

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 517 526**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/82** (2006.01)

**A01H 5/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.11.1999 E 99971448 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.08.2014 EP 1127106**

54 Título: **Arroz tolerante al glufosinato**

30 Prioridad:

**03.11.1998 US 185244**

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

**03.11.2014**

73 Titular/es:

**BAYER CROPSCIENCE NV (100.0%)  
J.E. Mommaertsiaan 14  
1831 Diegem, BE**

72 Inventor/es:

**MICHIELS, FRANK y  
JOHNSON, KIRK**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 517 526 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

Arroz tolerante al glufosinato.

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a plantas de arroz, material de plantas y semillas caracterizadas por albergar un evento de transformación específico particularmente por la presencia del gen *bar* bajo control de un promotor 35S de CaMV, en una localización específica en el genoma del arroz. Las plantas de arroz de la invención combinan la tolerancia al glufosinato con eficiencia agronómica global óptima, estabilidad genética y adaptabilidad a diferentes entornos genéticos.

Antecedentes de la invención

10 La expresión fenotípica de un transgén en una planta está determinada a vez por la estructura del gen propiamente dicho y por su localización en el genoma de la planta. Al mismo tiempo, la presencia del transgén en diferentes localizaciones en el genoma influirá en el fenotipo global de la planta. La introducción con éxito agronómica o industrialmente de un rasgo comercialmente interesante en una planta por manipulación genética puede ser un procedimiento laborioso dependiendo de diferentes factores. La transformación y regeneración reales de plantas transformadas genéticamente son sólo el primero en una serie de pasos de selección que incluyen caracterización genética extensa, reproducción, y evaluación en pruebas de campo.

20 La producción de arroz está amenazada comúnmente por diversas malezas. Algunas de éstas pueden ser muy competitivas y en casos de infestación severa pueden dar como resultado pérdidas de rendimiento de tal magnitud que hagan la cosecha poco atractiva económicamente. Para el cultivo de arroz sembrado directamente y mecanizado típico de la producción en climas templados, son necesarios tanto prácticas de cultivo (v.g. rotación de cosechas, gestión de los riegos) como herbicidas a fin de controlar las malezas (Hill et al. 1994).

25 El gen *bar* (Thompson et al, 1987, EMBO J. 6:2519-2523; Deblock et al. 1987, EMBO J. 6:2513-2518) es un gen que codifica la enzima fosfinotricin-acetiltransferasa (PAT), que, cuando se expresa en una planta, confiere resistencia a los compuestos herbicidas fosfinotricina (llamada también glufosinato) o bialafós (véanse también por ejemplo las Patentes US 5.646.024 y 5.561.236) y sales e isómeros ópticos de los mismos. Otros genes que codifican PAT han sido descritos (véanse por ejemplo: Wohlleben et al., 1988, Gene 70:25-37; EP 275.957; US 5.276.268; US 5.637.489; US 5.273.894).

30 La transformación de plantas monocotiledóneas por electroporación de tejido intacto capaz de formar callo embriogénico compacto o el callo embriogénico obtenido a partir de dicho tejido se describe en la Patente US 5.641.664. En este documento, se describe la transformación de callo embriogénico compacto de arroz por electroporación de un gen *bar* y la regeneración de plantas transgénicas de arroz.

Se han descrito plantas transgénicas de arroz que contienen el gen *gus* con el gen *bar* o el gen *hyg* que confiere resistencia a higromicina, obtenidas por la transformación de células de embriones inmaduros de arroz por bombardeo con partículas de oro recubiertas con DNA (Christou et al., 1991: Biotechnology 9:957).

35 La transformación de arroz con el gen *bar* por electroporación de células en suspensión agregadas se describe en la Patente US 5.679.558.

Sin embargo, los documentos que anteceden fallan en lo que respecta a proponer o sugerir la presente invención.

Sumario de la invención

40 La presente invención se refiere a una planta, célula, tejido o semilla de arroz transgénica, tolerante al glufosinato, que comprende en su genoma un transgén 35S-*bar* P<sub>vul</sub>-HindIII de 1501 pares de bases que comprende los elementos genéticos que se muestran en la tabla del Ejemplo 1a) y en donde dicho transgén 35S-*bar* está localizado entre una región flanqueante 92 nucleótidos aguas arriba y una región flanqueante 675 nucleótidos aguas abajo, estando localizada dicha región flanqueante de aguas arriba inmediatamente aguas arriba de y contigua a dicho transgén y comprendiendo la secuencia de nucleótidos designada YTP059:

45 5'-TCGGACAACCGCGATAGTTCG-3'

en posición 56-76 de la región flanqueante de aguas arriba

y estando localizada dicha región flanqueante de aguas abajo inmediatamente aguas abajo de y contigua a dicho transgén, y comprendiendo la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia designada OSA04:

5'-TCGCATATGTATGTAACACGC-3'

50 en posición 93-113 de la región flanqueante de aguas abajo,

estando los elementos genéticos del transgén mostrados en la tabla del Ejemplo 1a) presentes en el arroz Elite Event GAT-OS2 depositado en la ATCC con el número de acceso ATCC 203352.

La invención se refiere también a un proceso para cultivar plantas de arroz que comprende dejar crecer las plantas de la invención y aplicar un herbicida con glufosinato como ingrediente activo a las plantas de arroz cultivadas.

5 Breve descripción de los dibujos

La descripción detallada que sigue puede comprenderse en conjunción con las Figuras que se acompañan, en las cuales:

**Fig. 1. Mapa de restricción obtenido después de digestión de DNA genómico de GAT-OS2**

10 Secuencia de carga del gel analizado de transferencia Southern: pista 1, DNA lambda digerido con PstI, pista 2, DNA de GAT-OS2 digerido con EcoRI, pista 3, DNA de GAT-OS2 digerido con BamHI, pista 4, DNA de GAT-OS2 digerido con EcoRV, pista 5, DNA de GAT-OS2 digerido con HindIII, pista 6, DNA de GAT-OS2 digerido con NcoI, pista 7, DNA de GAT-OS2 digerido con NsiI, pista 8, DNA de arroz no transgénico, pista 9 DNA del plásmido de control digerido con EcoRI.

15 **Fig. 2. Análisis PCR de diferentes líneas utilizando el protocolo de identificación PCR de GAT-OS2.** Secuencia de carga del gel: pista 1, marcador de peso molecular (escalera de 100 pb), pistas 2 a 11, muestras de DNA de plantas de arroz que comprenden eventos transgénicos diferentes, pista 12, DNA del tipo salvaje M202, pista 13, DNA del tipo salvaje Bengala, pista 14, control negativo (agua), pista 15, marcador de peso molecular (escalera de 100 pb).

Descripción detallada

20 El término "gen" como se utiliza en esta memoria se refiere a cualquier secuencia de DNA que comprende varias fragmentos de DNA enlazados operativamente tales como un promotor y una región 5' no traducida (la 5' UTR), que forman juntos la región promotora, una región codificante (que puede codificar o no una proteína), y una región 3' no traducida (3' UTR) que comprende un sitio de poliadenilación. Típicamente, en las células vegetales, la 5' UTR, la región codificante y la 3' UTR se transcriben en un RNA que, en el caso de un gen codificante de proteína, se traduce en la proteína. Un gen puede incluir fragmentos adicionales de DNA tales como, por ejemplo, intrones. Como se utiliza en esta memoria, un locus genético es la posición de un gen dado en el genoma de una planta.

