado que comprendía la región flanqueante 5' (SEQ ID No. 1). La secuencia entre los nucleótidos 1 y 98 corresponde a DNA de la planta, mientras que la secuencia entre los nucleótidos 99 y 334 corresponde a DNA extraño. Se secuenció también un fragmento más largo que comprendía la región flanqueante 5' (SEQ ID No. 16). La secuencia entre los nucleótidos 1 y 563 corresponde al DNA de la planta, mientras que la secuencia entre los nucleótidos 564 y 799 corresponde al DNA extraño.

2.2. Región flanqueante izquierda (3')

35 Se secuenció el fragmento identificado que comprendía la región flanqueante 3' obtenido por el método TAIL-PCR (SEQ ID No. 2). La secuencia entre los nucleótidos 1 y 40 corresponde a DNA extraño, mientras que la secuencia entre los nucleótidos 41 y 452 corresponde a DNA de la planta.

2.3. Región que comprende la transposición específica EE-GH5 en DNA extraño.

Se identificó la secuencia de nucleótidos de una región que comprendía la transposición específica EE-GH5 en el DNA extraño (SEQ ID No. 12). La región entre las posiciones de los nucleótidos 52 y 88 se identificó como región que había sufrido transposición cuando se comparó con el DNA utilizado para obtener transformantes a partir de los cuales se seleccionó el evento de élite EE-GH5.

5 **3. Desarrollo de protocolos de identificación de la reacción en cadena de polimerasa para EE-GH5**

3.1. Cebadores

Se desarrollaron cebadores específicos que reconocen secuencias dentro del evento de élite.

10 Más particularmente, se seleccionaron 2 cebadores que reconocen secuencias que flanquean la transposición específica EE-GH5 en el DNA extraño. Los cebadores abarcan una secuencia de aproximadamente 262 pares de bases. Se encontró que los cebadores siguientes dan resultados particularmente claros y reproducibles en una reacción PCR sobre DNA de EE-GH5:

GHI047: 5'-TgC.CTC.TTg.AAC.TgT.AgC-3' (SEQ ID No.: 10)

GHI048: 5'-ACT.TgC.AgT.TgC.TgA.TgA.Tg-3' (SEQ ID No.: 11)

15 Alternativamente, se desarrolló un cebador que reconoce una secuencia dentro de la región flanqueante 5' de EE-GH5. Se seleccionó luego un segundo cebador dentro de la secuencia del DNA extraño de tal manera que los cebadores abarcan una secuencia de aproximadamente 369 nucleótidos. Se encontró que los cebadores siguientes dan resultados particularmente claros y reproducibles en una reacción PCR sobre DNA de EE-GH5:

GHI065: 5'- ggg.CCg.gAT.AAA.ATT.AgC.CT-3' (SEQ ID No.: 6)

(diana: DNA de planta)

20 GHI057: 5'- ATA.gCg.CgC.AAA.CTA.ggA-3' (SEQ ID No.: 3)

(diana: DNA de inserción)

25 En el cóctel PCR se incluyen preferiblemente los cebadores que están direccionados a una secuencia endógena. Estos cebadores sirven como control interno en muestras desconocidas y en el control positivo de DNA. Un resultado positivo con el par de cebadores endógenos demuestra que hay abundante DNA de calidad adecuada en la preparación del DNA genómico para generar un producto PCR. Los cebadores endógenos se seleccionaron para reconocer un gen propio en algodón:

GHI001: 5'-AAC.CTA.ggC.TgC.TgA.Agg.AgC-3' (SEQ ID No.: 13)

GHI002: 5'-CAA.CTC.CTC.CAg.TCA.TCT.CCg-3' (SEQ ID No.: 14)

3.2. Fragmentos amplificados

30 Los fragmentos amplificados esperados en la reacción PCR son:

Para el par de cebadores GHI001-GHI002: 445pb (control endógeno)

Para el par de cebadores GHI047-GHI048: 262pb (Evento de élite EE-GH5)

Para el par de cebadores GHI057-GHI065: 369pb (Evento de élite EE-GH5)

3.3. DNA molde

35 Se preparó DNA molde a partir de un trozo circular de hoja de acuerdo con Edwards *et al.*, (Nucleic Acids Research 19, p1349, 1991). En caso de utilizar DNA preparado por otros métodos, debía realizarse una operación de test utilizando cantidades diferentes molde. Usualmente, 50 ng de DNA genómico molde proporcionan los resultados óptimos.

