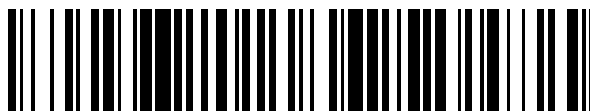


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 664**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.01.2008 E 08708376 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015 EP 2118312**

54 Título: **Detección de eventos de plantas transgénicas**

30 Prioridad:

**29.01.2007 EP 07447008**  
**16.05.2007 EP 07108343**

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

**18.03.2015**

73 Titular/es:

**SCIENTIFIC INSTITUTE OF PUBLIC HEALTH (IPH)**  
**(100.0%)**  
**RUE JULIETTE WYTSMANSTRAAT 14**  
**1050 BRUXELLES, BE**

72 Inventor/es:

**VAN DEN BULCKE, MARC HENRI GERMAIN;**  
**LIEVENS, ANTOON PIET NELLY RAOUL;**  
**LEUNDA, AMAYA;**  
**MBONGOLO MBELLA, ETONDOH GUILLAUME;**  
**BARBAU-PIEDNOIR, ELODIE y**  
**SNEYERS, MYRIAM JACQUELINE SYLVIANE**

74 Agente/Representante:

**ZEA CHECA, Bernabé**

**ES 2 531 664 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

Detección de eventos de plantas transgénicas

## 5 Campo de la invención

[0001] La presente memoria se refiere a la detección de materiales derivados de eventos de plantas transgénicas. En particular, la memoria proporciona métodos, reactivos, kits y materiales de referencia para detectar la presencia o ausencia en una muestra de material genético derivado de y atribuible a eventos seleccionados de plantas transgénicas.

## Antecedentes de la invención

[0002] Los organismos modificados genéticamente (GMO), en particular las plantas modificadas genéticamente, están adquiriendo importancia en la agricultura así como en la producción y comercialización de alimentos y piensos.

[0003] Sin embargo, debido a cuestiones existentes respecto al impacto de los GMO sobre el medioambiente y sobre la salud de los consumidores, la introducción de nuevos GMO requiere comúnmente la aprobación reglamentaria y, en muchos países incluyendo la Unión Europea, los productos alimentarios y de piensos que contienen o se producen a partir de GMO están en sí mismos sometidos a autorización y etiquetado obligatorio (véase, por ejemplo, Normativa (EC) nº 1829/2003, Off J Eur Communities: Legis. 2003, L268: 1-23; Normativa (EC) nº 1830/2003, Off J Eur Communities: Legis. 2003, L268: 24-28).

[0004] Por consiguiente, el rastreo de los GMO en el medioambiente y a través de los procesos de cultivo y la cadena de producción de alimentos o piensos es fundamental para la evaluación de riesgos medioambientales, así como necesario para conservar la confianza de los consumidores y para satisfacer o verificar el cumplimiento de las normativas obligatorias, incluyendo el etiquetado de productos con GMO.

[0005] Esto requiere la disponibilidad de métodos que puedan determinar la presencia, identidad y/o cantidad de GMO o materiales originados o derivados a partir de los mismos en, por ejemplo, fuentes de alimentos y piensos, ingredientes y/o consumibles procesados. Los métodos basados en ADN son muy útiles a este respecto, entre otras razones porque el ADN a menudo soporta los tratamientos de procesamiento físico y químico de los alimentos mejor que otras moléculas, tales como las proteínas. Por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (PCR) ha demostrado ser una técnica específica y sensible para la cuantificación de ácidos nucleicos, indicativos de la presencia de ADN originado a partir de GMO.

[0006] Se describen métodos de selección para uno o más eventos de plantas transgénicas a través de la detección de uno o más elementos de secuencia en Delano et al. 2003, J. Agr. Food Chem. 51: 5829-5834; Vesna et al. 2002, Acta Veterinaria 52: 201-210; Permingeat et al. 2002, J. Agr. Food Chem. 50: 4431-4436; Saxena et al. 2002, Soil Biol. Biochem. 34: 133-137; La Paz et al. 2006, J AOAC Int. 89: 1347-1352; Nadal et al. 2001, Electrophoresis 27: 3879-3888; documento US 2006/070139; documento WO 2006/108674; Hernandez et al. 2004, J Cereal Sci 39: 99-107; Heck et al. 2005, Crop Science 45: 329-339; documento US 2006/282915; Hernandez et al. 2001, J. Agr. Food Chem. 48: 3622-3627; documento WO 2005/103301; Yang et al. 2005, Transgenic Res. 14: 817-831; Watanabe et al. 2004, Biol Pharm Bull. 27: 1333-1339; documento WO 2001/032919; documento DE 19906169; documento EP 1724360; y documento DE 10005808.

[0007] Se dispone de ensayos que deducen, de forma inequívoca, la presencia o ausencia de material genético derivado de un evento seleccionado de transformación vegetal en una muestra. Comúnmente, dichos ensayos pueden detectar la presencia de una secuencia única de nucleótidos específica de evento hallada en el evento de transformación vegetal de interés pero ausente de otros eventos. Por ejemplo, dichas secuencias distintivas de nucleótidos pueden estar presentes en las uniones entre la secuencia genómica endógena del GMO y la secuencia de la construcción génica transformante en el sitio de inserción genómica de la última; la detección puede implicar, por ejemplo, la amplificación por PCR a través de dicha unión usando cebadores específicos que flanqueen la unión (véase, por ejemplo, Hernandez et al. 2003, Transgenic Res 12: 179-189; Hernandez et al. 2004, J Cereal Sci 39: 99-107; Berdal et al. 2001, Eur Food Res Technol 213: 432-438; Nielsen et al. 2004, Eur Food Res Technol 219: 421-427; o Ronning et al. 2003, Eur Food Res Technol 216: 347-354).

[0008] Sin embargo, estos ensayos específicos de evento a menudo pueden conseguirse solamente como kits de elevado precio que permiten una cantidad limitada de ensayos, están restringidos a la detección de material de un único evento, y habitualmente emplean condiciones de reacción muy particulares. Pese a ello, la cantidad de GMO generados, autorizados y comercializados sigue aumentando. Por tanto, una determinación inequívoca de la composición de GMO de una muestra en principio requeriría aplicar una batería siempre creciente de ensayos diferentes de detección específica de evento sobre cada muestra, lo que es exigente tanto en dificultad como en costes.

65

**[0009]** Por lo tanto, aunque sigue siendo deseable emplear ensayos específicos de evento debido a la naturaleza inequívoca de su resultado, existe la necesidad de usar estos ensayos de un modo más efectivo y dirigido, tal como para mejorar la detección de GMO, por ejemplo, en términos de consumo de tiempo, costes e intensidad de trabajo.

## 5 Descripción resumida de la invención

**[0010]** La presente memoria proporciona métodos, reactivos, kits y materiales de referencia que abordan una o más de las necesidades de la técnica analizadas anteriormente.

10 **[0011]** En general, la memoria por tanto proporciona métodos, reactivos, kits y materiales de referencia mejorados para detectar material derivado de GMO, y preferentemente de plantas modificadas genéticamente, en muestras.

**[0012]** Más particularmente, los inventores han reconocido que eligiendo cuidadosamente ciertas características de secuencia a ensayar en la muestra - en la cual dichas características de secuencia no tienen que ser específicas de evento y pueden, de hecho, compartirse entre dos o más eventos - se puede concluir si la muestra contiene potencialmente material derivado de uno o más eventos de transformación o, por el contrario, si la muestra no contiene material derivado de uno o más de estos eventos de transformación. Los ensayos de la invención pueden así proporcionar una indicación valiosa de los contenidos potenciales de GMO de la muestra y de ese modo reducir ventajosamente la cantidad de ensayos posteriores (tales como, por ejemplo, ensayos específicos de evento),  
15 necesarios para verificar la presencia de material derivado de uno o más eventos de transformación particulares en la muestra; esto puede a su vez mejorar la eficiencia de costes, tiempo y/o trabajo de los métodos de detección de GMO. Por ejemplo, los ensayos de la invención pueden permitir la reducción considerable de la cantidad de ensayos específicos de evento necesarios para caracterizar la composición de GMO de la muestra.

25 **[0013]** Los inventores también evaluaron meticulosamente los eventos de transformación conocidos, comercialmente significativos y/o autorizados para seleccionar características de secuencia a ensayar en una muestra, tal como para reducir la cantidad de reacciones individuales de ensayo necesarias por muestra asegurando todavía capacidad informativa adecuada del perfil de GMO según la invención.

30 **[0014]** La presente invención integra la realización relevante anterior en sus diversos aspectos.

**[0015]** En particular, la presente invención proporciona la materia expuesta en todos y cada uno de los siguientes (i) a (xviii):

(i). Un método para examinar una muestra para la presencia o ausencia de material derivado de uno o más eventos de plantas transgénicas que comprende las etapas de:

(1) detectar la presencia o ausencia en la muestra de ácidos nucleicos que comprenden:

- uno, más de uno o todos los ácidos nucleicos elegidos entre:

- 40 a) "Zm": un ácido nucleico derivado de y específico para el taxón *Zea mays*, preferentemente *Zea mays* ssp. *mays*,  
b) "Bn": un ácido nucleico derivado de y específico para el taxón *Brassica napus*,  
c) "Gm": un ácido nucleico derivado de y específico para el taxón *Glycine max*,  
o) "Or": un ácido nucleico derivado de y específico para el taxón *Oryza sativa*,  
45 p) "Bv": un ácido nucleico derivado de y específico para el taxón *Beta vulgaris*,  
q) "Gs": un ácido nucleico derivado de y específico para el taxón *Gossypium*, y  
t) "St": un ácido nucleico derivado de y específico para el taxón *Solanum tuberosum*; y

- todos los ácidos nucleicos d) - i):

- 50 d) "p35S": un ácido nucleico derivado del promotor 35S del Virus del mosaico de la coliflor,  
e) "tNOS": un ácido nucleico derivado del terminator 3' del gen de la nopalina sintetasa de *Agrobacterium tumefaciens*,  
f) "Cry1Ab": un ácido nucleico derivado del gen de la proteína cristal *Cry1Ab* de *Bacillus thuringiensis*,  
55 g) "PAT/bar": un ácido nucleico derivado del gen de la fosfinotricina acetiltransferasa (PAT) *bar* de *Streptomyces hygroscopicus*,  
h) "PAT/pat": un ácido nucleico derivado del gen de la fosfinotricina acetiltransferasa (PAT) *pat* de *Streptomyces viridochromogenes*, y  
i) "CP4-EPSPS": un ácido nucleico derivado del gen de la 5-enol-piruvilshikimato-3-fosfato sintasa *EPSPS* de  
60 *Agrobacterium* sp. CP4; y

(2) concluir la presencia o ausencia en la muestra de material derivado de uno o más eventos de plantas transgénicas elegidos entre el grupo que comprende: eventos Bt176, Bt11, Bt10, MON810, MON863, TC1507, NK603, T25, GA21, DAS-59122, MIR604, LY038, MON88017, cruces de los mismos, y eventos relacionados de los mismos; eventos Topas 19/2, MS1, RF1, RF2, RF3, MS8, GT73, T45, Liberator pHoe6/Ac, GS40/90pHoe6/Ac,

OXY235, cruces de los mismos incluyendo MS1/RF1, MS1/RF2, MS8/RF3, y eventos relacionados de los mismos; eventos MON 40-3-2, MON89788, A2704-12, A5547-127, cruces de los mismos, y eventos relacionados de los mismos, eventos LL62, LL06 y LL601, cruces de los mismos, y eventos relacionados de los mismos; eventos T120-7, H7-1 y A5-15, cruces de los mismos, y eventos relacionados de los mismos; eventos LL cotton 25, MON 1445, MON 531, MON 15985, cruces de los mismos, y eventos relacionados de los mismos; y evento EH92-527-1 y eventos relacionados del mismo,

en el cual dichos eventos relacionados se han generado introduciendo en el mismo taxón que el del evento con el cual están relacionados la misma construcción transformante que la del evento con el cual están relacionados, en el cual en la etapa (1) la presencia o ausencia de ácidos nucleicos en una muestra se detecta usando amplificación por PCR, preferentemente amplificación por PCR a tiempo real, en el cual la amplificación por PCR de los ácidos nucleicos se realiza simultáneamente a las mismas condiciones de termociclado, usando los respectivos pares de cebadores de la siguiente tabla, o variantes que muestra al menos un 85% de identidad de secuencia con dichos pares de cebadores:

"Zm"	Dir: 5' TCTCTTCCTCCTTTAGAGCTACCACTA 3' (SEC ID N° 56) Inv: 5' AATCGATCCAAAGCGAGATGA 3' (SEC ID N° 57)
"Bn"	Dir: 5' CAGCTCAACAGTTTCCAAACGA 3' (SEC ID N° 24) Inv: 5' CGACCAGCCTCAGCCTTAAG 3' (SEC ID N° 25)
"Gm"	Dir: 5' AACCGGTAGCGTTGCCAG 3' (SEC ID N° 58) Inv: 5' AGCCCATCTGCAAGCCTTT 3' (SEC ID N° 59)
"p35S"	Dir: 5' AAAGCAAGTGGATTGATGTGATA 3' (SEC ID N° 60) Inv: 5' GGGTCTTGCGAAGGATAGTG 3' (SEC ID N° 61)
"tNOS"	Dir: 5'-GATTAGATCCCGCAATTATACATTTAA-3' (SEC ID N° 9) Inv: 5'-TTATCTAGKTTGCGCGCTATATTT-3' (SEC ID N° 10)
"Cry1Ab"	Dir: 5'-ACCGGTTACTACTCCCATCGA-3' (SEC ID N° 11) Inv: 5'-CAGCACCTGGCACGAAGTC-3' (SEC ID N° 12)
"PAT/bar"	Dir: 5'-CGTCAACCACTACATCGAGACAA-3' (SEC ID N° 13) Inv: 5'-GTCCACTCCTGCGGTTCT-3' (SEC ID N° 14)
"PAT/pat"	Dir: 5'-CCGCGTTTGTGATATCGTT-3' (SEC ID N° 15) Inv: 5'-TCTTGCAACCTCTCTAGATCATCAA-3' (SEC ID N° 16)
"CP4-EPSPS"	Dir: 5' GCATGCTTCACGGTGCAA 3' (SEC ID N° 22) Inv: 5' GGACCTGTGGGAGATAGACTTGTC 3' (SEC ID N° 23) Inv 1: 5' TGAAGGACCGGTGGGAGAT 3' (SEC ID N° 62) Inv 2: 5' TGAAGGACCTGTGGGAGAT 3' (SEC ID N° 63)
"Or"	Dir: 5' GCTTAGGGAACAGGGAAGTAAAGT 3' (SEC ID N° 51) Inv: 5' CTTAGCATAGTCTGTGCCATCCA 3' (SEC ID N° 21)
"Bv"	Dir: 5' GACCTCCATATTAAGGAAAG 3' (SEC ID N° 64) Inv: 5' GAGTAATTGCTCCATCCTGTTCA 3' (SEC ID N° 65)
"Gs"	Dir: 5' AGTTTGTAGGTTTGTATGTTACATTGAG 3' (SEC ID N° 66) Inv: 5' GCATCTTTGAACCGCCTACTG 3' (SEC ID N° 67)
"St"	Dir: 5' GGACATGTGAAGAGACGGAGC 3' (SEC ID N° 68) Inv: 5' CCTACCTCTACCCCTCCGC 3' (SEC ID N° 69)

- 15 (ii). El método según (i) anterior, en el cual la etapa (1) implica detectar la presencia o ausencia en la muestra de ácidos nucleicos que comprenden todos los ácidos nucleicos enumerados en a) - c) y d) -i).
- (iii). El método según uno cualquiera de (i) o (ii) anteriores, en el cual la amplificación por PCR de dos o más de los ácidos nucleicos es combinada.
- 20 (iv). El método según uno cualquiera de (i) a (iii) anteriores, en el cual los cebadores o pares de cebadores están marcados para permitir la detección.
- (v). El método según cualquiera de (i) a (iv) anteriores,
- en el cual la etapa (1) comprende adicionalmente detectar la presencia o ausencia en la muestra de ácido nucleico j) "mCry3A": un ácido nucleico derivado del gen modificado de la proteína cristal *Cry3A* de *Bacillus thuringiensis*; y/o
  - en el cual la etapa (1) comprende adicionalmente detectar la presencia o ausencia en la muestra de uno de o ambos ácidos nucleicos k) "cordapA": un ácido nucleico derivado del gen de la dihidrodipicolinato sintasa insensible a lisina (cDHDPS) *cordapA* de *Corynebacterium glutamicum* y/o l) "Glb1": un ácido nucleico derivado del promotor *Glb1* de maíz; y/o
  - en el cual la etapa (1) comprende adicionalmente detectar la presencia o ausencia en la muestra de ácido nucleico m) "Cry3Bb1": un ácido nucleico derivado del gen de la proteína cristal *Cry3Bb1* de *Bacillus thuringiensis*; y/o
- 35

- en el cual la etapa (1) comprende adicionalmente detectar la presencia o ausencia en la muestra de ácido nucleico n) "Bxn": un ácido nucleico derivado del gen de la nitrilasa *Bxn* de *Klebsiella pneumoniae* ssp. *ozaenae*; y/o
- 5 - en el cual la etapa (1) comprende adicionalmente detectar la presencia o ausencia en la muestra de uno de o ambos ácidos nucleicos r) "Cry1Ac": un ácido nucleico derivado del gen de la proteína cristal *Cry1Ac* de *Bacillus thuringiensis* y/o s) "Cry2Ab2": un ácido nucleico derivado del gen de la proteína cristal *Cry2Ab2* de *Bacillus thuringiensis*; y/o
- 10 - en el cual la etapa (1) comprende adicionalmente detectar la presencia o ausencia en la muestra de ácido nucleico u) "GBSS": un ácido nucleico derivado del gen de la sintasa de almidón unido a gránulo *Gbss* de *Solanum tuberosum*.

(vi). El método según cualquiera de (i) a (v) anteriores, en el cual la etapa (1) comprende adicionalmente detectar la presencia o ausencia en la muestra de un ácido nucleico genérico derivado de plantas, preferentemente derivado de la subunidad pequeña de cloroplastos del gen de la Rubisco o del gen de la CHL-ARNt sintetasa, más preferentemente en el cual la presencia o ausencia de dicho ácido nucleico genérico derivado de plantas se detecta usando amplificación por PCR, preferentemente amplificación por PCR a tiempo real, usando el par de cebadores 5' AGGTCTAADGGRTAAGCTAC 3' (SEC ID N° 26) y 5' AGYCTTGATCGTTACAAAGG 3' (SEC ID N° 27), o variante que muestra al menos un 85% de identidad de secuencia con dicho par de cebadores, opcionalmente en el cual el cebador o par de cebadores está marcado para permitir la detección.

(vii). El método según cualquiera de (i) a (vi) anteriores, en el cual los productos de amplificación se detectan usando un método de detección que es sustancialmente no específico de secuencia, preferentemente usando un colorante fluorescente de unión a ADN, más preferentemente usando SYBR Green o PicoGreen, o en el cual los productos de amplificación se detectan mediante un marcador de fluoróforo presente en al menos un cebador del par de cebadores, tal como usando tecnología Light Upon Extension (LUX™).

(viii). El método según cualquiera de (i) a (vii) anteriores, en el cual la muestra comprende plantas o partes de las mismas, incluyendo flores, tépalos, pétalos, sépalos, anteras, polen, semillas, frutos, pericarpio, vainas, hojas, peciolos, tallos, raíces, rizomas, estolones, tubérculos o brotes, o partes de los mismos, células vegetales, protoplastos vegetales y/o tejidos vegetales, y/o material derivado de plantas, preferentemente material para alimentos o pienso, incluyendo material procesado para alimentos o pienso.

(ix). El método según cualquiera de (i) a (viii) anteriores, en el cual en la etapa (1) la presencia o ausencia de ácidos nucleicos en una muestra se detecta usando amplificación por PCR, preferentemente amplificación por PCR a tiempo real, usando los respectivos pares de cebadores de la siguiente tabla, o variantes que muestran al menos un 85% de identidad de secuencia con dichos pares de cebadores:

"Zm"	Dir: 5' CgTCgTTTCCCATCTCTTCTCC 3' (SEC ID N° 1) Inv: 5' CCACTCCgAgACCCTCAgTC 3' (SEC ID N° 2)
"Zm"	Dir: 5' TCTCTTCTCCTTTAGAGCTACCACTA 3' (SEC ID N° 56) Inv: 5' AATCGATCCAAAGCGAGATGA 3' (SEC ID N° 57)
"Bn"	Dir1: 5' GAGAATGAGGAGGACCAAGCTC 3' (SEC ID N° 4) Dir2: 5'GGTGAGCTGTATAATCGAGCGA 3' (SEC ID N° 79) Inv: 5' GGCGCAGCATCGGCT 3' (SEC ID N° 3)
"Bn"	Dir: 5' CAGCTCAACAGTTTCCAAACGA 3' (SEC ID N° 24) Inv: 5' CGACCAGCCTCAGCCTTAAG 3' (SEC ID N° 25)
"Gm"	Dir: 5' CATTACCTATgATgCCTCCACC 3' (SEC ID N° 5) Inv: 5' AAgCACgTCATgCgATTCC 3' (SEC ID N° 6) Inv': 5' AAgCACgTCATgCgATTCC 3' (SEC ID N° 49)
"Gm"	Dir: 5' AACCGGTAGCGTTGCCAG 3' (SEC ID N° 58) Inv': 5' AGCCCATCTGCAAGCCTTT 3' (SEC ID N° 59)
"p35S"	Dir: 5'-GACAGTGGTCCCAAAGATGG-3' (SEC ID N° 7) Inv: 5'-GTCTTGCGAAGGATAGTGGG-3' (SEC ID N° 8)
"p35S"	Dir: 5' AAAGCAAGTGGATTGATGTGATA 3' (SEC ID N° 60) Inv: 5' GGGTCTTGCGAAGGATAGTG 3' (SEC ID N° 61)
"tNOS"	Dir: 5'-GATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAA-3' (SEC ID N° 9) Inv: 5'-TTATCCTAGKTTGCGCGCTATATTT-3' (SEC ID N° 10)
"tNOS"	Dir: 5' CGTTCAAACATTTGGCAATAAAG 3' (SEC ID N° 28) Inv: 5' AAATGTATAATTGCGGGACTCTAATC 3' (SEC ID N° 29)
"Cry1Ab"	Dir: 5'-ACCGGTTACTCCCATCGA-3' (SEC ID N° 11) Inv: 5'-CAGCACCTGGCACGAATC-3' (SEC ID N° 12)
"Cry1Ab"	Dir: 5' GACATCATCTGGGGYATCTT 3' (SEC ID N° 30) Inv: 5' CGCTGTTTCATGTCGTTGAA 3' (SEC ID N° 31)
"Cry1Ab"	Dir: 5' ACGCCTTCTGGTGCAA 3' (SEC ID N° 47) Inv: 5' CCTGGTTCCTGGCGAACTC 3' (SEC ID N° 48)

"PAT/bar"	Dir: 5'-CGTCAACCACTACATCGAGACAA-3' (SEC ID N° 13) Inv: 5'-GTCCACTCCTGCGGTTCT-3' (SEC ID N° 14)
"PAT/pat"	Dir: 5'-CCGCGGTTTGTGATATCGTT-3' (SEC ID N° 15) Inv: 5'-TCTTGAACCTCTCTAGATCATCAA-3' (SEC ID N° 16)
"CP4-EPSPS"	Dir1: 5'-GGCTCTGAGCTTCGTCCTCCTAAGG-3' (SEC ID N° 17) Dir1': 5'-GGCTCTGAGCTTCGTCCTCCTAAGG-3' (SEC ID N° 50) Dir2: 5'-ATCAGTGGCTACAGCCTGCAT-3' (SEC ID N° 18) Inv: 5'-GAATGCGGACGGTTCGGAAAG-3' (SEC ID N° 19)
"CP4-EPSPS"	Dir: 5' GCATGCTTCACGGTGCAA 3' (SEC ID N° 22) Inv: 5' GGACCTGTGGGAGATAGACTTGTC 3' (SEC ID N° 23) Inv 1: 5' TGAAGGACCGGTGGGAGAT 3' (SEC ID N° 62) Inv 2: 5' TGAAGGACCTGTGGGAGAT 3' (SEC ID N° 63)
"Or"	Dir: 5' GCTTAGGGAACAGGGAAGTAAAGT 3' (SEC ID N° 20) Dir': 5' GCTTAGGGAACAGGGAAGTAAAGT 3' (SEC ID N° 51) Inv: 5' CTTAGCATAGTCTGTGCCATCCA 3' (SEC ID N° 21)
"Bv"	Dir: 5' GACCTCCATATTACTGAAAGGAAG 3' (SEC ID N° 64) Inv: 5' GAGTAATTGCTCCATCCTGTTC 3' (SEC ID N° 65)
"Gs"	Dir: 5' AGTTTGTAGGTTTTGATGTTACATTGAG 3' (SEC ID N° 66) Inv: 5' GCATCTTTGAACCGCCTACTG 3' (SEC ID N° 67)
"St"	Dir: 5' GGACATGTGAAGAGACGGAGC 3' (SEC ID N° 68) Inv: 5' CCTACCTTACCCCTCCGC 3' (SEC ID N° 69)
Planta genérica	Dir: 5' AGGTCTAADGGRTAAGCTAC 3' (SEC ID N° 26) Inv: 5' AGYCTTGATCGTTACAAAGG 3' (SEC ID N° 27)

(x). El método según cualquiera de (i) a (ix) anteriores, en el cual la etapa (2) comprende las etapas de:

- (i) definir un conjunto de ácidos nucleicos, mencionado como conjunto "G<sub>SAM</sub>", que consiste en ácidos nucleicos detectados en la etapa (1) como presentes en la muestra;
- (ii) definir uno o más conjuntos de ácidos nucleicos, mencionados como conjunto "G<sub>X</sub>", elegidos entre el grupo de conjuntos que comprenden o consisten en conjuntos "G<sub>Bt176</sub>", "G<sub>Bt11</sub>", "G<sub>Bt10</sub>", "G<sub>MON810</sub>", "G<sub>MON863</sub>", "G<sub>TC1507</sub>", "G<sub>NK603</sub>", "G<sub>T25</sub>", "G<sub>GA21</sub>", "G<sub>DAS-59122</sub>", "G<sub>MIR604</sub>", "G<sub>LY038</sub>", "G<sub>MON88017</sub>", "G<sub>Topas 19/2</sub>", "G<sub>MS1</sub>", "G<sub>RF1</sub>", "G<sub>RF2</sub>", "G<sub>MS1/RF1</sub>", "G<sub>MS1/RF2</sub>", "G<sub>MS8</sub>", "G<sub>RF3</sub>", "G<sub>MS8/RF3</sub>", "G<sub>GT73</sub>", "G<sub>T45</sub>", "G<sub>Liberator pHoe6/Ac</sub>", "G<sub>GS40/90pHoe6/Ac</sub>", "G<sub>OXY235</sub>", "G<sub>MON40-3-2</sub>", "G<sub>MON89788</sub>", "G<sub>A2704-12</sub>", "G<sub>A5547-127</sub>", "G<sub>LL62</sub>", "G<sub>LL06</sub>", "G<sub>LL601</sub>", "G<sub>T120-7</sub>", "G<sub>H7-1</sub>", "G<sub>A5-15</sub>", "G<sub>LL cotton 25</sub>", "G<sub>MON1445</sub>", "G<sub>MON531</sub>", "G<sub>MON15985</sub>" y "G<sub>EH92-527-1</sub>"; correspondientes a uno o más eventos de plantas transgénicas respectivos de interés ("X") elegidos entre el grupo que comprende o que consiste en eventos Bt176, Bt11, Bt10, MON810, MON863, TC1507, NK603, T25, GA21, DAS-59122, MIR604, LY038, MON88017, Topas 19/2, MS1, RF1, RF2, MS1/RF1, MS1/RF2, MS8, RF3, MS8/RF3, GT73, T45, Liberator pHoe6/Ac, GS40/90pHoe6/Ac, OXY235; MON40-3-2, MON89788, A2704-12, A5547-127, LL62, LL06, LL601, T120-7, H7-1, A5-15, LL cotton 25, MON1445, MON531, MON15985 y EH92-527-1, en los cuales:

- G<sub>Bt176</sub> ∈ {Zm; p35S; Cry1Ab; PAT/bar},
- G<sub>Bt11</sub> ∈ {Zm; p35S; tNOS; Cry1Ab; PAT/pat},
- G<sub>Bt10</sub> ∈ {Zm; p35S; tNOS; Cry1Ab; PAT/pat},
- G<sub>MON810</sub> ∈ {Zm; p35S; tNOS; Cry1Ab},
- G<sub>MON863</sub> ∈ {Zm; p35S; tNOS},
- G<sub>TC1507</sub> ∈ {Zm; p35S; PAT/pat},
- G<sub>NK603</sub> ∈ {Zm; p35S; tNOS; CP4-EPSPS},
- G<sub>T25</sub> ∈ {Zm; p35S; PAT/pat},
- G<sub>GA21</sub> ∈ {Zm; tNOS},
- G<sub>DAS-59122</sub> ∈ {Zm; p35S; PAT/bar},
- G<sub>MIR604</sub> ∈ {Zm; tNOS; mCry3A}, o G<sub>MIR604</sub> ∈ {Zm; tNOS}
- G<sub>LY038</sub> ∈ {Zm; p35S; tNOS; cordapA; G1b1}, o G<sub>LY038</sub> ∈ {Zm; p35S; tNOS},
- G<sub>MON88017</sub> ∈ {Zm; p35S; tNOS; CP4-EPSPS; Cry3Bb1}, o G<sub>MON88017</sub> ∈ {Zm; p35S; tNOS; CP4-EPSPS},
- G<sub>Topas 19/2</sub> ∈ {Bn; p35S; PAT/pat},
- G<sub>MS1</sub> ∈ {Bn; tNOS; PAT/bar},
- G<sub>RF1</sub> ∈ {Bn; tNOS; PAT/bar},
- G<sub>RF2</sub> ∈ {Bn; tNOS; PAT/bar},
- G<sub>MS1/RF1</sub> ∈ {Bn; tNOS; PAT/bar},
- G<sub>MS1/RF2</sub> ∈ {Bn; tNOS; PAT/bar},
- G<sub>MS8</sub> ∈ {Bn; tNOS; PAT/bar},
- G<sub>RF3</sub> ∈ {Bn; tNOS; PAT/bar},
- G<sub>MS8/RF3</sub> ∈ {Bn; tNOS; PAT/bar},
- G<sub>GT73</sub> ∈ {Bn; CP4-EPSPS},

- $G_{T45} \in \{Bn; p35S; PAT/pat\}$ ,
- $G_{Liberator\ pHoe6/Ac} \in \{Bn; p35S; PAT/pat\}$ ,
- $G_{GS40/90pHoe6/Ac} \in \{Bn; p35S; PAT/pat\}$ ,
- $G_{OXY235} \in \{Bn; p35S; Bxn\}$ , o  $G_{OXY235} \in \{Bn; p35S\}$ ;
- 5 -  $G_{MON40-3-2} \in \{Gm; p35S; tNOS; CP4-EPSPS\}$ ,
- $G_{MON89788} \in \{Gm; CP4-EPSPS\}$
- $G_{A2704-12} \in \{Gm; p35S; PAT/pat\}$ ,
- $G_{A5547-127} \in \{Gm; p35S; PAT/pat\}$ ,
- 10 -  $G_{LL62} \in \{Or; p35S; PAT/bar\}$ ,
- $G_{LL06} \in \{Or; p35S; PAT/bar\}$
- $G_{LL601} \in \{Or; p35S; tNOS; PAT/bar\}$ ,
- $G_{T120-7} \in \{Bv; p35S; PAT/pat\}$ ,
- $G_{H7-1} \in \{Bv; p35S; CP4-EPSPS\}$ ,
- $G_{A5-15} \in \{Bv; p35S; tNOS; CP4-EPSPS\}$ ,
- 15 -  $G_{LL\ cotton\ 25} \in \{Gs; p35S; tNOS; PAT/bar\}$ ,
- $G_{MON1445} \in \{Gs; p35S; tNOS; CP4-EPSPS\}$ ,
- $G_{MON531} \in \{Gs; p35S; tNOS; cry1Ac\}$ , o  $G_{MON531} \in \{Gs; p35S; tNOS\}$
- $G_{MON15985} \in \{Gs; p35S; tNOS; cry1Ac; cry2Ab2\}$  o  $G_{MON15985} \in \{Gs; p35S; tNOS\}$ , y
- $G_{EH92-527-1} \in \{St; tNOS; Gbss\}$  o  $G_{EH92-527-1} \in \{St; tNOS\}$ ;

(iii) realizar para cada conjunto de interés  $G_X$  operaciones lógicas:

- si  $G_X$  es igual a  $G_{SAM}$  ( $G_X = G_{SAM}$ ), entonces el material derivado del evento de planta transgénica  $X$  o de un cruce del mismo, o de un evento relacionado con el mismo, está potencialmente presente en la muestra;
- 25 - si  $G_X$  es un subconjunto apropiado de  $G_{SAM}$  ( $G_X \subset G_{SAM}$ ), entonces el material derivado del evento de planta transgénica  $X$  o de un cruce del mismo, o de un evento relacionado con el mismo, está potencialmente presente en la muestra;
- si  $G_X$  no es igual a  $G_{SAM}$  y  $G_X$  no es un subconjunto apropiado de  $G_{SAM}$ , ( $G_X \neq G_{SAM}$  y  $G_X \not\subset G_{SAM}$ ), entonces el material derivado del evento de planta transgénica  $X$  o de un cruce del mismo, o de un evento relacionado con el mismo, está ausente de la muestra.

(xi). Un método para examinar una muestra para la presencia o ausencia de material derivado de uno o más eventos de plantas transgénicas que comprende las etapas de:

(1) detectar la presencia o ausencia en la muestra de ácidos nucleicos que comprende:

- 35 - uno, más de uno o todos los ácidos nucleicos elegidos entre:
  - a) "Zm": un ácido nucleico derivado de y específico para el taxón *Zea mays*, preferentemente *Zea mays* ssp. *mays*,
  - 40 b) "Bn": un ácido nucleico derivado de y específico para el taxón *Brassica napus*,
  - c) "Gm": un ácido nucleico derivado de y específico para el taxón *Glycine max*,
  - o) "Or": un ácido nucleico derivado de y específico para el taxón *Oryza sativa*,
  - p) "Bv": un ácido nucleico derivado de y específico para el taxón *Beta vulgaris*,
  - q) "Gs": un ácido nucleico derivado de y específico para el taxón *Gossypium*, y
  - 45 t) "St": un ácido nucleico derivado de y específico para el taxón *Solanum tuberosum*;
- uno, más de uno o todos los ácidos nucleicos elegidos entre:
  - d) "p35S": un ácido nucleico derivado del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor,
  - 50 e) "tNOS": un ácido nucleico derivado del terminator 3' del gen de la nopalina sintetasa de *Agrobacterium tumefaciens*,
  - f) "Cry1Ab": un ácido nucleico derivado del gen de la proteína cristal *Cry1Ab* de *Bacillus thuringiensis*,
  - g) "PAT/bar": un ácido nucleico derivado del gen de la fosfinotricina acetiltransferasa (PAT) *bar* de *Streptomyces hygroscopicus*,
  - 55 h) "PAT/pat": un ácido nucleico derivado del gen de la fosfinotricina acetiltransferasa (PAT) *pat* de *Streptomyces viridochromogenes*, y
  - i) "CP4-EPSPS": un ácido nucleico derivado del gen de la 5-enol-piruvilshikimato-3-fosfato sintasa *EPSPS* de *Agrobacterium* sp. CP4; y
- 60 - opcionalmente, uno, más de uno o todos los ácidos nucleicos elegidos entre:
  - j) "mCry3A": un ácido nucleico derivado del gen modificado de la proteína cristal *Cry3A* de *Bacillus thuringiensis*,

k) "cordapA": un ácido nucleico derivado del gen de la dihidrodipicolinato sintasa insensible a lisina (cDHDPS) *cordapA* de *Corynebacterium glutamicum*,

l) "Glb1": un ácido nucleico derivado del promotor Glb1 de maíz,

m) "Cry3Bb1": un ácido nucleico derivado del gen de la proteína cristal *Cry3Bb1* de *Bacillus thuringiensis*,

n) "Bxn": un ácido nucleico derivado del gen de la nitrilasa *Bxn* de *Klebsiella pneumoniae* ssp. *ozaenae*,

r) "Cry1Ac": un ácido nucleico derivado del gen de la proteína cristal *Cry1Ac* de *Bacillus thuringiensis*,

s) "Cry2Ab2": un ácido nucleico derivado del gen de la proteína cristal *Cry2Ab2* de *Bacillus thuringiensis*, y

u) "GBSS": un ácido nucleico derivado del gen de la sintasa de almidón unido a gránulo *Gbss* de *Solanum tuberosum*; y

(2) concluir la presencia o ausencia en la muestra de material derivado de uno o más eventos de plantas transgénicas de interés elegidos entre el grupo que comprende: eventos Bt176, Bt11, Bt10, MON810, MON863, TC1507, NK603, T25, GA21, DAS-59122, MIR604, LY038, MON88017, cruces de los mismos, y eventos relacionados de los mismos; eventos Topas 19/2, MS1, RF1, RF2, RF3, MS8, GT73, T45, Liberator pHoe6/Ac, GS40/90pHoe6/Ac, OXY235, cruces de los mismos incluyendo MS1/RF1, MS1/RF2, MS8/RF3, y eventos relacionados de los mismos; eventos MON 40-3-2, MON89788, A2704-12, A5547-127, cruces de los mismos, y eventos relacionados de los mismos, eventos LL62, LL06 y LL601, cruces de los mismos, y eventos relacionados de los mismos; eventos T120-7, H7-1 y A5-15, cruces de los mismos, y eventos relacionados de los mismos; eventos LL cotton 25, MON 1445, MON 531, MON15985, cruces de los mismos, y eventos relacionados de los mismos; y evento EH92-527-1 y eventos relacionados del mismo, en el cual dichos eventos relacionados se han generado introduciendo en el mismo taxón que el del evento con el cual están relacionados la misma construcción transformante que la del evento con el cual están relacionados;

en el cual en la etapa (1) la presencia o ausencia de ácidos nucleicos en una muestra se detecta usando amplificación por PCR, preferentemente amplificación por PCR a tiempo real, usando los respectivos pares de cebadores de la siguiente tabla, o variantes que muestran al menos un 85% de identidad de secuencia con dichos pares de cebadores:

"Zm"	Dir: 5' TCTCTTCCTCCTTTAGAGCTACCACTA 3' (SEC ID N° 56) Inv: 5' AATCGATCCAAAGCGAGATGA 3' (SEC ID N° 57)
"Bn"	Dir: 5' CAGCTCAACAGTTTCCAAACGA 3' (SEC ID N° 24) Inv: 5' CGACCAGCCTCAGCCTTAAG 3' (SEC ID N° 25)
"Gm"	Dir: 5' AACCGGTAGCGTTGCCAG 3' (SEC ID N° 58) Inv: 5' AGCCCATCTGCAAGCCTTT 3' (SEC ID N° 59)
"p35S"	Dir: 5' AAAGCAAGTGGATTGATGTGATA 3' (SEC ID N° 60) Inv: 5' GGGTCTTGCGAAGGATAGTG 3' (SEC ID N° 61)
"tNOS"	Dir: 5'-GATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAA-3'(SEC ID N° 9) Inv: 5'-TTATCCTAGKTTGCGCGCTATATTT-3' (SEC ID N° 10)
"Cry1Ab"	Dir: 5'-ACCGGTTACTCCTCCATCGA-3' (SEC ID N° 11) Inv: 5'-CAGCACCTGGCAGCAACTC-3' (SEC ID N° 12)
"PAT/bar"	Dir: 5'-CGTCAACCACTACATCGAGACAA-3' (SEC ID N° 13) Inv: 5'-GTCCAACCTCTGCGGTTCT-3' (SEC ID N° 14)
"PAT/pat"	Dir: 5'-CCGCGGTTTGTGATATCGTT-3' (SEC ID N° 15) Inv: 5'-TCTTGCAACCTCTCTAGATCATCAA-3' (SEC ID N° 16)
"CP4-EPSPS"	Dir: 5' GCATGCTTACGGTGCAA 3' (SEC ID N° 22) Inv: 5' GGACCTGTGGGAGATAGACTTGTC 3' (SEC ID N° 23) Inv 1: 5' TGAAGGACCGGTGGGAGAT 3' (SEC ID N° 62) Inv 2: 5' TGAAGGACCTGTGGGAGAT 3' (SEC ID N° 63)
"Or"	Dir: 5' GCTTAGGGAACAGGGAAGTAAAGT 3' (SEC ID N° 51) Inv: 5' CTTAGCATAGTCTGTGCCATCCA 3' (SEC ID N° 21)
"Bv"	Dir: 5' GACCTCCATATTACTGAAAGGAAG 3' (SEC ID N° 64) Inv: 5' GAGTAATTGCTCCATCCTGTTCA 3' (SEC ID N° 65)
"Gs"	Dir: 5' AGTTTGTAGTTTTGATGTTACATTGAG 3' (SEC ID N° 66) Inv: 5' GCATCTTTGAACCGCCTACTG 3' (SEC ID N° 67)
"St"	Dir: 5' GGACATGTGAAGAGACGGAGC 3' (SEC ID N° 68) Inv: 5' CCTACCTCTACCCCTCCGC 3' (SEC ID N° 69)

y en el cual la etapa (2) comprende las etapas de:



(i) asignar a ácidos nucleicos elegidos entre el grupo que comprende o que consiste en "Zm", "Bn", "Gm", "p35S", "tNOS", "Cry1Ab", "PAT/bar", "PAT/pat", "CP4-EPSPS", "mCry3A", "cordap A", "Glb1", "Cry3Bb1", "Bxn", "Or", "Bv", "Gs", "Cry1Ac", "Cry2ab2", "St" y "Gbss" valores primos únicos "V<sub>Zm</sub>", "V<sub>Bn</sub>", "V<sub>Gm</sub>", "V<sub>p35S</sub>", "V<sub>tNOS</sub>", "V<sub>Cry1Ab</sub>", "V<sub>PAT/bar</sub>", "V<sub>PAT/pat</sub>", "V<sub>CP4-EPSPS</sub>", "V<sub>mCry3A</sub>", "V<sub>cordapA</sub>", "V<sub>Glb1</sub>", "V<sub>Cry3Bb1</sub>", "V<sub>Bxn</sub>", "V<sub>Or</sub>", "V<sub>Bv</sub>", "V<sub>Gs</sub>", "V<sub>Cry1Ac</sub>", "V<sub>Cry2ab2</sub>", "V<sub>st</sub>" y "V<sub>Gbss</sub>", respectivamente,

(ii) asignar a cada evento de planta transgénica de interés ("X") un valor "VG<sub>X</sub>" elegido entre el grupo que comprende o que consiste en valores "VG<sub>Bt176</sub>", "VG<sub>Bt11</sub>", "VG<sub>Bt10</sub>", "VG<sub>MON810</sub>", "VG<sub>MON863</sub>", "VG<sub>TC1507</sub>", "VG<sub>NK603</sub>", "VG<sub>T25</sub>", "VG<sub>GA21</sub>", "VG<sub>DAS-59122</sub>", "VG<sub>MIR604</sub>", "VG<sub>LY038</sub>", "VG<sub>MON88017</sub>", "VG<sub>Topas 19/2</sub>", "VG<sub>MS1</sub>", "VG<sub>RF1</sub>", "VG<sub>RF2</sub>", "VG<sub>MS1/RF1</sub>", "VG<sub>MS1/RF2</sub>", "VG<sub>MS8</sub>", "VG<sub>RF3</sub>", "VG<sub>MS8/RF3</sub>", "VG<sub>GT73</sub>", "VG<sub>T45</sub>", "VG<sub>LiberatorpHoe6/Ac</sub>", "VG<sub>GS40/90pHoe6/Ac</sub>", "VG<sub>GOXY235</sub>", "VG<sub>MON40-3-2</sub>", "VG<sub>MON89788</sub>", "VG<sub>A2704-12</sub>", "VG<sub>A5547-127</sub>", "VG<sub>LL62</sub>", "VG<sub>LL06</sub>", "VG<sub>LL601</sub>", "VG<sub>T120-7</sub>", "VG<sub>H7-1</sub>", "VG<sub>A5-15</sub>", "VG<sub>LLcotton25</sub>", "VG<sub>MON1445</sub>", "VG<sub>MON531</sub>", "VG<sub>MON15985</sub>" y "VG<sub>EH92-527-1</sub>", en los cuales:

- VG<sub>Bt176</sub> = V<sub>Zm</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>Cry1Ab</sub> X V<sub>PAT/bar</sub>,
- VG<sub>Bt11</sub> = V<sub>Zm</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>tNOS</sub> X V<sub>Cry1Ab</sub> X V<sub>PAT/pat</sub>,
- VG<sub>Bt10</sub> = V<sub>Zm</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>tNOS</sub> X V<sub>Cry1Ab</sub> X V<sub>PAT/pat</sub>,
- VG<sub>MON810</sub> = V<sub>Zm</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>tNOS</sub> X V<sub>Cry1Ab</sub>,
- VG<sub>MON863</sub> = V<sub>Zm</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>tNOS</sub>,
- VG<sub>TC1507</sub> = V<sub>Zm</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>PAT/pat</sub>,
- VG<sub>NK603</sub> = V<sub>Zm</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>tNOS</sub> X V<sub>CP4-EPSPS</sub>,
- VG<sub>T25</sub> = V<sub>Zm</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>PAT/pat</sub>,
- VG<sub>GA21</sub> = V<sub>Zm</sub> X V<sub>tNOS</sub>,
- VG<sub>DAS-59122</sub> = V<sub>Zm</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>PAT/bar</sub>,
- VG<sub>MIR604</sub> = V<sub>Zm</sub> X V<sub>tNOS</sub> X V<sub>mCry3A</sub>, o VG<sub>MIR604</sub> = V<sub>Zm</sub> X V<sub>tNOS</sub>,
- VG<sub>LY038</sub> = V<sub>Zm</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>tNOS</sub> X V<sub>cordapA</sub> X V<sub>Glb1</sub> o VG<sub>LY038</sub> = V<sub>Zm</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>tNOS</sub>,
- VG<sub>MON88017</sub> = V<sub>Zm</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>tNOS</sub> X V<sub>CP4-EPSP</sub> X V<sub>Cry3Bb1</sub>, o VG<sub>MON88017</sub> = V<sub>Zm</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>tNOS</sub> X V<sub>CP4-EPSP</sub>,
- VG<sub>Topas 19/2</sub> = V<sub>Bn</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>PAT/pat</sub>,
- VG<sub>MS1</sub> = V<sub>Bn</sub> X V<sub>tNOS</sub> X V<sub>PAT/bar</sub>,
- VG<sub>RF1</sub> = V<sub>Bn</sub> X V<sub>tNOS</sub> X V<sub>PAT/bar</sub>,
- VG<sub>RF2</sub> = V<sub>Bn</sub> X V<sub>tNOS</sub> X V<sub>PAT/bar</sub>,
- VG<sub>MS8</sub> = V<sub>Bn</sub> X V<sub>tNOS</sub> X V<sub>PAT/bar</sub>,
- VG<sub>RF3</sub> = V<sub>Bn</sub> X V<sub>tNOS</sub> X V<sub>PAT/bar</sub>,
- VG<sub>MS1/RF1</sub> = V<sub>Bn</sub> X V<sub>tNOS</sub> X V<sub>PAT/bar</sub>,
- VG<sub>MS1/RF2</sub> = V<sub>Bn</sub> X V<sub>tNOS</sub> X V<sub>PAT/bar</sub>,
- VG<sub>MS8/RF3</sub> = V<sub>Bn</sub> X V<sub>tNOS</sub> X V<sub>PAT/bar</sub>,
- VG<sub>GT73</sub> = V<sub>Bn</sub> X V<sub>CP4-EPSPS</sub>,
- VG<sub>T45</sub> = V<sub>Bn</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>PAT/pat</sub>,
- VG<sub>LiberatorpHoe6/Ac</sub> = V<sub>Bn</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>PAT/pat</sub>,
- VG<sub>GS40/90pHoe6/Ac</sub> = V<sub>Bn</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>PAT/pat</sub>,
- VG<sub>GOXY235</sub> = V<sub>Bn</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>Bxn</sub>, o VG<sub>GOXY235</sub> = V<sub>Bn</sub> X V<sub>p35S</sub>,
- VG<sub>MON40-3-2</sub> = V<sub>Gm</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>tNOS</sub> X V<sub>CP4-EPSPS</sub>,
- VG<sub>MON89788</sub> = V<sub>Gm</sub> X V<sub>CP4-EPSPS</sub>,
- VG<sub>2704-12</sub> = V<sub>Gm</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>PAT/pat</sub>,
- VG<sub>A5547-127</sub> = V<sub>Gm</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>PAT/pat</sub>,
- VG<sub>LL62</sub> = V<sub>Or</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>PAT/bar</sub>,
- VG<sub>LL06</sub> = V<sub>Or</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>PAT/bar</sub>,
- VG<sub>LL601</sub> = V<sub>Or</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>tNOS</sub> X V<sub>PAT/bar</sub>,
- VG<sub>T120-7</sub> = V<sub>Bv</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>PAT/pat</sub>,
- VG<sub>H7-1</sub> = V<sub>Bv</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>CP4-EPSPS</sub>,
- VG<sub>A5-15</sub> = V<sub>Bv</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>tNOS</sub> X V<sub>CP4-EPSPS</sub>,
- VG<sub>LL cotton 25</sub> = V<sub>Gs</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>tNOS</sub> X V<sub>PAT/bar</sub>,
- VG<sub>MON1445</sub> = V<sub>Gs</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>tNOS</sub> X V<sub>CP4-EPSPS</sub>,
- VG<sub>MON531</sub> = V<sub>Gs</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>tNOS</sub> X V<sub>Cry1Ac</sub>, o VG<sub>MON531</sub> = V<sub>Gs</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>tNOS</sub>,
- VG<sub>MON15985</sub> = V<sub>Gs</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>tNOS</sub> X V<sub>Cry1Ac</sub> X V<sub>Cry2Ab2</sub>, o VG<sub>MON15985</sub> = V<sub>Gs</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>tNOS</sub>,
- y VG<sub>EH92-527-1</sub> = V<sub>St</sub> X V<sub>tNOS</sub> X V<sub>Gbss</sub>, o VG<sub>EH92-527-1</sub> = V<sub>St</sub> X V<sub>tNOS</sub>,

(iii) proporcionar un valor "VG<sub>SAM</sub>" que es un múltiplo de los valores primos únicos asignados a los ácidos nucleicos detectados en la etapa (1) como presentes en la muestra,

(iv) realizar para cada evento de interés ("X") operaciones lógicas:

- si VG<sub>SAM</sub> / VG<sub>X</sub> es igual a 1, entonces el material derivado del evento de planta transgénica X o de un cruce del mismo, o de un evento relacionado con el mismo, está potencialmente presente en la muestra;
- si VG<sub>SAM</sub> / VG<sub>X</sub> es un número entero mayor de 1, entonces el material derivado del evento de planta transgénica X o de un cruce del mismo, o de un evento relacionado con el mismo, está potencialmente

- presente en la muestra;
- si  $VG_{SAM} / VG_X$  no es un número entero, entonces el material derivado del evento de planta transgénica X o de un cruce del mismo, o de un evento relacionado con el mismo, está ausente de la muestra.
- 5 **(xii)**. El método según **(xi)** anterior que incluye adicionalmente las características de uno cualquiera de **(ii)**, **(iii)**, **(iv)** o **(vi)** a **(ix)** anteriores.
- (xiii)**. Un método para determinar la presencia o ausencia de dos o más eventos, preferentemente eventos de plantas transgénicas, o material de las mismas en una muestra, en el cual cada evento se caracteriza por uno o más rasgos, que comprende las etapas de:
- 10 (1) detectar la presencia o ausencia en la muestra de dicho uno o más rasgos,  
 (2) concluir la presencia o ausencia en la muestra de dicho uno o más eventos mediante un dispositivo de computación programable, que comprende:
- 15 (a) asignar un valor numérico primo único a cada rasgo,  
 (b) representar cada evento como un producto de los valores numéricos primos asignados a rasgos característicos de dicho evento,  
 (c) representar la muestra como un producto de los valores numéricos primos asignados a rasgos detectados como presentes en la muestra, y
- 20 (d) dividir el producto que representa la muestra definido en (c) por el producto que representa un evento definido en (b), de manera que:
- si el valor obtenido por dicha división es igual a 1, entonces dicho evento o material del mismo está potencialmente presente en la muestra;
- 25 - si el valor obtenido por dicha división es un número entero mayor de 1, entonces dicho evento o material del mismo está potencialmente presente en la muestra;
- si el valor obtenido por dicha división no es un número entero, entonces dicho evento o material del mismo está ausente de la muestra.
- 30 **(xiv)**. El método según cualquiera de **(i)** a **(xii)** anteriores, en el cual la etapa (2) se realiza usando un dispositivo de computación programable.
- (xv)**. Un dispositivo de computación programable que comprende un medio adaptado para realizar la etapa (2) del método según cualquiera de **(i)** a **(xiii)** anteriores.
- (xvi)**. Un soporte de datos que comprende un programa informático adaptado para realizar la etapa (2) del método
- 35 según cualquiera de **(i)** a **(xiii)** anteriores.
- (xvii)**. Una combinación de pares de cebadores o variantes que muestran al menos un 85% de identidad de secuencia con dichos pares de cebadores, opcionalmente en la cual los cebadores o pares de cebadores están marcador para permitir la detección, que comprende:
- 40 - un par de cebadores para la amplificación de ácido nucleico d) como se define en **(i)** anterior,  
 - un par de cebadores para la amplificación de ácido nucleico e) como se define en **(i)** anterior,  
 - un par de cebadores para la amplificación de ácido nucleico f) como se define en **(i)** anterior,  
 - un par de cebadores para la amplificación de ácido nucleico g) como se define en **(i)** anterior,  
 - un par de cebadores para la amplificación de ácido nucleico h) como se define en **(i)** anterior,
- 45 - un par de cebadores para la amplificación de ácido nucleico i) como se define en **(i)** anterior, y  
 - uno, más de uno o todos los pares de cebadores seleccionados entre: un par de cebadores para la amplificación de ácido nucleico a) como se define en **(i)** anterior, un par de cebadores para la amplificación de ácido nucleico b) como se define en **(i)** anterior, un par de cebadores para la amplificación de ácido nucleico c) como se define en **(i)** anterior, un par de cebadores para la amplificación de ácido nucleico o) como se define en **(i)** anterior, un par de cebadores para la amplificación de ácido nucleico p) como se define en **(i)** anterior, un par de cebadores para la amplificación de ácido nucleico q) como se define en **(i)** anterior, y un par de cebadores para la amplificación de ácido nucleico t) como se define en **(i)** anterior,
- 50 en la cual los pares de cebadores o variantes de los mismos son como se define en **(i)** o **(ix)** anteriores, opcionalmente en la cual la combinación comprende adicionalmente un par de cebadores para la amplificación de un ácido nucleico genérico derivado de plantas como se define en **(vi)** anterior.
- 55 **(xviii)**. Un kit para examinar una muestra para la presencia potencial o ausencia de material derivado de uno o más eventos de plantas transgénicas, comprendiendo el kit una combinación de pares de cebadores o variantes que muestran al menos un 85% de identidad de secuencia con dichos pares de cebadores, opcionalmente en el cual los cebadores o pares de cebadores están marcador para permitir la detección, que comprende:
- 60 - un par de cebadores para la amplificación de ácido nucleico d) como se define en **(i)** anterior,  
 - un par de cebadores para la amplificación de ácido nucleico e) como se define en **(i)** anterior,  
 - un par de cebadores para la amplificación de ácido nucleico f) como se define en **(i)** anterior,  
 - un par de cebadores para la amplificación de ácido nucleico g) como se define en **(i)** anterior,  
 - un par de cebadores para la amplificación de ácido nucleico h) como se define en **(i)** anterior,
- 65 - un par de cebadores para la amplificación de ácido nucleico i) como se define en **(i)** anterior, y