30 El término "quimérico", cuando se refiere a un gen o secuencia de DNA, se utiliza para hacer referencia al hecho de que el gen o secuencia de DNA comprende al menos dos fragmentos de DNA funcionalmente relevantes (tales como promotor, 5' UTR, región codificante, 3' UTR, intrón) que no están asociados naturalmente unos con otros y proceden, por ejemplo, de fuentes diferentes. "Extraño", refiriéndose a un gen o una secuencia de DNA con respecto a una especie de planta, se utiliza para indicar que el gen o la secuencia de DNA no se encuentran naturalmente en dicha especie de planta. Como se utiliza en esta memoria, el término "transgén" se refiere a una molécula de DNA recombinante incorporada en el genoma de una planta. El término "molécula de DNA recombinante" se utiliza para servir como ejemplo y por tanto puede incluir una molécula de ácido nucleico aislada que puede ser DNA y que puede obtenerse por recombinación u otros procedimientos. Esta molécula de DNA recombinante comprende usualmente al menos una copia de al menos un "gen de interés" (v.g. un gen quimérico) que es capaz de conferir una o más características específicas a la planta transformada. Una "planta transgénica" se refiere a una planta que comprende un transgén en el genoma de la totalidad de sus células.

40 La incorporación de una molécula de DNA recombinante en el genoma de la planta es típicamente resultado de la transformación de una célula o tejido (o de otra manipulación genética). El sitio de incorporación particular es debido o bien al azar o se encuentra en una localización predeterminada (si se utiliza un proceso de integración direccionada).

45 El transgén puede caracterizarse por la localización y la configuración en el sitio de incorporación de la molécula de DNA recombinante en el genoma de la planta. El sitio en el genoma de la planta en el que se ha insertado un transgén se conoce también como el "sitio de inserción" o "sitio diana". La inserción del transgén en el genoma de la planta puede estar asociada con una delección del DNA de la planta, a lo 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 pb, preferiblemente al menos 50 pb, y hasta 5000 pb del genoma de la planta que está localizada inmediatamente aguas arriba de y contigua a, o inmediatamente aguas abajo de y contigua al transgén. Los procedimientos de transformación que conducen a la integración aleatoria del transgén darán como resultado transformantes con genes flanqueantes diferentes, que son características y únicas para cada transformante. Cuando se introduce el transgén en una planta por cruzamiento tradicional, su sitio de inserción en el genoma de la planta o sus regiones flanqueantes no cambiarán generalmente. Una "región de inserción", como se utiliza en esta memoria, se refiere a la región correspondiente a la región abarcada por el sitio de inserción (y posible delección del sitio diana), las regiones flanqueantes aguas arriba y aguas debajo de un transgén en el genoma de la planta (no transformada).

5 La expresión de transgén se utiliza para indicar que el o los genes de interés comprendidos en el transgén se expresa(n) de tal modo que confieren a la planta uno o más rasgos fenotípicos (v.g. tolerancia a herbicidas) que se pretendía fueran conferidos por la introducción de la molécula de DNA recombinante - el DNA transformante - utilizada durante la transformación (sobre la base de la estructura y función de parte o la totalidad del o los genes de interés).

10 Un evento se define como un locus genético (artificial) que, como resultado de manipulación genética, lleva un transgén que comprende al menos una copia de un gen de interés. Los estados alélicos típicos de un evento son la presencia o ausencia del transgén. Un evento se caracteriza fenotípicamente por la expresión del transgén. Al nivel genético, un evento es parte de la composición genética de una planta. Al nivel molecular, un evento se caracteriza por el mapa de restricción (v.g. como se determina de transferencia Southern) y/o por las secuencias flanqueantes aguas arriba y/o aguas abajo del transgén, 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 multitud de eventos, cada uno de los cuales es exclusivo.

15 Un evento de élite, como se utiliza en esta memoria, es un evento que se selecciona de un grupo de eventos obtenidos por transformación con el mismo DNA transformante, basado en la expresión y estabilidad del transgén y su compatibilidad con características agronómicas óptimas de la planta que lo contiene. Así pues, los criterios para selección de eventos elite son uno o más, preferiblemente dos o más, ventajosamente la totalidad de los siguientes:

a) que la presencia del transgén no compromete otras características deseadas de la planta, tales como las relativas a eficiencia agronómica o valor comercial;

20 b) que el evento se caracteriza por una configuración molecular bien definida que se hereda de manera estable y para la cual pueden desarrollarse herramientas de diagnóstico apropiadas para control de identidad;

25 c) que el o los genes de interés en el transgén muestra(n) una expresión fenotípica espacial y temporal correcta, apropiada y estable, tanto en condición heterocigótica (o hemocigótica) como homocigótica del evento, a un nivel comercialmente aceptable en una gama de condiciones ambientales a las cuales es probable que se vean expuestas las plantas portadoras del evento durante el uso agronómico normal;

Se prefiere que el transgén esté asociado con una posición en el genoma de la planta que permita la introgresión en entornos genéticos comerciales deseados.

El estatus de un evento como evento de élite se confirma por introgresión del evento de élite en diferentes entornos genéticos relevantes y observación del cumplimiento de 1, 2 o la totalidad de los criterios, v.g. a), b) y c) anteriores.

30 Un "evento de élite" se refiere así a un locus genético que comprende un transgén, que responde a los criterios arriba descritos. Una planta, material de planta o progenie tal como semillas puede comprender el evento de élite en su genoma.

35 Las "herramientas de diagnóstico" desarrolladas para identificar un evento de élite o la planta o el material de planta que comprende un evento de élite, están basadas en las características genómicas específicas del evento de élite, tales como un mapa de restricción específico de la región genómica que comprende el transgén y/o la secuencia de la o las regiones flanqueantes del transgén. Un "mapa de restricción", como se utiliza en esta memoria, se refiere a una serie de patrones de transferencia Southern obtenidos después de escisión del DNA genómico de la planta con una enzima de restricción particular, o una serie de enzimas de restricción e hibridación con una sonda que comparte semejanza de secuencia con el transgén (en condiciones específicas). Debido a los sitios de restricción (endógenos) presentes en un genoma de planta antes de incorporación del transgén, la inserción de un transgén alterará el mapa de restricción específico de dicho genoma. Así pues, un transformante particular o progenie derivada del mismo puede identificarse por uno o más patrones de restricción específicos. Las condiciones para determinar el mapa de restricción de un evento se exponen en un protocolo de identificación de mapas de restricción.

45 Alternativamente, las plantas o el material de planta que comprende(n) un evento de élite pueden identificarse por ensayos de acuerdo con un protocolo de identificación PCR. Ésta es una PCR que utiliza cebadores que reconocen específicamente el evento de élite. Esencialmente, se desarrolla una serie de cebadores que reconoce a) una secuencia dentro de la secuencia flanqueante 3' o 5' del evento de élite y b) una secuencia dentro del DNA extraño, cuyos cebadores amplifican un fragmento (fragmento de integración) que contiene preferiblemente entre 100 y 350 nucleótidos. Preferiblemente, se incluye un control de una serie de cebadores que amplifica un fragmento dentro de un gen constitutivo de la especie de planta (preferiblemente un fragmento que es mayor que el fragmento de integración amplificado). Las condiciones óptimas para la PCR, con inclusión de la secuencia de los cebadores específicos, se especifica(n) en un protocolo de identificación PCR.