3.4. Controles positivo y negativo asignados.

40 Para evitar positivos o negativos falsos, se determinó que debían incluirse en una operación PCR los controles positivos y negativos siguientes:

- Control Master Mix (control negativo de DNA). Ésta es una PCR en la cual no se añade DNA alguno a la reacción. Cuando se observa el resultado esperado, sin productos PCR, esto indica que el cóctel PCR no estaba contaminado con DNA diana.
- 5 - Un control positivo de DNA (muestra de DNA genómico conocida que se sabe contiene las secuencias transgénicas). La amplificación satisfactoria de este control positivo demuestra que a PCR se efectuó en condiciones que permiten la amplificación de las secuencias diana.
- Un control de DNA de tipo salvaje. Ésta es una PCR en la cual el DNA molde proporcionado es DNA genómico preparado a partir de una planta no transgénica. Cuando se observa el resultado esperado, sin amplificación de un producto PCR transgénico pero con amplificación del producto PCR endógeno, ello indica que no hay amplificación alguna detectable del sustrato transgénico en una muestra de DNA genómico.

3.5. Condiciones de la PCR

Los resultados óptimos se obtuvieron en las condiciones siguientes:

- la mezcla PCR para reacciones de 25 µl contiene:
 - 2,5 µl DNA molde
 - 15 2,5 µl 10x Tampón de Amplificación (suministrado por el fabricante con la polimerasa Taq)
 - 0,5 µl dNTP's 10 mM
 - 0,4 µl GHI001 (10pmoles/ml)
 - 0,4 µl GHI002 (10pmoles/ml)
 - 20 0,7 µl GHI047 (10pmoles/ml) o GHI057 (protocolo PCR 2)
 - 0,7 µl GHI048 (10pmoles/ml) o GHI065 (protocolo PCR 2)
 - 0,1 µl DNA polimerasa Taq (5 unidades/µl)
 - agua hasta 25 ml

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

- 25 4 min. at 95°C
- Seguido por: 1 min. a 95°C
- 1 min. a 57°C
- 2 min. a 72°C
- Durante 5 ciclos
- 30 Seguido por: 30 s. a 92°C
- 30 s. a 57°C
- 1 min. a 72°C
- Durante 25 ciclos
- Seguido por: 10 minutos a 72°C

35 3.6. Análisis en gel de agarosa

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

3.7. Validación de los resultados

Se determinó que los datos de las muestras de DNA de plantas transgénicas dentro de una operación PCR aislada y un cóctel PCR aislado no deberían considerarse aceptables a no ser que 1) el control positivo de DNA exhiba los productos PCR esperados (fragmentos transgénicos y endógenos), 2) el control negativo de DNA sea negativo para la amplificación PCR (sin fragmentos) y 3) el control de DNA de tipo salvaje exhiba el resultado esperado (amplificación de fragmentos endógenos).

Cuando se sigue el Protocolo de Identificación PCR para EE-GH5 como se ha descrito arriba, las pistas que presentan cantidades visibles de los productos PCR transgénicos y endógenos de los tamaños esperados, indican que la planta correspondiente a partir de la cual se había preparado el DNA genómico molde, ha heredado el evento de élite EE-GH5. Las pistas que no muestran cantidades visibles de ninguno de los productos PCR transgénicos y presentan cantidades visibles de producto PCR endógeno, indican que la planta correspondiente a partir de la cual se había preparado el DNA genómico molde, no comprende el evento de élite. Las pistas que no presentan cantidades visibles de los productos PCR endógenos y transgénicos, indican que la calidad y/o cantidad del DNA genómico no permitía la generación de un producto PCR. Estas plantas no pueden clasificarse. La preparación de DNA genómico debería repetirse y tiene que realizarse una nueva operación PCR, con los controles apropiados.

3.8. Uso de protocolo PCR discriminante para identificar EE-GH5

Antes de intentar cribar muestras desconocidas, tiene que realizarse una operación de test con todos los controles apropiados. El protocolo desarrollado podría requerir optimización para componentes que puedan diferir entre laboratorios (preparación del DNA molde, DNA-polimerasa Taq, calidad de los cebadores, dNTP's, termociclador, etc.).

La amplificación de la secuencia endógena juega un papel fundamental en el protocolo. Es necesario conseguir condiciones de PCR y termociclación que amplifiquen cantidades equimolares de ambas secuencias endógena y transgénica en un molde de DNA genómico transgénico conocido. Siempre que el fragmento endógeno direccionado no se amplifique o siempre que las secuencias direccionadas no se amplifiquen con las mismas intensidades de tinción con bromuro de etidio, a juzgar por electroforesis en gel de agarosa, puede requerirse optimización de las condiciones PCR.

Se testó material de hoja de cierto número de plantas de algodón, algunas de las cuales comprendían EE-GH5, de acuerdo con el protocolo arriba descrito. Muestras del evento de élite EE-GH5 y de algodón de tipo salvaje se tomaron como controles positivo y negativo, respectivamente.

La Figura 2 ilustra el resultado obtenido con el protocolo de identificación PCR 1 del evento de élite para EE-GH5 sobre cierto número de muestras de plantas de algodón. Se encontró que las muestras en las pistas 2 a 3 contenían el evento de élite dado que se detectaba la banda de 305 pares de bases, mientras que las muestras en las pistas 4 a 10 no comprenden EE-GH5. Las pistas 4 y 10 comprenden otros eventos de élite de algodón (con inclusión de plantas que comprenden genes quiméricos de tolerancia a diferentes insectos); la pista 11 representa la muestra del control negativo (agua), y las pistas 1 y 12 representan el Marcador de Peso Molecular (escalera de 100 pares de bases).