- uno, más de uno o todos los pares de cebadores seleccionados entre: un par de cebadores para la amplificación de ácido nucleico a) como se define en (i) anterior, un par de cebadores para la amplificación de ácido nucleico b) como se define en (i) anterior, un par de cebadores para la amplificación de ácido nucleico c) como se define en (i) anterior, un par de cebadores para la amplificación de ácido nucleico o) como se define en (i) anterior, un par de cebadores para la amplificación de ácido nucleico p) como se define en (i) anterior, un par de cebadores para la amplificación de ácido nucleico q) como se define en (i) anterior, y un par de cebadores para la amplificación de ácido nucleico t) como se define en (i) anterior,

en el cual los pares de cebadores o variantes de los mismos son como se define en (i) o (ix) anteriores,

- 10 opcionalmente en el que el kit comprende adicionalmente un par de cebadores para la amplificación de un ácido nucleico genérico derivado de plantas como se define en (vi) anterior.

**[0016]** La materia proporcionada por la invención así pertenece específicamente a la divulgación, descripción, y contenido de la presente memoria.

15

**[0017]** Además, la memoria describe un método particularmente preferido (en la presente memoria método "A1") para examinar una muestra para la presencia o ausencia de material derivado de uno o más eventos de plantas transgénicas que comprende las etapas de:

- 20 (1) detectar la presencia o ausencia en la muestra de ácidos nucleicos que comprenden o que consisten en:

a) "Zm": un ácido nucleico derivado de y específico para el taxón *Zea mays*, preferentemente *Zea mays* ssp. *mays*,

b) "Bn": un ácido nucleico derivado de y específico para el taxón *Brassica napus*,

25

c) "Gm": un ácido nucleico derivado de y específico para el taxón *Glycine max*, y

uno, más de uno o todos los ácidos nucleicos elegidos entre:

d) "p35S": un ácido nucleico derivado del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor,

e) "tNOS": un ácido nucleico derivado del terminador 3' del gen de la nopalina sintetasa de *Agrobacterium tumefaciens*,

30

f) "Cry1Ab": un ácido nucleico derivado del gen de la proteína cristal *Cry1Ab* de *Bacillus thuringiensis*,

g) "PAT/bar": un ácido nucleico derivado del gen de la fosfinotricina acetiltransferasa (PAT) *bar* de *Streptomyces hygroscopicus*,

h) "PAT/pat": un ácido nucleico derivado del gen de la fosfinotricina acetiltransferasa (PAT) *pat* de *Streptomyces viridochromogenes*, y

35

i) "CP4-EPSPS": un ácido nucleico derivado del gen de la 5-enol-piruvilshikimato-3-fosfato sintasa *EPSPS* de *Agrobacterium* sp. CP4; y

(2) concluir la presencia o ausencia en la muestra de material derivado de uno o más eventos de plantas transgénicas, tales como eventos elegidos entre el grupo que comprende o que consiste en: eventos Bt176, Bt11, Bt10, MON810, MON863, TC1507, NK603, T25, GA21, DAS-59122, cruces de los mismos, y eventos relacionados de los mismos; eventos Topas 19/2, MS1, RF1, RF2, RF3, MS8, GT73, T45, Liberator pHoe6/Ac, GS40/90pHoe6/Ac, cruces de los mismos incluyendo MS1/RF1, MS1/RF2, MS8/RF3, y eventos relacionados de los mismos; eventos MON 40-3-2, MON89788, A2704-12, A5547-127, cruces de los mismos, y eventos relacionados de los mismos.

45

**[0018]** El método A1 permite investigar la presencia potencial o ausencia en una muestra de material de numerosos eventos de plantas transgénicas que pertenecen a varios taxones distintos de plantas, realizando al mismo tiempo una cantidad relativamente limitada de etapas de detección. De forma ventajosa, los eventos de plantas transgénicas detectados por el método A1 abarcan una gran fracción, o incluso sustancialmente la mayoría, de los eventos de plantas transgénicas actualmente autorizados y/o comercializados, por ejemplo, en Europa, es decir, eventos de plantas transgénicas que particularmente tienen probabilidad de encontrarse en, por ejemplo, muestras medioambientales o comerciales. Por tanto, en este método, la memoria describe un ensayo relativamente poco exigente para inspeccionar un espectro considerable de eventos relevantes de plantas transgénicas.

**[0019]** Preferentemente, la etapa (1) del método A1 puede implicar la detección de la presencia o ausencia en la muestra de ácidos nucleicos que comprenden o que consisten en todos los ácidos nucleicos enumerados en a) - i) definidos anteriormente. Esto mejora ventajosamente la información obtenida ensayando la muestra y permite concluir la presencia potencial o ausencia de material derivado de una cantidad sustancialmente elevada de eventos de plantas transgénicas.

60

**[0020]** Aunque en la etapa (2) del método A1 la detección está particularmente concebida para eventos existentes particulares de plantas transgénicas, debe apreciarse que también pueden detectarse otros eventos, incluyendo cualquier evento transgénico futuro a generar, en la medida en que pertenezcan a los taxones definidos en a) - c) y comprendan uno o más de los ácidos nucleicos definidos en d) - i). Esta observación se aplica *mutatis mutandis* a la detección de eventos en cualquier método de la memoria como se describe a continuación.

65

**[0021]** Aunque el método A1 permite examinar simultáneamente la presencia o ausencia en la muestra de eventos de plantas transgénicas que pertenecen a al menos tres taxones diferentes, el método también puede adaptarse a taxones individuales. Esto puede reducir de forma útil la cantidad de etapas de detección de ácido nucleico si se requiere información solamente para un taxón particular.

5

**[0022]** Por consiguiente, la memoria describe adicionalmente un método ("A2") para examinar una muestra para la presencia o ausencia de material derivado de uno o más eventos de plantas transgénicas de maíz que comprende las etapas de:

10 (1) detectar la presencia o ausencia en la muestra de ácidos nucleicos que comprenden o que consisten en el ácido nucleico enumerado en a) definido anteriormente y uno, más de uno o todos los ácidos nucleicos elegidos entre los enumerados en d) - i) definidos anteriormente; y

15 (2) concluir la presencia o ausencia en la muestra de material derivado de uno o más eventos de plantas transgénicas de maíz, tales como eventos elegidos entre el grupo que comprende o que consiste en eventos Bt176, Bt11, Bt10, MON810, MON863, TC1507, NK603, T25, GA21, DAS-59122, cruces de los mismos, y eventos relacionados de los mismos.

20 **[0023]** Preferentemente, la etapa (1) del método A2 puede implicar la detección de la presencia o ausencia en la muestra de ácidos nucleicos que comprenden o que consisten en todos los ácidos nucleicos enumerados en a) y d) - i) definidos anteriormente. Esto aumenta la información obtenida ensayando la muestra y permite concluir la presencia potencial o ausencia de material derivado de una cantidad comparablemente más elevada de eventos de plantas transgénicas de maíz.

25 **[0024]** La memoria describe adicionalmente un método ("A3") para examinar una muestra para la presencia o ausencia de material derivado de uno o más eventos de plantas transgénicas de colza oleaginosa que comprende las etapas de:

30 (1) detectar la presencia o ausencia en la muestra de ácidos nucleicos que comprenden o que consisten en el ácido nucleico enumerado en b) definido anteriormente y uno, más de uno o todos los ácidos nucleicos elegidos entre los enumerados en d) - i) definidos anteriormente; y

35 (2) concluir la presencia o ausencia en la muestra de material derivado de uno o más eventos de plantas transgénicas de colza oleaginosa, tales como eventos elegidos entre el grupo que comprende o que consiste en eventos Topas 19/2, MS1, RF1, RF2, RF3, MS8, GT73, T45, Liberator pHoe6/Ac, GS40/90pHoe6/Ac, cruces de los mismos incluyendo MS1/RF1, MS1/RF2, MS8/RF3 y eventos relacionados de los mismos.

40 **[0025]** Preferentemente, la etapa (1) del método A3 puede implicar la detección de la presencia o ausencia en la muestra de ácidos nucleicos que comprenden o que consisten en todos los ácidos nucleicos enumerados en b) y d) - i) definidos anteriormente. Esto aumenta la información obtenida ensayando la muestra y permite concluir la presencia potencial o ausencia de material derivado de una cantidad comparablemente más elevada de eventos de plantas transgénicas de colza oleaginosa.

45 **[0026]** En otro ejemplo preferido, la etapa (1) del método A3 implica detectar la presencia o ausencia en la muestra de ácidos nucleicos que comprenden o que consisten en el ácido nucleico enumerado en b) y d), e), y g) - i) definidos anteriormente. Se aprecia que muchos eventos de colza oleaginosa, por ejemplo, aquellos recitados específicamente en la etapa (2) del método A3, pueden no incluir el ácido nucleico enumerado en f) definido anteriormente. Por lo tanto, la omisión de dicho ácido nucleico enumerado en f) de la etapa (1) del método A3 puede reducir la cantidad de ensayos sin pérdida de información.

50

**[0027]** La memoria describe adicionalmente un método ("A4") para examinar una muestra para la presencia o ausencia de material derivado de uno o más eventos de plantas transgénicas de soja que comprende las etapas de:

55 (1) detectar la presencia o ausencia en la muestra de ácidos nucleicos que comprenden o que consisten en el ácido nucleico enumerado en c) definido anteriormente y uno, más de uno o todos los ácidos nucleicos elegidos entre los enumerados en d) - i) definidos anteriormente; y

60 (2) concluir la presencia o ausencia en la muestra de material derivado de uno o más eventos de plantas transgénicas de soja, tales como eventos elegidos entre el grupo que comprende o que consiste en eventos MON 40-3-2, MON89788, A2704-12, A5547-127, cruces de los mismos, y eventos relacionados de los mismos.

**[0028]** Preferentemente, la etapa (1) del método A4 puede implicar la detección de la presencia o ausencia en la muestra de ácidos nucleicos que comprenden o que consisten en todos los ácidos nucleicos enumerados en c) y d) - i) definidos anteriormente. Esto aumenta la información obtenida ensayando la muestra y permite concluir la presencia potencial o ausencia de material derivado de una cantidad comparablemente más elevada de eventos de

plantas transgénicas de soja.

5 **[0029]** En otro ejemplo preferido, la etapa (1) del método A4 implica la detección de la presencia o ausencia en la muestra de ácidos nucleicos que comprenden o que consisten en el ácido nucleico enumerado en c) y d), e), h) y i) definidos anteriormente. Se aprecia que muchos eventos de soja, por ejemplo, aquellos recitados específicamente en la etapa (2) del método A4, pueden no incluir ácidos nucleicos enumerados en f) y g) definidos anteriormente. Por lo tanto, la omisión de dichos ácidos nucleicos enumerados en f) y g) de la etapa (1) del método A4 puede reducir la cantidad de ensayos sin pérdida de información.

10 **[0030]** También se apreciará que métodos adicionales pueden combinar dos cualesquiera de los métodos A2 - A4 anteriores. Por ejemplo, esto puede reducir ventajosamente la cantidad de acciones de ensayo en casos donde se pretende la detección de eventos transgénicos de taxones seleccionados.

15 **[0031]** Por consiguiente, la memoria describe adicionalmente un método ("A5") para examinar una muestra para la presencia o ausencia de material derivado de uno o más eventos de plantas transgénicas de maíz y/o colza oleaginosa que comprende las etapas de:

20 (1) detectar la presencia o ausencia en la muestra de ácidos nucleicos que comprenden o que consisten en los ácidos nucleicos enumerados en a) y b) definidos anteriormente y uno, más de uno o todos los ácidos nucleicos elegidos entre los enumerados en d) - i) definidos anteriormente; y

25 (2) concluir la presencia o ausencia en la muestra de material derivado de uno o más eventos de plantas transgénicas de maíz y/o colza oleaginosa, tales como eventos elegidos entre el grupo que comprende o que consiste en eventos Bt176, Bt11, Bt10, MON810, MON863, TC1507, NK603, T25, GA21, DAS-59122, cruces de los mismos, y eventos relacionados de los mismos; y eventos Topas 19/2, MS1, RF1, RF2, RF3, MS8, GT73, T45, Liberator pHoe6/Ac, GS40/90pHoe6/Ac, cruces de los mismos incluyendo MS1/RF1, MS1/RF2, MS8/RF3 y eventos relacionados de los mismos.