55 El término "semejanza", por ejemplo, con respecto a una secuencia de nucleótidos, tiene por objeto indicar una medida cuantitativa de homología entre dos secuencias. El porcentaje de semejanza de secuencia puede calcularse como  $(N_{ref} - N_{dif}) * 100 / N_{ref}$ , en donde  $N_{dif}$  es el número total de residuos no idénticos en las dos secuencias cuando están alineadas y en donde  $N_{ref}$  es el número de residuos en una de las secuencias. Así, la secuencia de DNA

AGTCAGTC tendrá la semejanza de secuencia de 75% con la secuencia AATCAATC ( $N_{ref} = 8$ ;  $N_{dif} = 2$ ). La invención comprende moléculas de ácido nucleico y con secuencias que tienen al menos 65%, v.g., al menos 70%, tal como al menos 75%, o al menos 80% o ventajosamente al menos 85%, por ejemplo al menos 90%, tal como al menos 95% o incluso 97% o 100% de semejanza con secuencias descritas en esta memoria, así como plantas, células, tejidos, semillas, y progenie de las mismas (v.g., plantas, células, tejidos, semillas de arroz y progenie de las mismas) que comprenden tales moléculas de ácido nucleico. Alternativa o adicionalmente, "semejanza" con respecto a secuencias se refiere al número de posiciones con nucleótidos idénticos dividido por el número de nucleótidos en la más corta de las dos secuencias en donde la alineación de las dos secuencias puede determinarse de acuerdo con el algoritmo de Wilbur y Lipmann (Wilbur y Lipmann, 1983 PNAS 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, y el análisis asistido por computadora e interpretación de los datos de secuencia que incluyen alineación puede realizarse convenientemente utilizando programas del paquete Intelligenetics™ (Intelligenetics Inc. CA). Las secuencias que son "esencialmente similares" tienen una semejanza o identidad de secuencia de al menos aproximadamente 75%, de modo ventajoso al menos aproximadamente 80%, tal como al menos aproximadamente 85%, con preferencia al menos aproximadamente 90%, de modo especial aproximadamente 95%, tal como al menos 97%, y de manera especial aproximadamente 100%. Está claro que cuando se dice que secuencias de RNA son esencialmente similares o similares, o tienen un 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.

La presente invención se refiere al desarrollo de un evento de élite en el arroz, GAT-OS2, y las plantas, células de plantas, o material de plantas derivado de este evento. Plantas que comprenden el evento de élite GAT-OS2 se obtuvieron por transformación con un fragmento PvuI-HindIII de 1501 pares de bases del plásmido pB5/35S bar que se describen en el Ejemplo 1.

La molécula de DNA recombinante utilizada para generación de este evento de élite comprende una secuencia de DNA que codifica la enzima fosfinotricin-acetiltransferasa y el promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor, en donde la secuencia codificante de fosfinotricin-acetiltransferasa se encuentra bajo el control del promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (denominado el "gen 35S-bar"). El promotor 35S tiene un patrón de expresión "constitutivo" en el arroz (Batraw et al., 1990, Plant Mol Biol 15: 527-538), lo que significa que el mismo se expresa significativamente en la mayoría de los tipos de células de la planta, durante la mayor parte del ciclo vital de la planta. La expresión del gen 35S-bar en las plantas de arroz confiere resistencia a los compuestos herbicidas fosfinotricina o bialafós o glufosinato o más generalmente, inhibidores de la glutamina-sintetasa, o sales o isómeros ópticos de los mismos.

Las plantas o material de plantas que comprenden GAT-OS2 pueden identificarse conforme al protocolo de identificación de mapas de restricción descrito en el Ejemplo 3b) (1) en esta memoria. Resumidamente, el DNA genómico del arroz se digiere con una selección (preferiblemente 3 a 6) de las enzimas de restricción siguientes: EcoRI, BamHI, EcoRV, HindIII, NcoI, NsiI, se transfiere luego a membranas de nailon y se hibrida con el fragmento EcoRI de 1327 pares de bases del plásmido pB5/35Sbar. Se determina luego para cada enzima de restricción utilizada si pueden identificarse los fragmentos siguientes:

- EcoRI: un fragmento que tiene entre aproximadamente 1159 y aproximadamente 1700 pb, con preferencia de aproximadamente 1327 pb
- BamHI: un fragmento que tiene entre aproximadamente 1700 y aproximadamente 2140 pb, con preferencia de aproximadamente 2,0 kpb y un fragmento que tiene entre aproximadamente 805 y aproximadamente 1093 pb, con preferencia aproximadamente 805 pb
- EcoRV: un fragmento que tiene más de aproximadamente 5077 pb, con preferencia de aproximadamente 12 kpb y un fragmento que tiene entre aproximadamente 2838 y aproximadamente 4507 pb, con preferencia de aproximadamente 3,8 kpb
- HindIII: un fragmento que tiene entre aproximadamente 5077 y aproximadamente 11497 pb, con preferencia de aproximadamente 5,3 kpb
- NcoI: dos fragmentos que tienen entre aproximadamente 2838 y aproximadamente 4507 pb, con preferencia uno de aproximadamente 4,1 kpb y uno de aproximadamente 3,1 kpb
- NsiI: un fragmento que tiene entre aproximadamente 4749 y aproximadamente 11497 kpb, con preferencia aproximadamente 5,1 kpb.

Las longitudes de los fragmentos del DNA se determinan por comparación con un juego de fragmentos de DNA de longitud conducida, particularmente los fragmentos PstI del fago de DNA lambda.

Si el material de plantas después de la digestión con al menos uno tal como al menos dos, ventajosamente al menos tres, preferiblemente al menos cuatro, particularmente al menos cinco, más preferiblemente con la totalidad de estas enzimas de restricción, produce fragmentos de DNA con la misma longitud que los arriba descritos, se determina que la planta de arroz alberga un evento de élite GAT-OS2.

Las plantas o material de plantas que comprenden GAT-OS2 pueden identificarse también conforme al protocolo de identificación PCR descrito en el Ejemplo 3b) (2) de esta memoria. Resumidamente, se amplifica DNA genómico de arroz por PCR utilizando un cebador que reconoce específicamente una secuencia flanqueante de GAT-OS2, particularmente el cebador con la secuencia de SEQ ID NO 2, y un cebador que reconoce la secuencia en el transgén, particularmente el cebador que tiene la secuencia de SEQ ID NO 1. Se utilizan como controles cebadores de arroz endógenos. Si el material de planta produce un fragmento que tiene entre aproximadamente 290 y aproximadamente 350 pb, con preferencia de aproximadamente 313 pb, se determina que la planta de arroz alberga el evento de élite GAT-OS2.

Las plantas que albergan GAT-OS2 se caracterizan también por su tolerancia al glufosinato, que en el contexto de la presente invención incluye aquellas plantas que son tolerantes al herbicida Liberty™. La tolerancia a Liberty™ se define por el criterio de que la pulverización de las plantas en la etapa de 3 a 4 hojas (3V a 4V) con al menos 200 gramos de ingrediente activo/hectárea (g.a.i./ha), preferiblemente 400 g.a.i./ha, y posiblemente hasta 1600 g.a.i./ha, no destruye las plantas. Las plantas que albergan GAT-OS2 pueden caracterizarse adicionalmente por la presencia en sus células de fosfinotricina-acetiltransferasa como se determina por un ensayo PAT (DeBlock et al, 1987, supra).