4. Uso de un fragmento de integración específico como sonda para detección de material que comprende EE-GH5

Se obtiene un fragmento de integración específico de EE-GH5 por amplificación PCR utilizando los cebadores específicos GHI047 (SEQ ID No. 10) y GHI048 (SEQ ID No. 11) o por síntesis química, y se marca. Este fragmento de integración se utiliza como sonda específica para la detección de EE-GH5 en muestras biológicas. El ácido nucleico se extrae de las muestras de acuerdo con procedimientos estándar. Este ácido nucleico se pone luego en contacto con la sonda específica en condiciones de hibridación que están optimizadas para permitir la formación de un híbrido. La formación del híbrido se detecta luego para indicar la presencia de ácido nucleico de EE-GH5 en la muestra. Opcionalmente, el ácido nucleico en las muestras se amplifica utilizando los cebadores específicos antes del contacto con la sonda específica. Alternativamente, el ácido nucleico se marca antes del contacto con la sonda específica en lugar del fragmento de integración. Opcionalmente, la sonda específica se fija a un portador sólido (tal como, pero sin carácter limitante, un filtro, cinta o cuentas) antes del contacto con las muestras.

5. Protocolo para la determinación basada en PCR del estatus de cigosidad del material de planta de algodón EE-GH5

5.1. Cebadores

Se diseñaron dos cebadores que reconocían las secuencias de nucleótidos del locus de tipo salvaje antes de inserción del evento de élite, de tal manera que los mismos están dirigidos uno hacia otro y tienen el sitio de inserción entre ambos. Este juego de cebadores, junto con un tercer cebador complementario para las secuencias

de DNA extraño y dirigido hacia el DNA flanqueante, permiten la amplificación PCR simultánea del locus EE-GH5 así como del locus de tipo salvaje.

Se encontró que los cebadores siguientes dan resultados particularmente claros y reproducibles en una reacción PCR de clasificación de la cigosidad sobre DNA de EE-GH5:

5	GHI066	5'- AgA.TAA.AAT.CgT.CAg.TgC.Tg-3'	(SEQ ID No.: 9)
		(diana: DNA de planta aguas arriba de la secuencia flanqueante 5')	
	GHI057	5'-ATA.gCg.CgC.AAA.CTA.ggA-3'	(SEQ ID No.: 3)
		(diana: DNA de inserción)	
	GHI065	5'- ggg.CCg.gAT.AAA.ATT.AgC.CT-3'	(SEQ ID No.: 6)
10		(diana: DNA de planta de la secuencia flanqueante 3')	

5.2. Fragmentos amplificados

Los fragmentos amplificados esperados de la reacción PCR son:

Para el par de cebadores GHI065 - GHI066: 517 pb (locus de tipo salvaje)

Para el par de cebadores GHI057 - GHI065: 369 pb (locus EE-GH5)

15 5.3. DNA molde

Se preparó DNA molde a partir de un trozo circular de hoja de acuerdo con Edwards *et al.*, (Nucleic Acids Research, 19, p1349, 1991). En caso de utilizar DNA preparado por otros métodos, debería realizarse una operación de test empleando cantidades de molde diferentes. Usualmente, 50 ng de DNA genómico molde proporcionan los resultados óptimos.

20 5.4. Controles positivo y negativo asignados

Para evitar positivos o negativos falsos, es aconsejable que se incluyan los controles positivos y negativos siguientes en una operación PCR:

- Control Master Mix (control negativo de DNA). Ésta es una PCR en la cual no se añade DNA alguno a la reacción. Cuando se observa el resultado esperado, sin productos PCR, esto indica que el cóctel PCR no estaba contaminado con DNA diana.
- Un control positivo de DNA (muestra de DNA genómico conocida que se sabe contiene las secuencias transgénicas). La amplificación satisfactoria de este control positivo demuestra que a PCR se efectuó en condiciones que permiten la amplificación de las secuencias diana.
- Un control de DNA de tipo salvaje. Ésta es una PCR en la cual el DNA molde proporcionado es DNA genómico preparado a partir de una planta no transgénica. Cuando se observa el resultado esperado, sin amplificación de un producto PCR transgénico pero con amplificación del producto PCR endógeno, ello indica que no hay amplificación alguna detectable del sustrato transgénico en una muestra de DNA genómico.