30 **[0032]** Por razones aclaradas anteriormente, la etapa (1) del método A5 puede implicar preferentemente la detección de la presencia o ausencia en la muestra de ácidos nucleicos que comprenden o que consisten en todos los ácidos nucleicos enumerados en a), a) y d) - i) definidos anteriormente.

35 **[0033]** La memoria describe adicionalmente también un método ("A6") para examinar una muestra para la presencia o ausencia de material derivado de uno o más eventos de plantas transgénicas de maíz y/o soja que comprende las etapas de:

40 (1) detectar la presencia o ausencia en la muestra de ácidos nucleicos que comprenden o que consisten en los ácidos nucleicos enumerados en a) y c) definidos anteriormente y uno, más de uno o todos los ácidos nucleicos elegidos entre los enumerados en d) - i) definidos anteriormente; y

45 (2) concluir la presencia o ausencia en la muestra de material derivado de uno o más eventos de plantas transgénicas de maíz y/o soja, tales como eventos elegidos entre el grupo que comprende o que consiste en eventos Bt176, Bt11, Bt10, MON810, MON863, TC1507, NK603, T25, GA21, DAS-59122, cruces de los mismos, y eventos relacionados de los mismos; y eventos MON 40-3-2, MON89788, A2704-12, A5547-127, cruces de los mismos, y eventos relacionados de los mismos.

50 **[0034]** Por razones aclaradas anteriormente, la etapa (1) del método A6 puede implicar preferentemente la detección de la presencia o ausencia en la muestra de ácidos nucleicos que comprenden o que consisten en todos los ácidos nucleicos enumerados en a), c) y d) - i) definidos anteriormente.

**[0035]** La memoria describe adicionalmente también un método ("A7") para examinar una muestra para la presencia o ausencia de material derivado de uno o más eventos de plantas transgénicas de colza oleaginosa y/o soja que comprende las etapas de:

55 (1) detectar la presencia o ausencia en la muestra de ácidos nucleicos que comprenden o que consisten en los ácidos nucleicos enumerados en b) y c) definidos anteriormente y uno, más de uno o todos los ácidos nucleicos elegidos entre los enumerados en d) - i) definidos anteriormente; y

60 (2) concluir la presencia o ausencia en la muestra de material derivado de uno o más eventos de plantas transgénicas de colza oleaginosa y/o soja, tales como eventos elegidos entre el grupo que comprende o que consiste en eventos Topas 19/2, MS1, RF1, RF2, RF3, MS8, GT73, T45, Liberator pHoe6/Ac, GS40/90pHoe6/Ac, cruces de los mismos incluyendo MS1/RF1, MS1/RF2, MS8/RF3 y eventos relacionados de los mismos; y eventos MON 40-3-2, MON89788, A2704-12, A5547-127, cruces de los mismos, y eventos relacionados de los mismos.

65

**[0036]** Por razones aclaradas anteriormente, la etapa (1) del método A7 puede implicar preferentemente la detección de la presencia o ausencia en la muestra de ácidos nucleicos que comprenden o que consisten en todos los ácidos nucleicos enumerados en b), c) y d) - i) definidos anteriormente.

5 **[0037]** En otro ejemplo preferido, la etapa (1) del método A7 implica la detección de la presencia o ausencia en la muestra de ácidos nucleicos que comprenden o que consisten en todos los ácidos nucleicos enumerados en b), c) y d), e) y g) - i) definidos anteriormente, es decir, sin detectar el ácido nucleico enumerado en f).

10 **[0038]** Por tanto, la memoria describe un método ("A8") para examinar una muestra para la presencia o ausencia de material derivado de uno o más eventos de plantas transgénicas de maíz y/o colza oleaginosa y/o soja que comprende las etapas de:

(1) detectar la presencia o ausencia en la muestra de ácidos nucleicos que comprenden o que consisten en:

15 - uno, más de uno o todos los ácidos nucleicos elegidos entre los enumerados en a), a) y c) definidos anteriormente, y

- uno, más de uno o todos los ácidos nucleicos elegidos entre los enumerados en d) - i) definidos anteriormente; y

20

(2) concluir la presencia o ausencia en la muestra de material derivado de uno o más eventos de plantas transgénicas, tales como eventos elegidos entre el grupo que comprende o que consiste en: eventos Bt176, Bt11, Bt10, MON810, MON863, TC1507, NK603, T25, GA21, DAS-59122, cruces de los mismos, y eventos relacionados de los mismos; eventos Topas 19/2, MS1, RF1, RF2, RF3, MS8, GT73, T45, Liberator pHoe6/Ac, GS40/90pHoe6/Ac, cruces de los mismos incluyendo MS1/RF1, MS1/RF2, MS8/RF3, y eventos relacionados de los mismos; y eventos MON 40-3-2, MON89788, A2704-12, A5547-127, cruces de los mismos, y eventos relacionados de los mismos.

30 **[0039]** Por razones aclaradas anteriormente, la etapa (1) del método A8 puede implicar preferentemente la detección de la presencia o ausencia en la muestra de ácidos nucleicos que comprenden todos los ácidos nucleicos enumerados en d) - i) definidos anteriormente.

**[0040]** Como se ha explicado, los métodos A1 - A8 son muy adecuados para detectar la presencia potencial o ausencia en una muestra de material derivado de eventos relevantes de plantas transgénicas, tales como los que están autorizados y/o los que se usan habitualmente. Sin embargo, se apreciará que dichos métodos también son ventajosamente flexibles y, en ejemplos, permite evaluar mejor la presencia o ausencia de material derivado de eventos transgénicos adicionales, tales como eventos no recitados específicamente en la etapa (2) de los anteriores métodos A1-A8. Esto así permite reunir incluso más información acerca de la composición de la muestra.

40 **[0041]** Por tanto, en ejemplos, la etapa (1) de cualquiera de los anteriores métodos A1, A2, A5, A6 o A8 puede comprender adicionalmente la detección de la presencia o ausencia en la muestra de ácido nucleico **j)** "mCry3A": un ácido nucleico derivado del gen modificado de la proteína cristal *Cry3A* de *Bacillus thuringiensis*; y el grupo de eventos definido en la etapa (2) de cualquiera de los respectivos métodos comprende adicionalmente el evento de maíz MIR604, cruces del mismo con otros eventos de maíz, y eventos relacionados con MIR604.

45

**[0042]** En ejemplos adicionales, la etapa (1) de cualquiera de los anteriores métodos A1, A2, A5, A6 o A8 puede comprender adicionalmente la detección de la presencia o ausencia en la muestra de uno o ambos ácidos nucleicos **k)** "cordapA": un ácido nucleico derivado del gen de la dihidrodipicolinato sintasa insensible a lisina (cDHDPS) *cordapA* de *Corynebacterium glutamicum* y/o **l)** "Glb1": un ácido nucleico derivado del promotor *Glb1* de maíz; y el grupo de evento definido en la etapa (2) de cualquiera de los respectivos métodos comprende adicionalmente el evento de maíz LY038, cruces del mismo con otros eventos de maíz, y eventos relacionados con LY038.

55 **[0043]** En más ejemplos adicionales, la etapa (1) de cualquiera de los anteriores métodos A1, A2, A5, A6 o A8 puede comprender adicionalmente la detección de la presencia o ausencia en la muestra del ácido nucleico **m)** "Cry3Bb1": un ácido nucleico derivado del gen de la proteína cristal *Cry3Bb1* de *Bacillus thuringiensis*; y el grupo de eventos definido en la etapa (2) de cualquiera de los respectivos métodos comprende adicionalmente el evento de maíz MON88017, cruces del mismo con otros eventos de maíz, y eventos relacionados con MON88017.

60 **[0044]** Por consiguiente, en ejemplos, la etapa (1) de cualquiera de los anteriores métodos A1, A2, A5, A6 o A8 puede comprender adicionalmente la detección de la presencia o ausencia en la muestra de uno, más de uno, o todos los ácidos nucleicos enumerados en j) - m) definidos anteriormente; y el grupo de eventos definido en la etapa (2) de cualquiera de los respectivos métodos puede comprender adicionalmente uno, más de uno, o todos los eventos de maíz MIR604, LY038 y MON88017, cruces de los mismos con otros eventos de maíz, y eventos relacionados con los mismos. Sin embargo, aunque la detección de los respectivos ácidos nucleicos enumerados en

65 j) - m) definidos anteriormente puede proporcionar detección mejorada de la presencia de material procedente de los

eventos de maíz MIR604, LY038 y/o MON88017 en la muestra, la detección de los ácidos nucleicos enumerados en d) - i) definidos anteriormente ya permite extraer conclusiones respecto a la presencia potencial de material de dichos eventos MIR604, LY038 y/o MON88017 en una muestra (véase también la Tabla 3).

5 **[0045]** En ejemplos, la etapa (1) de cualquiera de los anteriores métodos A1, A3, A5, A7 o A8 puede comprender adicionalmente la detección de la presencia o ausencia en la muestra del ácido nucleico **n**) "Bxn": un ácido nucleico derivado del gen de la nitrilasa *Bxn* de *Klebsiella pneumoniae* ssp. *ozaenae*; y el grupo de eventos definido en la etapa (2) de cualquiera de los respectivos métodos comprende adicionalmente el evento de colza oleaginosa OXY235, cruces de los mismos con otros eventos de colza oleaginosa, y eventos relacionados con OXY235. Sin embargo, aunque la detección del ácido nucleico enumerado en n) definido anteriormente puede proporcionar detección mejorada de la presencia de material procedente del evento de colza oleaginosa OXY235 en la muestra, la detección de los ácidos nucleicos enumerados en d) - i) definidos anteriormente ya permite extraer conclusiones respecto a la presencia potencial de material de dicho evento OXY235 en una muestra (véase la Tabla 3).

15 **[0046]** Así, la memoria describe un método ("A9") para examinar una muestra para la presencia o ausencia de material derivado de uno o más eventos de plantas transgénicas de maíz y/o colza oleaginosa y/o soja que comprende las etapas de:

(1) detectar la presencia o ausencia en la muestra de ácidos nucleicos que comprenden o que consisten en:

- 20 - uno, más de uno o todos los ácidos nucleicos elegidos entre los enumerados en a), a) y c) definidos anteriormente, y
- 25 - uno, más de uno o todos los ácidos nucleicos elegidos entre los enumerados en d) - i) definidos anteriormente, y
- opcionalmente, uno, más de uno o todos los ácidos nucleicos elegidos entre los enumerados en j) - n) definidos anteriormente; y

30 (2) concluir la presencia o ausencia en la muestra de material derivado de uno o más eventos de plantas transgénicas, tales como eventos elegidos entre el grupo que comprende o que consiste en: eventos Bt176, Bt11, Bt10, MON810, MON863, TC1507, NK603, T25, GA21, DAS-59122, MIR604, LY038 y MON88017, cruces de los mismos, y eventos relacionados de los mismos; eventos Topas 19/2, MS1, RF1, RF2, RF3, MS8, GT73, T45, Liberator pHoe6/Ac, GS40/90pHoe6/Ac, OXY235, cruces de los mismos incluyendo MS1/RF1, MS1/RF2, MS8/RF3, y eventos relacionados de los mismos; y eventos MON 40-3-2, MON89788, A2704-12, A5547-127, cruces de los mismos, y eventos relacionados de los mismos.

**[0047]** Por razones aclaradas anteriormente, la etapa (1) del método A9 puede implicar preferentemente la detección de la presencia o ausencia en la muestra de ácidos nucleicos que comprende todos los ácidos nucleicos enumerados en d) - i) definidos anteriormente.

**[0048]** En ejemplos ventajosos adicionales, los métodos A1 - A8 puede así evaluar también adicionalmente la presencia potencial o ausencia en muestras de material derivado de eventos transgénicos que pertenecen a otros taxones.

45 **[0049]** Por consiguiente, en ejemplos, la etapa (1) de cualquiera de los anteriores métodos A1 - A8 (o de los anteriores ejemplos de dichos métodos) puede comprender adicionalmente la detección de la presencia o ausencia en la muestra del ácido nucleico **o**) "Or": un ácido nucleico derivado de y específico para el tazón *Oryza sativa*; y el grupo de eventos definido en la etapa (2) de cualquiera de los respectivos métodos comprende adicionalmente uno, más de uno, o todos los eventos de arroz LL62, LL06 y LL601, cruces de los mismos, y eventos relacionados con los mismos.

**[0050]** En ejemplos adicionales, la etapa (1) de cualquiera de los anteriores métodos A1 - A8 (o de los anteriores ejemplos de dichos métodos) comprende adicionalmente detectar la presencia o ausencia en la muestra del ácido nucleico **p**) "Bv": un ácido nucleico derivado de y específico para el taxón *Beta vulgaris*; y el grupo de eventos definido en la etapa (2) de cualquiera de los respectivos métodos comprende adicionalmente uno, más de uno, o todos los eventos de remolacha azucarera T120-7, H7-1 y A5-15, cruces de los mismos, y eventos relacionados con los mismos.

60 **[0051]** En más ejemplos adicionales, la etapa (1) de cualquiera de los anteriores métodos A1 - A8 (o de los anteriores ejemplos de dichos métodos) comprende adicionalmente detectar la presencia o ausencia en la muestra del ácido nucleico **q**) "Gs": un ácido nucleico derivado de y específico para el taxón *Gossypium*; y el grupo de eventos definido en la etapa (2) de cualquiera de los respectivos métodos comprende adicionalmente uno, más de uno, o todos los eventos de algodón LL cotton 25, MON 1445, MON 531, MON15985, cruces de los mismos, y eventos relacionados con los mismos.