Las plantas que albergan GAT-OS2 pueden, por ejemplo, obtenerse de semillas depositadas en la ATCC bajo el número ATCC 203352. Tales plantas pueden propagarse y/o utilizarse ulteriormente en un esquema de reproducción convencional para producir más plantas transformadas con las mismas características o para introducir el evento de élite de la invención en otras variedades cultivadas de la misma especie de planta. Las semillas obtenidas de estas plantas contienen el evento de élite incorporado de manera estable en su genoma.

Las plantas de arroz de esta invención pueden cultivarse de manera convencional. La presencia del transgén asegura que las mismas son tolerantes al glufosinato. Por tanto, las malezas en los campos en los que se cultivan tales plantas de arroz pueden controlarse por aplicación de herbicidas que comprenden glufosinato como ingrediente activo (tales como Liberty™).

Las plantas que albergan GAT-OS2 se caracterizan también por tener características agronómicas que son comparables a las variedades de arroz disponibles comercialmente siguientes en los Estados Unidos: Priscilla, Cypress, Bengal, Cocadrie, Jefferson, Madison, M202, M201, M103, Drew, Kaybonnet, Lagrue. Las características agronómicas de relevancia son: altura de la planta, fuerza/rigidez de la paja, resistencia al encamado, morfología de la hoja (longitud, anchura, y ángulo para la hoja bandera), tiempo hasta la madurez, configuración del flósculo, fertilidad de la panícula, cierre completo de la cáscara sobre la semilla, tamaño y forma del grano, y producción y rendimiento de grano.

Se ha observado que la presencia del transgén en esta región del genoma de la planta de arroz, más típicamente en este sitio en el genoma de la planta de arroz, confiere características fenotípicas y moleculares particularmente interesantes a este evento. Más específicamente, la presencia de un transgén en este sitio particular en el genoma da como resultado la expresión fenotípica estable del transgén sin comprometer sensiblemente ningún aspecto de eficiencia agronómica deseada de la planta. Así, se demuestra que la región de inserción, más particularmente el sitio de inserción de GAT-OS2 en ella, es particularmente adecuada para la introducción de un gen o genes de interés, tal como un gen de resistencia a herbicidas, más específicamente un gen que codifica fosfinotricina-acetiltransferasa bajo el control de un promotor 35S, particularmente el fragmento PvuI-HindIII del plásmido pB5/35Sbar.

Una molécula de DNA recombinante puede insertarse específicamente en esta región de inserción por métodos de inserción direccionada. Tales métodos son bien conocidos por los expertos en la técnica y comprenden, por ejemplo, recombinación homóloga utilizando una recombinasa tal como, pero sin carácter limitante, la recombinasa FLP de *Saccharomyces cerevisiae* (Patente U.S. 5.527.695), la recombinasa CRE del fago P1 de *Escherichia coli* (solicitud PCT publicada en WO 9.109.957, la recombinasa de pSRI de *Sacharomyces rouxii* (Araki et al. 1985, J Mol Biol 182: 191-203), o el sistema de recombinación del fago lambda tal como se describe en la Patente US 4.673.640.

El DNA puede insertarse en un genoma de planta, tal como un genoma de arroz por métodos que incluyen métodos de electroporación, bombardeo con partículas de oro recubiertas de DNA o métodos biolísticos, o métodos mediados por agrobacterium o propilenglicol, etcétera.

Como se utiliza en esta memoria, "que comprende(n)" debe interpretarse como especificación de la presencia de las características, números enteros, pasos o componentes indicados a los que se hace referencia, pero no excluye la presencia o adición de una o más características, números enteros, 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 realmente, es decir, puede estar embebido en un ácido nucleico o proteína de mayor tamaño. Un gen quimérico que comprende una secuencia de DNA que está funcional o estructuralmente definida, puede comprender secuencias de DNA adicionales, etc.

Los ejemplos que siguen describen el desarrollo y las características de plantas de arroz que albergan el evento de élite GAT-OS2.

A no ser que se especifique otra cosa, todas las técnicas de DNA recombinante se llevan a cabo conforme a protocolos estándar como se describen en Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY y en los volúmenes 1 y 2 of Ausubel et al. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols, USA. Materiales y métodos estándar para trabajo molecular con plantas se describen en Plant Molecular Biology Labfax (1993) por R.D.D. Croy, publicado por BIOS Scientific Publications Ltd (UK) y Blackwell Scientific Publications, UK.

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

SEQ ID No 1: OSA03: cebador del protocolo de identificación PCR

SEQ ID No 2: OSA04: cebador específico GAT-OS2 del protocolo de identificación PCR

10 SEQ ID No 3: cebador endógeno del arroz OSA01

SEQ ID No 4: cebador endógeno del arroz OSA02

SEQ ID No 5: Cebador Degenerado MDB556

SEQ ID No 6: TAIL Primario MDB 010

SEQ ID No 7: TAIL Secundario MDB 559

15 SEQ ID No 8: TAIL Terciario MDB 411

SEQ ID No 9: Cebador Degenerado MDB 285

SEQ ID No 10: TAIL Primario MDB 424

SEQ ID No 11: TAIL Secundario MDB 442

SEQ ID No 12: TAIL Terciario MDB 410

20 SEQ ID No 13: Cebador Oligonucleotídico YTP 059

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1. Transformación de arroz con un gen que codifica resistencia a los herbicidas

a) Construcción del DNA quimérico que comprende el gen *bar* bajo el control de un promotor 35S (pB5/35Sbar)

25 Se construyó un plásmido pB5/35Sbar siguiendo procedimientos estándar. La digestión con PvuI-HindIII proporcionó un fragmento de 1501 pb que comprendía los elementos genéticos siguientes:

| Coordenadas de los nucleótidos | Elementos genéticos   |
|--------------------------------|---|
| 2140-2195                      | Secuencia derivada de pUC19 (Yanish-Perron et al., Gene 33:103-119, 1985)   |
| 2196-2204                      | Secuencia de polienlazador sintético  |
| 2205-2398                      | Complemento del terminador 35S (T35S) del Virus del Mosaico de la Coliflor (Franck A. et al., Cell 21:285-294, 1980; Pietrzak M. et al., Nucl. Acids Res. 14:5857-5868, 1986) |
| 2399-2417                      | Secuencia de polienlazador sintético  |
| 2418-2969                      | Complemento del gen <i>bar</i> de <i>Streptomyces hygrosopicus</i> (Thompson et al., EMBO J. 6:2519-2523, 1986)   |
| 2970-2985                      | Secuencia de polienlazador sintético  |
| 2986-3517                      | Complemento del promotor 35S (P35S) del Virus del Mosaico de la Coliflor (Franck et al. arriba; Pietrzak et al., arriba)  |
| 3518-3641                      | Secuencia derivada de pUC19, (Yanisch-Perron et al., arriba)  |

El fragmento Pvul-HindIII de 1501 pb se purificó por extracción de este fragmento después de electroforesis.

b) Transformación de arroz

5 La Variedad Bengala es un arroz de grano medio desarrollado por la Rize Research Station of the Louisiana Agricultural Experiment Station. La variedad se puso a la venta oficialmente en 1992. El linaje incluye MARS y M201 (Linscombe S.D. et al. 1993, Crop Science: 33:645-646).