30 5.5. Condiciones PCR

Los resultados óptimos se obtuvieron en las condiciones siguientes:

- 35 - la mezcla PCR para reacciones de 25 µl contiene:
 - x µl DNA molde (150 ng)
 - 2,5 µl 10x Tampón de Amplificación (suministrado por el fabricante con la polimerasa Taq)
 - 0,5 µl 10 mM dNTP's
 - 40 1,5 µl GHI053 (10pmoles/µl)

ES 2 432 406 T3

1,0 µl GHI054 (10pmoles/µl)
0,5 µl GHI041 (10pmoles/µl)
0,1 µl DNA polimerasa Taq (5 unidades/µl)
agua hasta 25 µl

5 - el perfil de termociclación a seguir para 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

10 Durante 5 ciclos

Seguido por: 30 s. a 92°C

30 s. a 57°C

1 min. a 72°C

Durante 25 ciclos

15 Seguido por: 10 minutos a 72°C

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

5.7. Validación de los resultados

20 Los datos de las muestras de DNA de plantas transgénicas dentro de una sola operación PCR y una sola Master Mix PCR no serán aceptables a no ser que:

- el control positivo muestre los productos PCR esperados (amplificación de la diana transgénica)
- el control de DNA positivo de tipo salvaje muestre el resultado esperado (amplificación de la diana de tipo salvaje)

25 - el control negativo sea negativo para la amplificación PCR (ausencia de fragmentos).

Las pistas que muestran cantidades visibles del producto PCR transgénico del tamaño esperado y no muestran cantidades visibles del producto PCR de tipo salvaje, indican que la planta correspondiente a partir de la cual se preparó el molde de DNA genómico es homocigótica para la casete del gen transgénico.

30 Las pistas que muestran cantidades visibles de los productos PCR transgénico y de tipo salvaje de los tamaños esperados, indican que la planta correspondiente a partir de la cual se preparó el DNA genómico molde, es hemicigótica para la casete del gen transgénico. Las pistas que no muestran cantidades visibles del producto PCR transgénico y muestran cantidades visibles del producto PCR de tipo salvaje, indican que la planta correspondiente a partir de la cual se preparó el DNA genómico molde no ha heredado la secuencia transgénica ensayada y es por tanto homocigótica para el locus de tipo salvaje.

35 Las pistas que no muestran cantidades visibles de los productos PCR transgénicos y de tipo salvaje indican que la calidad y/o cantidad del DNA genómico no permitía generar un producto PCR. Estas plantas no pueden clasificarse. La preparación de DNA genómico debería repetirse y tiene que realizarse una nueva operación PCR, con los controles apropiados.

40 5.8. Uso del protocolo de clasificación de cigosidad para identificación del estatus de cigosidad en plantas que contienen EE-GH5.

La Figura 3 ilustra el resultado obtenido con la clasificación de cigosidad PCR para EE-GH5 sobre cierto número de muestras de plantas de algodón. Se encontró que las muestras en las pistas 2-3 y 6-7 contienen el fragmento PCR (369 pb) característico para el evento de élite EE-GH5, mientras que las muestras en las pistas 2, 3 y 5 contenían el fragmento característico para la presencia del locus de tipo salvaje. Las pistas 6 y 7 contienen por tanto EE-GH5 en forma homocigótica, las pistas 2 y 3 contienen EE-GH5 en forma hemicigótica y la pista 5 contiene el locus de tipo salvaje en forma homocigótica (acigótica para EE-GH5). La pista 8 representa la muestra de control negativo (agua), y las pistas 1 y 9 representan el Marcador de Peso Molecular (escalera de 100 pares de bases).

6. Introgresión de EE-GH5 en cultivares preferidos

El evento de élite EE-GH5 se introduce por retrocruzamiento repetido en cultivares de algodón comerciales tales como, pero sin carácter limitante, FM5013, FM5015, FM5017, FM989, FM832, FM966 and FM958, FM989, FM958, FM832, FM991, FM819, FM800, FM960, FM966, FM981, FM5035, FM5044, FM5045, FM5013, FM5015, FM5017 o FM5024.

Se observa que la introgresión del evento de élite en estas cultivares no influye significativamente en ninguna de las características fenotípicas o agronómicas deseables de estas cultivares (arrastre de acoplamiento nulo) mientras que la expresión del transgén, como se determina por tolerancia a glufosinato, cumple los niveles comercialmente aceptables. Esto confirma el estatus del evento EE-GH5 como un evento de élite.

El evento de élite puede combinarse ventajosamente con otros eventos élite disponibles en el mercado, particularmente otro gen de evento de élite de resistencia a los insectos para el propósito de gestión de la resistencia a los insectos tal como, pero sin carácter limitante, el evento 3006-210-23; demanda a USDA APHIS 03-036-02p) evento 281-24-236 (demanda a USDA APHIS 03-036-01p); evento MON158985 (demanda a USDA APHIS 00-342-01p); evento MON531 (demanda a USDA APHIS 94-308-01p) o evento COT102 (=Syngenta vip3A) demanda a USDA APHIS 03-155-01p. El evento de élite EE-GH5 puede combinarse también con eventos élite tolerantes a herbicidas tales como el evento MON1445 (demanda a USDA APHIS 95-045-01p) o el evento MON88913 (demanda a USDA APHIS 04-086-01p).