65

**[0052]** En un desarrollo adicional, la etapa (1) de cualquiera de los ejemplos del párrafo precedente puede comprender adicionalmente la detección de la presencia o ausencia en la muestra de uno o ambos ácidos nucleicos **r)** "Cry1Ac": un ácido nucleico derivado del gen de la proteína cristal *Cry1Ac* de *Bacillus thuringiensis* y/o **s)** "Cry2Ab2": un ácido nucleico derivado del gen de la proteína cristal *Cry2Ab2* de *Bacillus thuringiensis*; y el grupo de eventos definido en la etapa (2) can particularmente detectar bien uno o los dos eventos de algodón MON 531, MON15985, cruces de los mismos con otros eventos de algodón, y eventos relacionados con los mismos.

**[0053]** En más ejemplos adicionales, la etapa (1) de cualquiera de los anteriores métodos A1 - A8 (o de los anteriores ejemplos de dichos métodos) comprende adicionalmente detectar la presencia o ausencia en la muestra del ácido nucleico **t)** "St": un ácido nucleico derivado de y específico para el taxón *Solanum tuberosum*; y el grupo de eventos definido en la etapa (2) de cualquiera de los respectivos métodos comprende adicionalmente el evento de patata EH92-527-1 y eventos relacionados con el mismo.

**[0054]** En un desarrollo adicional, la etapa (1) de cualquiera de los ejemplos del párrafo precedente puede comprender adicionalmente la detección de la presencia o ausencia en la muestra del ácido nucleico **u)** "GBSS": un ácido nucleico derivado del gen de la sintasa de almidón unido a gránulo *Gbss* de *Solanum tuberosum*, que mejora adicionalmente la fiabilidad de detección de material procedente de dicho evento EH92-527-1.

**[0055]** Se apreciará que los métodos precedentes pueden realizarse en diversas combinaciones adecuadas, que permite la detección de eventos deseados y reducen los esfuerzos.

**[0056]** Así, la memoria describe un método ("A10") para examinar una muestra para la presencia o ausencia de material derivado de uno o más eventos de plantas transgénicas de maíz y/o colza oleaginosa y/o soja y/o arroz y/o remolacha azucarera y/o algodón y/o patata que comprende las etapas de:

(1) detectar la presencia o ausencia en la muestra de ácidos nucleicos que comprenden o que consisten en:

- uno, más de uno o todos los ácidos nucleicos elegidos entre los enumerados en a), a), c), o), p) q) y t) definidos anteriormente, y
- uno, más de uno o todos los ácidos nucleicos elegidos entre los enumerados en d) - i) definidos anteriormente, y
- opcionalmente, uno, más de uno o todos los ácidos nucleicos elegidos entre los enumerados en j) - n), r) s) y u) definidos anteriormente, y

(2) concluir la presencia o ausencia en la muestra de material derivado de uno o más eventos de plantas transgénicas, tales como eventos elegidos entre el grupo que comprende o que consiste en: eventos Bt176, Bt11, Bt10, MON810, MON863, TC1507, NK603, T25, GA21, DAS-59122, MIR604, LY038, MON88017, cruces de los mismos, y eventos relacionados de los mismos; eventos Topas 19/2, MS1, RF1, RF2, RF3, MS8, GT73, T45, Liberator pHoe6/Ac, GS40/90pHoe6/Ac, OXY235, cruces de los mismos incluyendo MS1/RF1, MS1/RF2, MS8/RF3, y eventos relacionados de los mismos; eventos MON 40-3-2, MON89788, A2704-12, A5547-127, cruces de los mismos, y eventos relacionados de los mismos; eventos LL62, LL06 y LL601, cruces de los mismos, y eventos relacionados con los mismos; eventos T120-7, H7-1 y A5-15, cruces de los mismos, y eventos relacionados con los mismos; eventos LL cotton 25, MON 1445, MON 531, MON15985, cruces de los mismos, y eventos relacionados con los mismos; y el evento EH92-527-1 y eventos relacionados con el mismo.

**[0057]** Por razones aclaradas anteriormente, la etapa (1) del método A10 puede implicar preferentemente la detección de la presencia o ausencia en la muestra de ácidos nucleicos que comprenden todos los ácidos nucleicos enumerados en d) - i) definidos anteriormente.

**[0058]** La memoria describe un método preferido relacionado ("A11") para examinar una muestra para la presencia o ausencia de material derivado de uno o más eventos de plantas transgénicas de maíz y/o colza oleaginosa y/o soja y/o arroz y/o remolacha azucarera y/o algodón y/o patata que comprende las etapas de:

(1) detectar la presencia o ausencia en la muestra de ácidos nucleicos que comprenden o que consisten en:

- uno, más de uno o todos los ácidos nucleicos elegidos entre los enumerados en a), a), c), o), p) q) y t) definidos anteriormente, y
- uno, más de uno o todos los ácidos nucleicos elegidos entre los enumerados en d) - i) definidos anteriormente;

(2) concluir la presencia o ausencia en la muestra de material derivado de uno o más eventos de plantas transgénicas, tales como eventos elegidos entre el grupo que comprende o que consiste en: eventos Bt176,



Bt11, Bt10, MON810, MON863, TC1507, NK603, T25, GA21, DAS-59122, opcionalmente MIR604, LY038 y MON88017, cruces de los mismos, y eventos relacionados de los mismos; eventos Topas 19/2, MS1, RF1, RF2, RF3, MS8, GT73, T45, Liberator pHoe6/Ac, GS40/90pHoe6/Ac, opcionalmente OXY235, cruces de los mismos incluyendo MS1/RF1, MS1/RF2, MS8/RF3, y eventos relacionados de los mismos; eventos MON 40-3-2, MON89788, A2704-12, A5547-127, cruces de los mismos, y eventos relacionados de los mismos; eventos LL62, LL06 y LL601, cruces de los mismos, y eventos relacionados de los mismos; eventos T120-7, H7-1 y A5-15, cruces de los mismos, y eventos relacionados con los mismos; eventos LL cotton 25, MON 1445, MON 531, MON15985, cruces de los mismos, y eventos relacionados con los mismos; y el evento EH92-527-1 y eventos relacionados con el mismo.

10 **[0059]** Por razones aclaradas anteriormente, la etapa (1) del método A11 puede implicar preferentemente la detección de la presencia o ausencia en la muestra de ácidos nucleicos que comprenden todos los ácidos nucleicos enumerados en d) - i) definidos anteriormente.

15 **[0060]** Preferentemente, en cualquiera de los métodos A1 a A11 o de cualquier ejemplo de dichos métodos, la presencia o ausencia de ácidos nucleicos en una muestra se detecta usando amplificación de amplicones comprendidos en los respectivos ácidos nucleicos, tal como, preferentemente usando PCR y, más preferentemente usando PCR a tiempo real.

20 **[0061]** Para permitir un uso eficiente de la amplificación por PCR en los anteriores métodos, los presentes inventores buscaron minuciosamente y ensayaron cebadores y pares de cebadores para seleccionar los particularmente ventajosos en dichos métodos.

25 **[0062]** Los pares de cebadores preferidos identificados se enumeran en la Tabla 1. Implican *inter alia* las siguientes ventajas significativas. Los cebadores presentan temperatura de hibridación sustancialmente igual o satisfactoriamente similar, permitiendo así que la amplificación por PCR sobre los diferentes ácidos nucleicos se realice en las mismas condiciones de termociclado y por tanto en el mismo aparato. Esto facilita enormemente el rendimiento de los métodos y reduce la cantidad de trabajo, desechables y aparatos necesarios. Los pares de cebadores producen amplicones de aproximadamente 100 pb, y de ese modo permiten amplificar los ácidos nucleicos diana incluso a partir de muestras en que el material genético están muy fragmentado, como puede ser el caso para alimentos y piensos procesados. Los cebadores y pares de cebadores muestran especificidad adecuada de amplificación, así como sensibilidad adecuada para amplificación a tiempo real. Además, para asegurar la sensibilidad y uniformidad de los métodos y kits proporcionados por la memoria, los cebadores y pares de cebadores se han diseñado de modo que generen, en 40 ciclos y usando 10000 copias de un molde, fluorescencia de al menos 35 2500 unidades de fluorescencia relativa (UFR) y en los cuales los valores de fluorescencia así generados para los diferentes conjuntos de cebadores preferentemente recaen dentro de un margen de factor 3. Además, cada par de cebadores se ha diseñado de tal modo que amplifique los respectivos ácidos nucleicos de sustancialmente todos los eventos de interés, a pesar de la existencia de disparidades potenciales de secuencia (por ejemplo, debido al uso optimizado de codones) en dichos ácidos nucleicos entre dichos eventos.

40 Tabla 1. Pares de cebadores ventajosos para la detección de ácidos nucleicos enumerados en a) - i), o), p), q) y t) definidos anteriormente, por PCR.

Ácido nucleico diana	Cebadores
"Zm"	Dir: 5' TCTCTTCCTCCTTTAGAGCTACCACTA 3' (SEC ID N° 56) Inv: 5' AATCGATCCAAAGCGAGATGA 3' (SEC ID N° 57)
"Bn"	Dir: 5' CAGCTCAACAGTTTCCAAACGA 3' (SEC ID N° 24) Inv: 5' CGACCAGCCTCAGCCTTAAG 3' (SEC ID N° 25)
"Gm"	Dir: 5' AACCGGTAGCGTTGCCAG 3' (SEC ID N° 58) Inv: 5' AGCCCATCTGCAAGCCTTT 3' (SEC ID N° 59)
"p35S"	Dir: 5' AAAGCAAGTGGATTGATGTGATA 3' (SEC ID N° 60) Inv: 5' GGGTCTTGCGAAGGATAGTG 3' (SEC ID N° 61)
"tNOS"	Dir: 5'-GATTAGAGTCCCAGCAATTATACATTTAA-3' (SEC ID N° 9) Inv: 5'-TTATCCTAGKTTGCGCGCTATATTT-3' (SEC ID N° 10)
"Cry1Ab"	Dir: 5'-ACCGGTTACTACTCCCATCGA-3' (SEC ID N° 11) Inv: 5'-CAGCACCTGGCACGAAGT-3' (SEC ID N° 12)
"PAT/bar"	Dir: 5'-CGTCAACCACTACATCGAGACAA-3' (SEC ID N° 13) Inv: 5'-GTCCACTCCTGCGGTTCT-3' (SEC ID N° 14)
"PAT/pat"	Dir: 5'-CCGCGTTTTGTGATATCGTT-3' (SEC ID N° 15) Inv: 5'-TCTTGCAACCTCTCTAGATCATCAA-3' (SEC ID N° 16)
"CP4-EPSPS"	Dir: 5' GCATGCTTACGGTGCAA 3' (SEC ID N° 22) Inv: 5' GGACCTGTGGGAGATAGACTTGTC 3' (SEC ID N° 23) Inv 1: 5' TGAAGGACCGGTGGGAGAT 3' (SEC ID N° 62) Inv 2: 5' TGAAGGACCTGTGGGAGAT 3' (SEC ID N° 63)

Ácido nucleico diana	Cebadores
"Or"	Dir: 5' GCTTAGGGAACAGGGAAGTAAAGT 3' (SEC ID N° 51) Inv: 5' CTTAGCATAGTCTGTGCCATCCA 3' (SEC ID N° 21)
"Bv"	Dir: 5' GACCTCCATATTACTGAAAGGAAG 3' (SEC ID N° 64) Inv: 5' GAGTAATTGCTCCATCCTGTTCA 3' (SEC ID N° 65)
"Gs"	Dir: 5' AGTTTGTAGGTTTTGATGTTACATTGAG 3' (SEC ID N° 66) Inv: 5' GCATCTTTGAACCGCCTACTG 3' (SEC ID N° 67)
"St"	Dir: 5'GGACATGTGAAGAGACGGAGC 3' (SEC ID N° 68) Inv: 5' CCTACCTCTACCCCTCCGC 3' (SEC ID N° 69)

**[0063]** Por tanto, la memoria describe métodos como se define en uno cualquiera de los anteriores métodos A1 a A11 o en cualquier ejemplo de dichos métodos, en los cuales la presencia o ausencia de ácidos nucleicos entre los enumerados en a) - i), o), p), c) y t) definidos anteriormente en una muestra se detecta usando amplificación por PCR usando los respectivos pares de cebadores mostrados en la Tabla 1.

**[0064]** Cuando la Tabla 1 enumera más de un cebador directo y/o inverso para la amplificación en un cierto ácido nucleico (tal como, por ejemplo, para "CP4-EPSPS"), puede usarse uno cualquiera o cualquier combinación de dicho cebador o cebadores directos conjuntamente con uno cualquiera o cualquier combinación de dicho cebador o cebadores inversos para obtener amplificación.

**[0065]** Debe apreciarse que aunque las secuencias de cebadores enumeradas en la Tabla 1 se han perfeccionado para proporcionar amplificación óptima, los presentes métodos pueden funcionar adecuadamente cuando se usan cebadores variantes que presentan un cierto grado restringido de variación de secuencia frente a los cebadores de la Tabla 1.

**[0066]** Por tanto, los anteriores métodos y ejemplos también abarcan métodos en los cuales los ácidos nucleicos de interés se detectan por amplificación por PCR usando cebadores variantes que incluyen una o más variaciones de secuencia frente a los correspondientes cebadores enumerados en la Tabla 1, tal como, por ejemplo, una o más deleciones, inserciones y/o sustituciones, en la medida que dichos cebadores / pares de cebadores variantes aún pueden conseguir amplificación adecuada de sus respectivos amplicones. Preferentemente, dichos cebadores variantes mostrarían al menos un 85%, más preferentemente al menos un 90%, incluso más preferentemente al menos un 95%, y aún más preferentemente al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98% o al menos un 99% de identidad de secuencia con los cebadores de la Tabla 1. Las alineaciones de secuencia y la determinación de identidad de secuencia pueden hacerse, por ejemplo, usando la Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) originalmente descrita por Altschul et al. 1990 (J Mol Biol 215: 403-10), tal como el algoritmo "Blast 2 sequences" descrito por Tatusova y Madden 1999 (FEMS Microbiol Lett 174: 247-250).