La transformación de las plantas de arroz con el fragmento Pvul-HindIII de 1501 pb de pB5/35Sbar se realizó utilizando transferencia directa de DNA. La selección se hizo en fosfinotricina (PPT) en todas las etapas excepto la regeneración de las plántulas, que se realizó en ausencia de PPT para acelerar el crecimiento. Esto dio como resultado un juego de transformantes primarios (plantas de la generación T<sub>0</sub>).

10 **Ejemplo 2. Desarrollo de eventos**

a) Desarrollo de líneas transgénicas homocigóticas

15 Las diversas plántulas hemicigóticas T<sub>0</sub> se sometieron a transición a partir de cultivo de tejido, se transfirieron a tierra vegetal de invernadero, y se dejaron florecer y producir semillas. Las plántulas se evaluaron respecto a fertilidad, fecundidad y tolerancia al glufosinato de amonio. Se seleccionaron 19 plantas para análisis ulterior. Se recogió de estas plantas semilla T<sub>1</sub> producida por autopolinización y se cultivó en el campo. Las plantas T<sub>1</sub> se pulverizaron con el herbicida Liberty™ a 800 gramos de ingrediente activo por hectárea (g.a.i./ha; la dosis recomendada para los agricultores es 400 g.a.i./ha). Los eventos que sobrevivieron a la aplicación del herbicida y segregaron 3:1 respecto a tolerancia a los herbicidas se seleccionaron para evaluación ulterior. Las plantas tolerantes se evaluaron respecto a deterioro (quemado de la punta de la hoja).

20 Se cosecharon semillas T<sub>2</sub> de panículas de todas las plantas tolerantes de los eventos seleccionados. Se sembraron éstas en hileras y las plantas T<sub>2</sub> se pulverizaron con el herbicida Liberty™ (1600 g.a.i./ha) a fin de evaluar la segregación de la tolerancia al herbicida. Se seleccionaron aquellas hileras que tenían 100% de supervivientes y correspondían por tanto a líneas que eran homocigóticas para el transgén. Se evaluaron de nuevo éstas respecto a deterioro por el herbicida y rasgos fenotípicos. La selección ulterior de eventos se hizo basándose en uniformidad de fenotipo dentro de la hilera de panículas (para las características deseadas).

25 b) Caracterización de los eventos transgénicos - selección de GAT-OS2

Los eventos transgénicos se caracterizaron ulteriormente para patrones de transferencia Southern, fenotipo general y eficiencia agronómica, así como rendimiento. En caso apropiado, se determinaron estas características en condiciones de campo.

30 **Análisis de transferencia Southern**

35 La presencia del transgén se comprobó por análisis de transferencia Southern estándar utilizando digestión enzimática de DNA genómico del arroz con EcoRV e hibridación al fragmento EcoRI de 1327 pb de pB5/35Sbar. La intensidad relativa de las bandas proporcionó una indicación de si las plantas de arroz eran homocigóticas o hemicigóticas para el locus transgénico. Se encontró que dos eventos tenían inserciones simples. Esto se confirmó por el hecho de que el patrón de segregación del transgén podría explicarse por herencia mendeliana de un solo locus.

**Fenotipo general y eficiencia agronómica de la planta**

40 Se evaluaron plantas T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub> respecto a varios rasgos fenotípicos que incluían altura de la planta, fuerza/rigidez de la paja, tendencia al encamado, morfología de la hoja (demasiado delgada o ángulo incorrecto para la hoja de bandera), madurez tardía, configuración del flósculo, esterilidad de la panícula o fertilidad incompleta, cierre incompleto de la cáscara sobre la semilla (que podría conducir a susceptibilidad incrementada a las enfermedades), tamaño y forma del grano, y producción y rendimiento del grano. Se evaluaron líneas que fuesen similares (o mejoradas) en características agronómicas exhibidas comparadas con la variedad cultivada Bengala sin transformar y las variedades de arroz siguientes: Priscilla, Cypress, Cocadrie, Jefferson, Madison, M202, M201, M103, Drew, Kaybonnet, Lagrue. En algunos casos, las plantas con una hilera de panículas se segregaron respecto a variación somaclonal para uno o más de los rasgos arriba mencionados. A no ser que esto diera como resultado la introducción de un rasgo fenotípico convencionalmente interesante, estas plantas se desecharon.

**Pruebas en campo para evaluación del rendimiento**

50 Se cosecharon semillas T<sub>2</sub> a granel a partir de las poblaciones homocigóticas seleccionadas y se compararon con estándares de variedad de Bengala. Las semillas se trataron como hileras de panículas en bloques aislados que representaban cada evento. Los tiestos transgénicos se pulverizaron con 1600 g.a.i./ha de herbicida Liberty™ o no se pulverizaron (tiestos "sin pulverización"). Los tiestos con estándares de variedades no transgénicas se



pulverizaron con Liberty™. Se aplicaron a todos los tiestos tratamientos estándar con herbicida para controlar las malezas locales.

Los eventos transgénicos se ensayaron respecto a eficiencia de producción en localizaciones diferentes que incluían Louisiana y Puerto Rico (vivero de invierno).

- 5 Se completaron el análisis estadístico de los parámetros agronómicos y las estadísticas de rango de la morfología de la planta y otros datos no paramétricos para identificar el candidato comercial óptimo para competir con la variedad parental, Bengala y las variedades de arroz siguientes: Priscilla, Cypress, Cocadrie, Jefferson, Madison, M202, M201, M103, Drew, Kaybonnet, Lagrue. GAT-OS2 era el evento que exhibía la utilidad máxima para producir una gama de líneas de mejora genética.

10 **Ejemplo 3. Caracterización del evento GAT-OS2**

a) Análisis en profundidad molecular y genético del locus

Una vez que se identificó el evento GAT-OS2 como el evento en el que eran óptimas la expresión del transgén así como la eficiencia agronómica global, se analizó en detalle el locus del transgén a un nivel molecular. Esto incluía el análisis detallado de la transferencia Southern y la secuenciación de las regiones flanqueantes del transgén.

- 15 (1) Análisis de transferencia Southern utilizando enzimas de restricción múltiples

Se cosechó tejido de hoja de plantas transgénicas y de control. El DNA genómico total se aisló del tejido de hoja conforme a Dellaporta et al. (1983, Plant Molecular Biology Reporter, 1, vol. 3, p. 19-21). La concentración de DNA de cada preparación se determinó por medida de la densidad óptica en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm.

- 20 Se digirieron 10 µg de DNA genómico con enzima de restricción en un volumen final de reacción de 40 µl, aplicando condiciones propuestas por el fabricante. El tiempo de digestión y/o la cantidad de enzima de restricción se ajustaron a fin de asegurar la digestión completa de las muestras de DNA genómico sin degradación inespecífica. Después de la digestión, se añadieron 4 µl de colorante de carga a las muestras de DNA digeridas, y se cargaron luego en un gel de agarosa al 1%.

- 25 Se cargaron también en el gel los DNAs de control siguiente:

- Un control negativo con DNA genómico preparado a partir de una planta de arroz no transgénico. Este control negativo se utiliza para confirmar la ausencia de hibridación de fondo.

- 30 - Un control positivo de DNA: con una integración heterocigótica de una sola copia del transgén en el genoma de *Oryza sativa*, 10 µg de DNA genómico tiene el mismo número de equivalentes moleculares que ± 19 picogramos de fragmento PvuI-HindIII de 1501 pares de bases del DNA pB5/35Sbar (tamaño del genoma diploide de *Oryza sativa*:  $0,8 \times 10^9$  pb). La cantidad que representa una sola copia de plásmido por genoma se añade a 1 µg de DNA digerido de *Oryza sativa* no transgénico. Esta muestra de reconstitución se utiliza para demostrar que las hibridaciones se realizan en condiciones que permiten la hibridación de la sonda con secuencias diana.