Como se utiliza en las reivindicaciones que siguen, a no ser que se indique claramente otra cosa, debe entenderse que el término "planta" tiene por objeto abarcar tejidos de planta, en cualquier etapa de madurez, así como cualesquiera células, tejidos, u órganos tomados de o derivados de cualquiera de tales plantas, incluyendo sin limitación cualesquiera semillas, hojas, tallos, flores, raíces, células individuales, gametos, cultivos de células, cultivos de tejido o protoplastos.

Semilla de referencia que comprendía el evento de élite EE-GH5 se depositó como EE-GH5 en la ATCC (10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209) en fecha 22 de enero 2007, bajo el número de acceso ATCC PTA-8171. Un nombre alternativo para EE-GH5 es T304-40.

Como se utiliza en las reivindicaciones que siguen, a no ser que se indique claramente otra cosa, el término "planta" tiene por objeto abarcar tejidos de planta, en cualquier etapa de madurez, así como cualesquiera células, tejidos, u órganos tomados de o derivados de cualquiera de tales plantas, incluyendo sin limitación cualesquiera semillas, hojas, tallos, flores, raíces, células individuales, gametos, cultivos de células, cultivos de tejido o protoplastos.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Bayer BioScience N.V.
 Trolinder, Linda
 Moens, Sofie
 Paelinck, Dimitri
 Habex, Veerle
 Van Herck, Hans .

<120> Plantas de algodón resistentes a los insectos y métodos para identificación de las mismas.

<130> BCS06-2011

<150> EP07075263.9
 <151> 2007-04-05

<150> EP07075299.3
 <151> 2007-04-23

<150> US60/923142
 <151> 2007-04-12

<160> 19

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
 <211> 334
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia flanqueante 5' de EE-GH5

<220>
 <221> Característica mixta
 <222> (1)..(98)
 <223> DNA de planta

<220>
 <221> Característica mixta
 <222> (99)..(334)
 <223> DNA de inserción

<400> 1
 cttttatcat ataagtgcct atataaataa agtttagtca gtcaaattag agagattgtc 60
 attgtaggga gtttgtccaa ttattggtgt ttttaatccc agtactcggc cgtcgaccgc 120
 ggtaccccgg aattgaaaac agatttgagg tttcaaagtg gtgttggtggc tacagttcaa 180
 gaggcattaa aagctgattt ggccggatct tttgaagctt tcaaacacaa ggaaatcatc 240
 catcaacctc caatcgaatg gctttttgct tggcacaata attcccctac tttcgacttg 300
 aggacaagtc gattttccgg gccggatgta ttga 334

<210> 2
 <211> 452
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia flanqueante 3' de EE-GH5

<220>
<221> Característica mixta
<222> (1)..(40)
<223> DNA de inserción

<220>
<221> Característica mixta
<222> (41)..(452)
<223> DNA de planta

<400> 2
 atagcgcgca aactaggata aattatcgcg cgcggtgtca tctatctcct tttcttttc 60
 aagttatccc aagatctagg ggtattttgc atcattaaga gaaaactttg ttaattaga 120
 cttccaatca ccagtcttag gtataagggg aggctgatgc cgataacatt gccgaacaaa 180
 ccatcaaggc aactagagat gccttgatgc aaaagagctc ttttttagac cctcaaatgc 240
 caagcagtgg atagaaagaa gctcaatggt aagtgc aaac aaaattcgaa aggctaaaag 300
 tttatcgaga ttcgaatctc taaatcaatg tcattaacaa ctatataaca ggctaatttt 360
 atccggccca ataaataaaa caaaataaaa ataataaatc aagggtcaatt tacaaaatag 420
 attggcccaa acaaaaaaga gcccaataac cc 452

<210> 3
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
<223> Cebador oligonucleotídico GHI057

<400> 3
 atagcgcgca aactagga 18

<210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
<223> Cebador oligonucleotídico MAE115

<400> 4
 tcggcaatgt tatcggcatc 20

<210> 5
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
<223> Cebador oligonucleotídico HVH022

<400> 5
 ccactgcttg gcatttgag 19

<210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador oligonucleotídico GHI065

<400> 6
 gggccggata aaattagcct 20

<210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador oligonucleotídico HVH024

<400> 7
 gtcattgtag ggagtttgtc 20

<210> 8
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador oligonucleotídico DPA312

<400> 8
 tgcctcttga actgtagc 18

<210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador oligonucleotídico GHI066

<400> 9
 agataaaatc gtcagtgtg 20

<210> 10
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador oligonucleotídico GHI47

<400> 10
 tgcctcttga actgtagc 18

<210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador oligonucleotídico GH1048

<400> 11
 acttgcagtt gctgatgatg 20

<210> 12
 <211> 262
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia de nucleótidos del fragmento amplificado de DNA de algodón que comprende EE-GH5 utilizando GH1047 y GH1048

<220>
 <221> Característica mixta
 <222> (1)..(51)
 <223> secuencia derivada de 3' me1

<220>
 <221> Característica mixta
 <222> (86)..(88)
 <223> secuencia derivada del borde derecho de T-DNA

<220>
 <221> Característica mixta
 <222> (89)..(262)
 <223> secuencia derivada de 3' me1

<400> 12
 tgccttctga actgtagcca caacaccact ttgaaacctc aaatctgttt tcaattccgg 60
 ggtaccgcg tgcacggccg agtactggcc aaatttagtt tttggataaa gtaccagatt 120
 tagggcaata aaactataaa cggccagctt ttagctacat acaatgagca ttcttgataa 180
 acaaagaacc caaccggtat ttgtaagtga ataaacaaaa gtagtattaa gctttaagtt 240
 tccatcatca gcaactgcaa gt 262

<210> 13
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador oligonucleotídico GH1001

<400> 13
 aacctaggct gctgaaggag c 21

<210> 14
 <211> 21
 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico GHI002

<400> 14

caactcctcc agtcatctcc g

21

<210> 15

<211> 558

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos de la secuencia genómica diana de la planta antes de la inserción de EE-GH5

<220>

<221> Característica mixta

<222> (1)..(113)

<223> secuencia correspondiente a la secuencia flanqueante 5'

<220>

<221> Característica mixta

<222> (114)..(145)

<223> delección pre-inserción en el evento de élite EE-GH5

<220>

<221> Característica mixta

<222> (146)..(558)

<223> secuencia correspondiente a la secuencia flanqueante 3'

<220>

<221> Característica mixta

<222> (457)..(475)

<223> secuencia correspondiente al complemento del oligonucleótido GHI065

<400> 15

agtttatatt tcttactttt atcatataag tgcctatata aataaagttt agtcagtcaa 60

attagagaga ttgtcattgt agggagtttg tccaattatt ggtgttttta atcacaagtt 120

gtttaaggat tccaaacat acattatcta tctccttttt cttttcaagt tatccaaga 180

tctaggggta ttttgcata ttaagagaaa actttgttta attagacttc caatcaccag 240

tcttaggtat aaggggaaggc tgatgccgat aacattgccg aacaaacat caaggcaact 300

agagatgcct tgatgcaaaa gagctctttt ttagaccctc aaatgccaaag cagtggatag 360

aaagaagctc aatgttaagt gcaaacaaaa ttcgaaaggc taaaagttta tcgagattcg 420

aatctctaaa tcaatgtcat taacaactat ataacaggct aattttatcc ggccaataa 480

ataaaacaaa ataaaaataa taaatcaagg tcaatttaca aatagattg gcccaacaa 540

aaaagagccc aataaccc 558

<210> 16

<211> 799

<212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia flanqueante 5' de EE-GH5 (larga)

<220>
 <221> Característica mixta
 <222> (1)..(563)
 <223> DNA de planta

<220>
 <221> Característica mixta
 <222> (564)..(799)
 <223> DNA de inserción

<400> 16
 aacaaataag ccaattccaa agagaggata gctgatcttt tcactaatca taacttgaat 60
 ttttttagtg gtgcttatct gtttcaggtg ttaggagcac aatcatacca ttccctgcat 120
 aattttcaga ctctaggatg aatccttttc gaagaggagg tgaatgatac gaactcagaa 180
 agggtaaatt catttgagtt caagtttggg acactgacca acttgcaatg aatttttggg 240
 ttaaattatt ttctttatgg atcatgaaat gatataattat ttaaaatttt aagatgttta 300
 tttattcatt taattatagt ttgattatat acatttgtaa aattgaatat ttatttggtt 360
 ttaaagtta ttaatttctt gtttattcat taaataaagt tcaattatag ataaaatcgt 420
 cagtgctgaa ttttatatta ttttattaga agtttatatt tcttactttt atcatataag 480
 tgcctatata aataaagttt agtcagtcaa attagagaga ttgtcattgt agggagtgtg 540
 tccaattatt ggtgttttta atcccagtac tcggccgctg accgcggtac cccggaattg 600
 aaaacagatt tgaggtttca aagtgggtgt gtggctacag ttcaagaggc attaaaagct 660
 gatttgccg gatcttttga agctttcaa cacaaggaaa tcatccatca acctccaatc 720
 gaatggcttt ttgcttggca caataattcc cctactttcg acttgaggac aagtcgattt 780
 tccgggccgg atgtattga 799

<210> 17
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador oligonucleotídico HVH036

<400> 17
 caggtgtag ggcacaatc 20

<210> 18
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
<223> Cebador oligonucleotídico SHA028

<400> 18
cacaacacca ctttgaacc tcaa 24

<210> 19
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador oligonucleotídico MAE067