- 35 Se incluyó como estándar de tamaño DNA del Fago Lambda (cepa Clind 1 ts 857 Sam7, Life Technologies) digerido con PstI.

Después de la electroforesis, las muestras de DNA (DNA genómico digerido de arroz, controles y DNA estándar de tamaño) se transfirieron a una membrana de nailon por transferencia capilar durante 12 a 16 horas. Los moldes de DNA utilizados para preparación de sonda se prepararon por digestión de restricción del plásmido pB5/35Sbar con EcoRI. Esto liberó un fragmento de DNA de 1327 pares de bases que abarca una parte relevante del DNA transformante (fragmento PvuI-HindII de 1501 pb). Después de purificación, el fragmento de DNA se etiquetó conforme a procedimientos estándar, y se utilizó para hibridación a la membrana.

- 45 La hibridación se realizó en condiciones estándar de severidad: La sonda etiquetada se desnaturalizó por calentamiento durante 5 a 10 minutos en un baño de agua a 95°C hasta 100°C y congelación en hielo durante 5 a 10 minutos, y se añadió a la solución de hibridación (6 X SSC (20 X SSC es 3,0 M NaCl, 0,3 M citrato de Na, pH 7,0), 5 X Denhardt's (100 X Denhardt's = 2% Ficoll, 2% polivinil-pirrolidona, 2% seroalbúmina bovina), 0,5% SDS y 20 µg/ml de DNA portador desnaturalizado (DNA monocatenario de esperma de pescado, con una longitud media de 120-3000 nucleótidos). La hibridación se realizó durante una noche a 65°C. Las transferencias se lavaron 3 veces con 20 a 40 minutos a 65°C, con la solución de lavado (2 X SSC, 0,1% SDS).

Las autorradiografías se escanearon electrónicamente.

- 50 Los patrones de restricción obtenidos después de digestión del DNA genómico de GAT-OS2 con diferentes enzimas de restricción se presentan en la Figura 1 y se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1: Mapa de restricción de GAT-OS2

| Número de pista | DNA cargado                   | Migración de fragmentos de hibridación de DNA entre bandas de marcadores de selección |              | Longitud estimada de los fragmentos de hibridación de DNA |
|-----------------|-------------------------------|---|--------------|---|
|                 |                               | Mayor que   | Menor que    |   |
| 1               | Lambda DNA con PstI           | No Aplicable  | No Aplicable |   |
| 2               | GAT-OS2- EcoRI                | 1159  | 1700         | 1327 pb (*)   |
| 3               | GAT-OS2- BamHI                | 1700<br>805   | 2140<br>1093 | 2,0 pb<br>805 pb (*)                                      |
| 4               | GAT-OS2- EcoRV                | 5077<br>2838  | -<br>4507    | 12 kpb<br>3,8 kpb   |
| 5               | GAT-OS2- HindIII              | 5077  | 11497        | 5,3 kpb   |
| 6               | GAT-OS2- NcoI                 | 2838<br>2838  | 4507<br>4507 | 4,1 kpb<br>3,1 kpb  |
| 7               | GAT-OS2-NsiI                  | 4749  | 11497        | 5,1 kpb   |
| 8               | Arroz no transgénico          | -   | -            | -   |
| 9               | Plásmido de control DNA-EcoRI | 1159  | 1700         | 1327 pb   |

(\*) Las longitudes de estos fragmentos son las predichas a partir del mapa de restricción del fragmento Pvul-HindIII de pB5/35S de 1501 pb.

(2) Identificación de las secuencias flanqueantes

- 5 La secuencia de las regiones flanqueantes del transgén insertado en el evento GAT-OS2 se determinó utilizando el método PCR térmico entrelazado asimétrico (TAIL-) como ha sido descrito por Liu et al. (1995, The Plant Journal 8(3): 457-463). Este método utiliza 3 cebadores específicos anidados en reacciones sucesivas junto con un cebador arbitrario degenerado (AD) más corto a fin de que puedan controlarse térmicamente las eficiencias de amplificación relativas de los productos específicos e inespecíficos. Los cebadores específicos se seleccionaron para reasociación al extremo del transgén y se basaron en sus condiciones de reasociación.

Una pequeña cantidad (5 µl) de productos PCR secundarios y terciarios impurificados se analizaron en un gel de agarosa al 1%. Se utilizó el producto PCR terciario para amplificación preparativa, se purificó y se secuenció en un secuenciador automático utilizando el kit del ciclo DyeDeoxy Terminator.

1. TAIL-PCR del sitio HindIII

- 15 Los cebadores utilizaron fueron:

|                           | Secuencia (5' → 3')                              | Posición en pBS/35Sbar |
|---------------------------|--|------------------------|
| Cebador degenerado MDB556 | CNg.ASN.AgW.TWg.CAT.A<br>(SEQ ID NO:5)           | -----                  |
| TAIL Primario MDB010      | gCA.CCA.TCg.TCA.ACC.ACT.ACA.TCg<br>(SEQ ID No:6) | 2905→2882              |

|                           |  |           |
|---------------------------|--|-----------|
| TAIL Secundario<br>MDB559 | TTC.Tgg.Cag.CTg.gAC.TTC.AgC<br>(SEQ ID NO:7) | 2483→2463 |
| TAIL terciario<br>MDB411  | Agg.CAT.gCC.gCT.gAA.ATC.ACC<br>(SEQ ID NO:8) | 2407→2386 |

donde: N = A, C, T o g; S = C o g; W = A o T

El fragmento amplificado utilizando MDB556-MDB411 tenía aprox. 400 pb, de los cuales se secuenciaron 113 pb. La secuencia entre pb 1 y pb 92 comprendía DNA de planta, mientras que la secuencia entre pb 93 y pb 113 correspondía a DNA pB5/35Sbar.

5 2. TAIL-PCR del sitio Pvu1

Los cebadores utilizaron fueron:

|                              | Secuencia (5' → 3')                             | Posición en pB5/35Sbar |
|------------------------------|---|------------------------|
| Cebador degenerado<br>MDB285 | NTC.gAS.TWT.SgW.gTT<br>(SEQ ID NO:9)            | -----                  |
| TAIL Primario<br>MDB424      | AAg.gAT.AgT.ggg.ATT.gTg.Cg<br>(SEQ ID NO:10)    | 3037→3056              |
| TAIL Secundario<br>MDB442    | AAT.ggA.ATC.CgA.ggA.ggT.TTC.C<br>(SEQ ID NO:11) | 3283→3304              |
| TAIL terciario<br>MDB410     | TCg.TgC.TCC.ACC.Atg.TTg.ACg<br>(SEQ ID NO:12)   | 3390→3410              |

donde: N = A, C, T o g; S = C o g; W = A o T

El fragmento amplificado utilizando MDB285-MDB410 tenía una longitud de aprox. 1200 pb. La secuencia entre pb 1 y pb 604 correspondía a DNA de pB5/35Sbar, mientras que pb 605 a pb 1279 comprendía DNA de planta.

10 (3) Identificación de la delección del sitio diana

Utilizando cebadores correspondientes a secuencias dentro de las regiones flanqueantes del transgén en el tipo salvaje *Oryza sativa* var. Bengala como molde, se identificó el sitio de inserción del transgén.

Se utilizaron los cebadores siguientes:

|    | Secuencia (5' → 3')                                  | Posición en el flanco 5' | Posición en el flanco 3' |
|----|--|--------------------------|--------------------------|
| 15 | YTP059 TCg.gAC.AAC.CgC.gAT.AgT.TCg<br>(SEQ ID NO:13) | 56 → 76                  | -----                    |
| 20 | OSA04 TCg.CAT.ATg.TAT.gTA.ACA.CgC<br>(SEQ ID NO:2)   | -----                    | 717 → 697                |

Esto produjo un fragmento de 168 pb, en el cual pb 38 a 55 corresponde a un sitio de delección diana.

Así, la región completa de inserción del arroz tal como se secuenció comprende:

|    |            |                           |
|----|------------|---------------------------|
| 25 | 1 - 92:    | región flanqueante 5'     |
|    | 93 - 110:  | delección del sitio diana |
|    | 111 - 785: | región flanqueante 3'     |

(4) Análisis genético del locus

30 La estabilidad genética de la inserción se comprobó por análisis molecular y fenotípico en las plantas de la progenie a lo largo de varias generaciones.

Se compararon los análisis de transferencia Southern en plantas resistentes a glufosinato de las plantas de arroz GAT-OS2 de la generación T<sub>0</sub>, T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub>, y se encontró que eran idénticos. Esto demuestra que la configuración molecular del transgén en las plantas que contenían GAT-OS2 era estable.

El evento GAT-OS2 exhibía segregación mendeliana para el transgén como un locus genético simple en al menos 3 generaciones subsiguientes, lo que indicaba que la inserción es estable.

Sobre la base de los resultados anteriores se identificó GAT-OS2 como un evento de élite.

b) Desarrollo de herramientas de diagnóstico para control de identidad

- 5 Se desarrollaron los protocolos siguientes para identificar cualquier material de planta de arroz que comprendía el evento de élite GAT-OS2.

**(1) Protocolo de identificación del mapa de restricción del evento de élite GAT-OS2**

Las plantas de arroz que contienen el evento de élite GAT-OS2 pueden identificarse de transferencia Southern utilizando esencialmente el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 3a). (1). Así, el DNA genómico del arroz es 1) digerido con al menos tres, preferiblemente al menos cuatro, particularmente con al menos cinco, y más particularmente con la totalidad de las enzimas de restricción siguientes: EcoRI, BamHI, EcoRV, HindIII, NcoI, NsiI, 2) transferido a membranas de nailon y 3) hibridado con el fragmento EcoRI de 1327 pares de bases del plásmido pB5/35Sbar. Si, con respecto a cada una de las enzimas de restricción utilizadas, se identifican fragmentos de DNA con la misma longitud que los enumerados en la Tabla 1, se determina que la planta de arroz alberga el evento de élite GAT-OS2.

**(2) Protocolo de identificación de la reacción en cadena de polimerasa del evento de élite GAT-OS2**

Es necesario realizar una operación de test con todos los controles apropiados, antes de intentar clasificar los sucesos desconocidos. El protocolo presentado podría requerir optimización para los componentes que pueden 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 preciso alcanzar condiciones de PCR y termociclación que amplifiquen cantidades equimolares tanto de la secuencia endógena como de la 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.

**DNA molde**

El DNA molde se prepara conforme a Edwards *et al.* (Nucleic Acids Research, 19, p 1349, 1991). En caso de utilizar DNA preparado por otros métodos, debería realizarse una operación de ensayo utilizando cantidades diferentes del molde. Usualmente, 50 ng de DNA genómico molde produce los resultados óptimos.

**Controles positivo y negativo asignados**

Los controles positivo y negativo siguientes deberían incluirse en una operación PCR:

- Control Master Mix (control negativo de DNA). Esta es una PCR en la cual no se añade a la reacción cantidad alguna de DNA. Cuando se observa el resultado esperado, sin productos PCR, ello indica que el cóctel PCR no estaba contaminado con DNA diana.
- Un control positivo de DNA (muestra de DNA genómico que se sabe contiene las secuencias transgénicas). La amplificación con éxito de este control positivo demuestra que la PCR se realizó en condiciones que permiten la amplificación de las secuencias diana.
- 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 del producto PCR del transgén pero con amplificación del producto PCR endógeno, ello indica que no existe amplificación alguna de fondo del transgén detectable en una muestra de DNA genómico.

**Cebadores**

Se utilizan los cebadores siguientes, que reconocen específicamente el transgén y una secuencia flanqueante de GAT-OS2:

- OSA03: 5'-gAC.TCT.gTA.TgA.ACT.gTT.CgC-3' (SEQ ID 1)  
(diana: P35S)
- OSA04: 5'-TCg.CAT.ATg.TAT.gTA.ACA.CgC-3' (SEQ ID 2)  
(diana: DNA de planta)

## ES 2 517 526 T3

Se incluyen siempre en el cóctel PCR cebadores que direccionan 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 existe DNA abundante de la calidad adecuada en la preparación de DNA genómico para que se genere un producto PCR. Los cebadores endógenos utilizados son:

- 5 OSA01: 5'-gAT.CAg.TgC .Agg.CAA.TAC.Tgg-3' (SEQ ID 3)  
(Gen D de fosfolipasa Acc. No. AB001919, 3836→3856)
- OSA02: 5'-TTC.CTA.ACA.TgT.ggg.TgT.Cg-3' (SEQ ID 4)  
(Gen D de fosfolipasa Acc. No. AB001919, 4291→4272)

### Fragmentos amplificados

- 10 Los fragmentos amplificados esperados en la reacción PCR son:

Para el par de cebadores OAS01-OAS02: 457 pb (control endógeno)  
Para el par de cebadores OSA03-OAS04: 313 pb (evento de élite GAT-OS2)

### Condiciones PCR

La mezcla PCR para reacciones de 50 µl contiene:

- 15 5 µl DNA molde  
5 µl 10x Tampón de Amplificación (suministrado con polimerasa Taq)  
1 µl dNTP's 10 mM  
1 µl OSA01 (10pmoles/µl)  
1 µl OSA02 (10pmoles/µl)
- 20 2 µl OSA03 (10pmoles/µl)  
2 µl OSA04 (10pmoles/µl)  
0,2 µl DNA polimerasa Taq (5 unidades/µl)  
agua hasta to 50 µl

El perfil de termociclación que debe seguirse para resultados óptimos es el siguiente:

- 25 4 min. a 95°C  
Seguido por: 1 min. a 95°C  
1 min. a 57°C  
2 min. a 72°C
- 30 Durante 5 ciclos  
Seguido por: 30 sec. a 92°C  
30 sec. a 57°C  
1 min a 72°C  
Durante 22 a 25 ciclos
- 35 Seguido por: 5 minutos a 72°C

### Análisis en gel de agarosa

Deberían aplicarse entre 10 y 20 µl de las muestras PCR en un gel de agarosa al 1,5% (tampón Tris-borato) con un marcador apropiado de peso molecular (v.g. escalera de 100 pb PHARMACIA).

### Validación de los resultados

- 40 Los datos de las muestras de DNA transgénico de planta dentro de una sola operación PCR y un solo cóctel PCR no deberían ser aceptable a no ser que 1) el control positivo de DNA exhiba los productos PCR esperados (fragmentos transgénico y endógeno), 2) el control negativo de DNA es negativo para la amplificación PCR (sin fragmentos) y 3) el control de DNA de tipo salvaje exhibe el resultado esperado (amplificación del fragmento endógeno).