<400> 19
ccattcgatt ggaggttga 19

REIVINDICACIONES

1. Una planta transgénicas de algodón resistente a los insectos, o células, partes, semilla o progenie de la misma, cada una de las cuales comprende un evento de élite, comprendiendo dicho evento de élite un DNA extraño que comprende la secuencia codificante de un gen cry1ab modificado bajo el control de un promotor S7 del virus de la atrofia subterránea del trébol, en donde dicho evento de élite puede obtenerse a partir de la semilla de referencia que comprende dicho evento que ha sido depositada en la ATCC bajo el número de depósito PTA-8171, el DNA genómico de dicha planta de algodón, o células, partes, semilla, o progenie de la misma cuando se analiza utilizando el protocolo de identificación de eventos élite para dicho evento de élite con dos cebadores que comprenden la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 10 y SEQ ID No. 11 respectivamente, produce un fragmento de DNA de 262 pb o cuando se analiza utilizando el protocolo de identificación de eventos élite para dicho evento de élite con dos cebadores que comprenden la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 3 y SEQ ID No. 6 respectivamente, produce un fragmento de DNA de 369 pb.
2. Un método para identificación de una planta transgénicas de algodón resistente a los insectos, o células, partes, semilla o progenie de la misma especificada en la reivindicación 1 en muestras biológicas, comprendiendo dicho método amplificar un fragmento de DNA de entre 100 y 500 pb de un ácido nucleico presente en dichas muestras biológicas utilizando una reacción en cadena de polimerasa con al menos dos cebadores, reconociendo uno de dichos cebadores la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 1 desde el nucleótido 1 al nucleótido 98 o la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 16 desde el nucleótido 1 al nucleótido 563 o la secuencia de nucleótidos del complemento de SEQ ID No. 2 desde el nucleótido 41 al nucleótido 452, reconociendo el otro cebador de dichos cebadores la secuencia de nucleótidos del complemento de SEQ ID No. 1 desde el nucleótido 99 al nucleótido 334 o la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 2 desde el nucleótido 1 al nucleótido 40.
3. El método de la reivindicación 2, en donde un cebador está constituido por una secuencia de nucleótidos de 17 a 200 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 1 desde el nucleótido 1 al nucleótido 98 o la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 16 desde el nucleótido 1 al nucleótido 563 o dicho cebador está constituido por una secuencia de nucleótidos de 17 a 200 nucleótidos consecutivos, seleccionada de la secuencia de nucleótidos del complemento de SEQ ID No. 2 desde el nucleótido 41 al nucleótido 452, y el otro cebador está constituido por 17 a 200 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de nucleótidos del complemento de SEQ ID No. 1 desde el nucleótido 99 al nucleótido 334 o la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 2 desde el nucleótido 1 al nucleótido 40.
4. El método de la reivindicación 2, en donde un cebador comprende en su extremo 3' último una secuencia de nucleótidos de al menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 1 desde el nucleótido 1 al nucleótido 98 o la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 16 desde el nucleótido 1 al nucleótido 563 o dicho cebador comprende en su extremo 3' último una secuencia de nucleótidos de al menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de nucleótidos del complemento de SEQ ID No. 2 desde el nucleótido 41 al nucleótido 452, y el otro cebador comprende en su extremo 3' último al menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de nucleótidos del complemento de SEQ ID No. 1 desde el nucleótido 99 al nucleótido 334 o la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 2 desde el nucleótido 1 al nucleótido 40.
5. El método de la reivindicación 4, en donde dichos cebadores comprenden la secuencia de SEQ ID No. 3 y SEQ ID No. 6, respectivamente.
6. El método de la reivindicación 5, método que comprende amplificar un fragmento de 369 pares de bases utilizando el protocolo de identificación de eventos élite.
7. Un kit para identificación de una planta transgénicas de algodón resistente a los insectos, o células, partes, semilla o progenie de la misma especificadas en la reivindicación 1 en muestras biológicas, comprendiendo dicho kit un cebador que reconoce la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 1 desde el nucleótido 1 al nucleótido 98 o la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 16 desde el nucleótido 1 al nucleótido 563 o un cebador reconoce la secuencia de nucleótidos del complemento de SEQ ID No. 2 desde el nucleótido 41 al nucleótido 452, y un cebador que reconoce la secuencia de nucleótidos del complemento de SEQ ID No. 1 desde el nucleótido 99 al nucleótido 334 o la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 2 desde el nucleótido 1 al nucleótido 40.
8. El kit de la reivindicación 7, en donde un cebador está constituido por una secuencia de nucleótidos de 17 a 200 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 1 desde el nucleótido 1 al nucleótido 98 o la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 16 desde el nucleótido 1 al nucleótido 563, o dicho cebador está constituido por una secuencia de nucleótidos de 17 a 200 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de nucleótidos del complemento de SEQ ID No. 2 desde el nucleótido 41 al nucleótido 452, y un cebador está constituido por 17 a 200 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de nucleótidos del complemento de SEQ ID No. 1 desde el nucleótido 99 al nucleótido 334 o la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 2 desde el nucleótido 1 al nucleótido 40.