- 45 Las pistas que exhiben cantidades visibles de los productos PCR transgénico y endógeno de los tamaños esperados, indican que la planta correspondiente a partir de la que se preparó el DNA genómico molde, ha heredado el evento de élite GAT-OS2. Las pistas que no muestran cantidades visibles del producto PCR transgénico y que muestran cantidades visibles del producto PCR endógeno, indican que la planta correspondiente de la que se preparó el DNA genómico molde, no comprende el evento de élite. Las pistas que no muestran cantidades visibles de los productos PCR endógeno y transgénico, indican que la calidad y/o cantidad del DNA genómico no permitía la

generación de un producto PCR. Estas plantas no pueden registrarse. La preparación de DNA genómico debería repetirse y tiene que realizarse una nueva operación PCR, con los controles apropiados.

**Uso del protocolo de discriminación PCR para identificar GAT-OS2**

5 Se ensayó material de hojas de arroz procedente de plantas que comprendían eventos transgénicos diferentes (muestras 1 a 10) conforme al protocolo arriba descrito. Se tomaron como controles negativos muestras del tipo salvaje M202 y tipo salvaje Bengala.

Los resultados del análisis PCR se ilustran en la Figura 2. Las muestras 8 y 9 (que contenían de hecho DNA de plantas derivadas del mismo evento) se reconocen como muestras que comprenden el evento de élite GAT-OS2. Todas las restantes líneas ensayadas no comprenden este evento de élite.

10 Ejemplo 4: Introgresión de GAT-OS2 en variedades cultivadas preferidas

El evento de élite GAT-OS2 se introduce por retrocruzamiento repetido en las variedades cultivadas siguientes:

- Rosales chinos Templados de California (tales como pero no limitados a M204, M202, M201, M103)
- Rosales chinos Tropicales de California (tales como pero no limitados a L201, L202)
- Rosales chinos Templados de Japón y Corea (tales como pero no limitados a Koshihikari y Milyang)
- 15 - Rosales chinos Templados de Australia (tales como pero no limitados a Millin y Jarrah)
- Rosales chinos Templados del Mediterráneo (tales como pero no limitados a Ballila, Arborio)
- Plantas Índicas Chinas (tales como pero no limitadas a Guichao, Congui 314, Teqing)
- Rosales chinos Tropicales del Sur de los Estados Unidos, grano largo (tales como pero no limitados a Drew, Cypress, Jefferson, Priscilla, Cocadrie)
- 20 - Rosales chinos Tropicales del Sur de los Estados Unidos, grano medio (tales como pero no limitados a Bengala, Mars, Brazos, Mercury)
- Rosales chinos Tropicales de América del Sur, grano largo (tales como pero no limitados a El Paso 144, IRGA 409)
- Tipos basmati y jazmín del Extremo Oriente (Kasmir, Kwao Dak Mali)
- 25 - Tipos africano javanés (arrocés bulu)

30 Se observa que la introgresión del evento de élite en estas variedades cultivadas no influye significativamente en ninguna de las características fenotípicas o agronómicas deseables de estas variedades cultivadas (ausencia de arrastre de acoplamiento), mientras que la expresión del transgén, como se determina por tolerancia al glufosinato, cumple los niveles comercialmente aceptables. Esto confirma el estatus del evento GAT-OS2 como un evento de élite.

35 Como se utiliza en las reivindicaciones que siguen, a no ser que se indique claramente otra cosa, debe entenderse que el término "planta" abarca tejidos de planta, en cualquier etapa de madurez, así como cualesquiera células, tejidos u órganos tomados de o derivados de cualquiera de tales plantas, con inclusión, sin carácter limitante, de semillas, hojas, tallos, flores, raíces, células simples, gametos, cultivo de células, cultivos de tejido o protoplastos cualesquiera.

La semilla que comprendía el evento de élite GAT-OS2 se depositó como GAT-OS2 en la ATCC bajo el número: ATCC 203352.

**REIVINDICACIONES**

1. Una planta, célula, tejido o semilla de arroz transgénica, tolerante al glufosinato, que comprende en su genoma un transgén 35S-bar P<sub>vul</sub>-HindIII de 1501 pares de bases que comprende los elementos genéticos que se muestran en la Tabla del Ejemplo 1a) y en donde dicho transgén 35S-bar está localizado entre una región  
5 flanqueante 92 nucleótidos aguas arriba y una región flanqueante 675 nucleótidos aguas abajo, estando localizada dicha región flanqueante de aguas arriba inmediatamente aguas arriba de y contigua a dicho transgén y comprendiendo la secuencia de nucleótidos designada YTP059:

5'-TCGGACAACCGCGATAGTTCG-3'

en posición 56-76 de la región flanqueante de aguas arriba

- 10 y estando localizada dicha región flanqueante de aguas abajo inmediatamente aguas abajo de y contigua a dicho transgén, y comprendiendo la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia designada OSA04:

5'-TCGCATATGTATGTAACACGC-3'

en posición 93-113 de la región flanqueante de aguas abajo,

- 15 estando los elementos genéticos del transgén mostrados en la tabla del Ejemplo 1a) presentes en el arroz Elite Event GAT-OS2 depositado en la ATCC con el número de acceso ATCC 203352.

2. Un proceso para cultivar plantas de arroz que comprende dejar crecer las plantas de la reivindicación 1 y aplicar un herbicida con glufosinato como ingrediente activo a las plantas de arroz cultivadas.

Figura 1

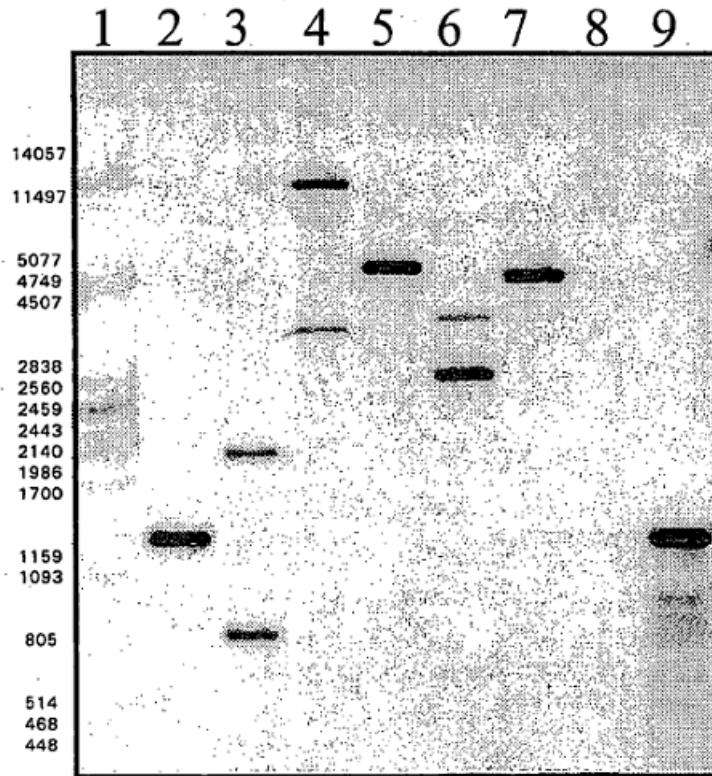




Figura 2