9. El kit de la reivindicación 7, en donde un cebador comprende en su extremo 3' último una secuencia de nucleótidos de al menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 1 desde el nucleótido 1 al nucleótido 98 o la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 16 desde el nucleótido 1 al nucleótido 563, o un cebador comprende en su extremo 3' último una secuencia de nucleótidos de al menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de nucleótidos del complemento de SEQ ID No. 2 desde el nucleótido 41 al nucleótido 452, y uno comprende en su extremo 3' último al menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de nucleótidos del complemento de SEQ ID No. 1 desde el nucleótido 99 al nucleótido 334 o la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 2 desde el nucleótido 1 al nucleótido 40.
- 5
10. El kit de la reivindicación 7, que comprende un cebador constituido por la secuencia de SEQ ID No. 3 y un cebador constituido por la secuencia de SEQ ID No. 6.
- 10
11. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 1 desde el nucleótido 78 al nucleótido 119 o SEQ ID No. 2 desde el nucleótido 20 al 60, o el complemento de dichas secuencias.

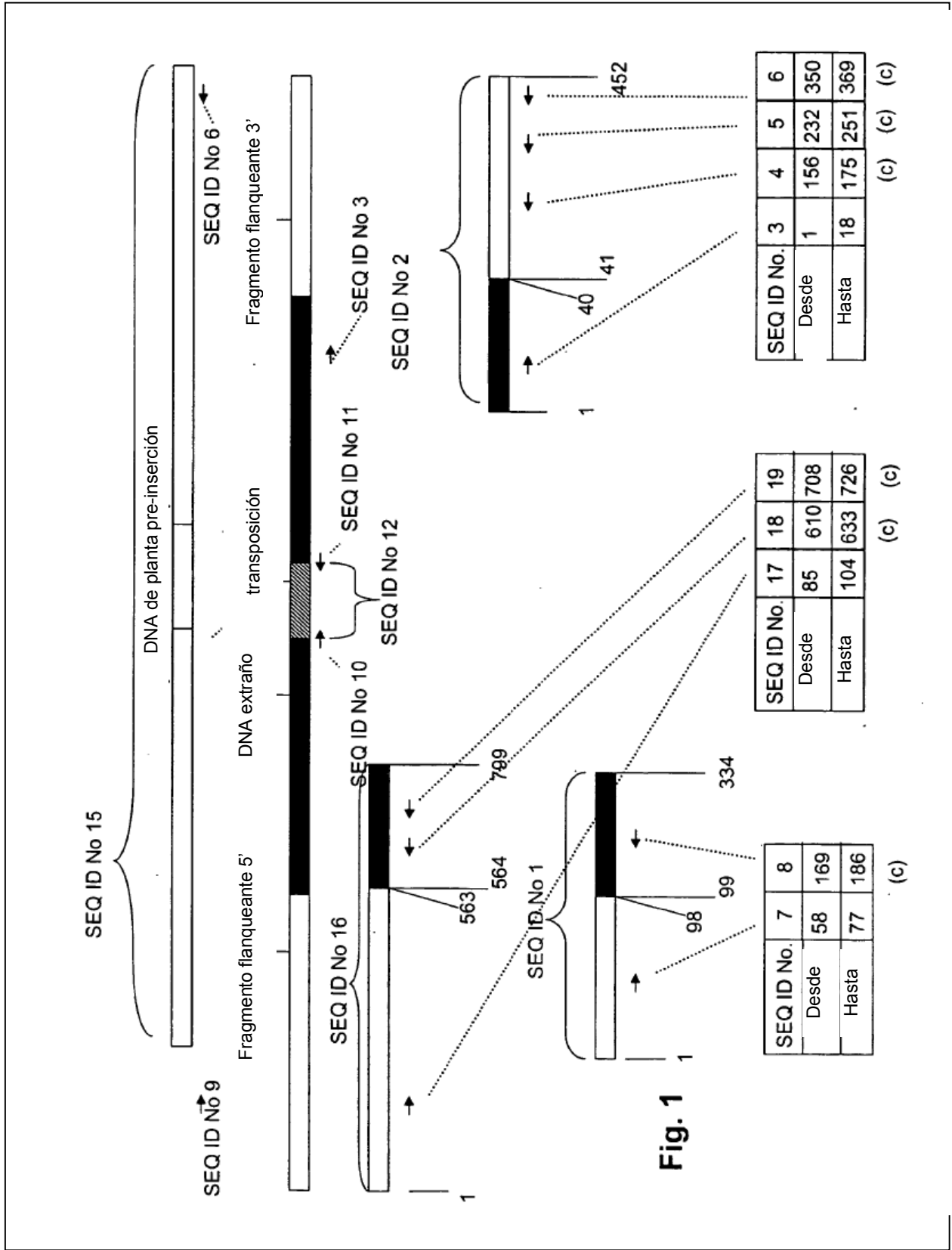


Fig. 2



Fig. 3