**[0067]** Debe apreciarse además que los cebadores enumerados en la Tabla 1 o variantes de los mismos pueden derivatizarse ventajosamente. Por ejemplo, dichos cebadores o variantes de los mismos pueden marcarse para permitir la detección de los productos amplificados, tal como, por ejemplo, en aplicaciones de PCR a tiempo real. Por tanto, dicha derivatización puede implicar, por ejemplo, la introducción de uno o más restos marcadores y/o uno o más restos accesorios (por ejemplo, un resto inactivador, un resto FRET, etc.), y opcionalmente, cuando se requiera, la modificación de la secuencia cebadora para permitir la introducción y/o funcionamiento apropiado de dicho resto o restos. Un experto en la materia generalmente está informado sobre los modos de modificar los cebadores y pares de cebadores con fines de marcaje. El uso de cebadores y pares de cebadores así derivatizados puede ser particularmente útil en PCR a tiempo real, y particularmente cuando tienen que hacerse el seguimiento de dos o más productos de amplificación marcados de forma diferentes en reacciones de amplificación combinada.

**[0068]** Por tanto, los anteriores métodos y ejemplos también abarcan métodos donde los ácidos nucleicos de interés se detectan por amplificación por PCR usando derivados de los cebadores y pares de cebadores enumerados en la Tabla 1 o de las variantes de los mismos.

**[0069]** A modo de ejemplo, la memoria describe un método ("A12") para examinar una muestra para la presencia o ausencia de material derivado de uno o más eventos de plantas transgénicas (en particular uno o más eventos de plantas transgénicas de maíz y/o colza oleaginosa y/o soja y/o arroz y/o remolacha azucarera y/o algodón y/o patata) que comprende las etapas de:

- (1) detectar la presencia o ausencia en la muestra de ácidos nucleicos que comprenden o que consisten en:
  - uno, más de uno o todos los ácidos nucleicos elegidos entre los enumerados en a), a), c), o), p) q) y t) definidos anteriormente, y
  - uno, más de uno o todos los ácidos nucleicos elegidos entre los enumerados en d) - i) definidos anteriormente; y

- (2) concluir la presencia o ausencia en la muestra de material derivado de uno o más eventos de plantas transgénicas, tales como eventos elegidos entre el grupo que comprende o que consiste en: eventos Bt176, Bt11, Bt10, MON810, MON863, TC1507, NK603, T25, GA21, DAS-59122, opcionalmente MIR604, LY038 y MON88017, cruces de los mismos, y eventos relacionados de los mismos; eventos Topas 19/2, MS1, RF1, RF2, RF3, MS8, GT73, T45, Liberator pHoe6/Ac, GS40/90pHoe6/Ac, opcionalmente OXY235, cruces de los mismos incluyendo MS1/RF1, MS1/RF2, MS8/RF3, y eventos relacionados de los mismos; eventos MON 40-3-2, MON89788, A2704-12, A5547-127, cruces de los mismos, y eventos relacionados de los mismos; eventos LL62, LL06 y LL601, cruces de los mismos, y eventos relacionados de los mismos; eventos T120-7, H7-1 y A5-15, cruces de los mismos, y eventos relacionados con los mismos; eventos LL cotton 25, MON 1445, MON 531, MON15985, cruces de los mismos, y eventos relacionados con los mismos; y el evento EH92-527-1 y eventos relacionados con los mismos, en el cual en la etapa (1) la presencia o ausencia de ácidos nucleicos en una muestra se detecta usando amplificación por PCR usando los respectivos cebadores y pares de cebadores mostrados en la Tabla 1, o variantes o derivados de los mismos.
- 15 **[0070]** Por razones aclaradas anteriormente, la etapa (1) del método A12 puede implicar preferentemente la detección de la presencia o ausencia en la muestra de ácidos nucleicos que comprenden todos los ácidos nucleicos enumerados en d) - i) definidos anteriormente. En un ejemplo preferido, la etapa (1) del método A12 puede implicar preferentemente la detección de la presencia o ausencia en la muestra de ácidos nucleicos que comprenden al menos los ácidos nucleicos enumerados en a) - i) definidos anteriormente.
- 20 **[0071]** La memoria describe adicionalmente cebadores y pares de cebadores y variantes o derivados de los mismos adecuados para la amplificación de amplicones de ácidos nucleicos que comprenden o que consisten en los enumerados en a) - u) anteriores. En particular, en vista del esfuerzo significativo invertido por los presentes inventores para la identificación de los pares de cebadores enumerados en la Tabla 1, la memoria describe los cebadores y pares de cebadores enumerados en la Tabla 1, así como variantes y derivados de los mismos, opcionalmente en cualquier combinación adecuada de dichos cebadores y/o pares de cebadores o variantes o derivados de los mismos.
- 30 **[0072]** Además, la memoria también describe productos de amplificación que se pueden obtener usando los cebadores y pares de cebadores preferidos, vectores y plásmidos que comprenden dichos productos de amplificación, y microorganismos recombinantes transformados con y que albergan dichos vectores y plásmidos.
- 35 **[0073]** Por consiguiente, en ejemplos preferidos, la memoria también describe *E. coli* recombinante depositado según el Tratado de Budapest con el Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM) Laboratorium voor Moleculaire Biologie - Plasmidencollectie (BCCM/LMBP) (Universiteit Gent, Technologiepark 927, B-9052 Gent-Zwijnaarde, Bélgica) el 10 de enero de 2007 con los números de acceso LMBP LMBP 5452, LMBP 5453, LMBP 5454, LMBP 5455, LMBP 5456, LMBP 5457, LMBP 5458, LMBP 5459 y LMBP 5460, el 6 de marzo de 2007 con el número de acceso LMBP LMBP 5451, y el 19 de abril de 2007 con los números de acceso LMBP LMBP 5587, LMBP 5588, LMBP 5589 y LMBP 5590, así como plásmidos recombinantes aislados que se pueden obtener de dicha *E. coli* recombinante, así como insertos aislados de dichos plásmidos, preferentemente insertos aislados *EcoRI-EcoRI* de los mismos.
- 40 **[0074]** Dichos plásmidos o vectores o insertos de los mismos, y sus combinaciones, son particularmente útiles como controles positivos, referencias y/o calibradores para los respectivos amplicones en las reacciones de amplificación de los anteriores métodos.
- 45 **[0075]** Además, la memoria también describe kits que comprenden uno o más reactivos útiles en los anteriores métodos y ejemplos. Por ejemplo, dichos kits pueden comprender uno o más de los anteriores cebadores y/o pares de cebadores, particularmente enumerados en la Tabla 1, o variantes o derivados de dichos cebadores, y/o uno o más de los anteriores productos de amplificación, vectores o plásmidos que comprenden éstos, o insertos de dichos vectores o plásmidos, y/o un soporte de datos que comprende instrucciones para un dispositivo de computación programable para realizar la etapa (2) de los métodos descritos en la memoria (véase a continuación). Dichos kits puede contener adicionalmente de forma conveniente instrucciones para que el usuario realice los métodos descritos en la memoria y para que interprete los datos así obtenidos.
- 50 **[0076]** La invención también muestra un modo sencillo y directo para realizar la etapa (2) de los anteriores métodos y ejemplos, es decir, para concluir la presencia potencial o ausencia en la muestra de material derivado de los diversos eventos de plantas transgénicas de interés. En particular, los resultados obtenidos para una muestra en la etapa (1) de los anteriores métodos y ejemplos se representan como un conjunto "G<sub>SAM</sub>" que consiste en, es decir, que representa un grupo de, aquellos ácidos nucleicos elegidos entre los que comprenden o que consisten en aquellos enumerados en a) - u) anteriores que se detectaron en dicha etapa (1) como presentes en la muestra (etapa (i)).
- 60 **[0077]** Además, cualquier evento de planta transgénica de interés puede representarse como un conjunto "G<sub>x</sub>" (donde X indica el evento de interés), que consiste en, es decir, que representa un grupo de, aquellos ácidos

nucleicos elegidos entre los que comprenden o que consisten en aquellos enumerados en a) - u) anteriores que se encuentran en dicho evento y así se detectarían en la etapa (1) si la muestra contuviera material derivado de dicho evento, o un cruce que implicara dicho evento, o un evento relacionado (etapa (ii)).

- 5 **[0078]** En realizaciones ejemplares particulares, el conjunto  $G_x$  puede elegirse preferentemente entre conjuntos que representan eventos específicamente recitados anteriormente, por ejemplo, que comprenden conjuntos: evento de maíz conjuntos  $G_{Bt176} \in \{Zm; p35S; Cry1Ab; PAT/bar\}$ ,  $G_{Bt11} \in \{Zm; p35S; tNOS; Cry1Ab; PAT/pat\}$ ,  $G_{Bt10} \in \{Zm; p35S; tNOS; Cry1Ab; PAT/pat\}$ ,  $G_{MON810} \in \{Zm; p35S; tNOS; Cry1Ab\}$ ,  $G_{MON863} \in \{Zm; p35S; tNOS\}$ ,  $G_{TC1507} \in \{Zm; p35S; PAT/pat\}$ ,  $G_{NK603} \in \{Zm; p35S; tNOS; CP4-EPSPS\}$ ,  $G_{T25} \in \{Zm; p35S; PAT/pat\}$ ,  $G_{GA21} \in \{Zm; tNOS\}$ ,  $G_{DAS-59122} \in \{Zm; p35S; PAT/bar\}$ ,  $G_{MIR604} \in \{Zm; tNOS; mCry3A\}$ ,  $G_{LY038} \in \{Zm; p35S; tNOS; cordapA; Glb1\}$ , y  $G_{MON88017} \in \{Zm; p35S; tNOS; CP4-EPSPS; Cry3Bb1\}$ , eventos de colza oleaginosa conjuntos  $G_{Topas 19/2} \in \{Bn; p35S; PAT/pat\}$ ,  $G_{MS1} \in \{Bn; tNOS; PAT/bar\}$ ,  $G_{RF1} \in \{Bn; tNOS; PAT/bar\}$ ,  $G_{RF2} \in \{Bn; tNOS; PAT/bar\}$ ,  $G_{MS1/RF1} \in \{Bn; tNOS; PAT/bar\}$ ,  $G_{MS1/RF2} \in \{Bn; tNOS; PAT/bar\}$ ,  $G_{MS8} \in \{Bn; tNOS; PAT/bar\}$ ,  $G_{RF3} \in \{Bn; tNOS; PAT/bar\}$ ,  $G_{MS8/RF3} \in \{Bn; tNOS; PAT/bar\}$ ,  $G_{GT73} \in \{Bn; CP4-EPSPS\}$ ,  $G_{T45} \in \{Bn; p35S; PAT/pat\}$ ,  $G_{LiberatorpHoe6/Ac} \in \{Bn; p35S; PAT/pat\}$ ,  $G_{GS40/90pHoe6/Ac} \in \{Bn; p35S; PAT/pat\}$ ,  $G_{OXY235} \in \{Bn; p35S; Bxn\}$ , eventos de soja conjuntos  $G_{MON40-3-2} \in \{Gm; p35S; tNOS; CP4-EPSPS\}$ ,  $G_{MON89788} \in \{Gm; CP4-EPSPS\}$ ,  $G_{A2704-12} \in \{Gm; p35S; PAT/pat\}$ , y  $G_{A5547-127} \in \{Gm; p35S; PAT/pat\}$ , eventos de arroz conjuntos  $G_{LL62} \in \{Or; p35S; PAT/bar\}$ ,  $G_{LL06} \in \{Or; p35S; PAT/bar\}$ , y  $G_{LL601} \in \{Or; p35S; tNOS; PAT/bar\}$ , eventos de remolacha azucarera conjuntos  $G_{T120-7} \in \{Bv; p35S; PAT/pat\}$ ,  $G_{H7-1} \in \{Bv; p35S; CP4-EPSPS\}$ , y  $G_{A5-15} \in \{Bv; p35S; tNOS; CP4-EPSPS\}$ , eventos de algodón conjuntos  $G_{LL cotton 25} \in \{Gs; p35S; tNOS; PAT/bar\}$ ,  $G_{MON1445} \in \{Gs; p35S; tNOS; CP4-EPSPS\}$ ,  $G_{MON531} \in \{Gs; p35S; tNOS; cry1Ac\}$ , y  $G_{MON15985} \in \{Gs; p35S; tNOS; cry1Ac; cry2Ab2\}$ , y evento de patata conjunto  $G_{EH92-527-1} \in \{St; tNOS; Gbss\}$ ; en los cuales las designaciones entre corchetes  $\{ \}$  se refieren a aquellos ácidos nucleicos enumerados en a) - u) anteriores que se encuentran en dichos eventos y pueden así detectarse en materiales derivados de los mismos. Debe apreciarse que si la etapa de detección (1) implica ácidos nucleicos adicionales diferentes a los enumerados en a) - u) anteriores, dichos ácidos nucleicos pueden incluirse ventajosamente en los anteriores conjuntos.

- [0079]** Debe entenderse que cuando los anteriores métodos no ensayan la presencia de todos los ácidos nucleicos en a) - u) anteriores, el conjunto de muestra así como los conjuntos de eventos pueden definirse en términos de aquellos ácidos nucleicos cuya presencia se ensaya de forma eficiente. A modo de ejemplo y no de limitación, cuando no se ensaya la presencia de ácidos nucleicos enumerados en j) - n), r) s) y u) definidos anteriormente, que corresponden a rasgos específicos además de los definidos en d) - i), entonces los conjuntos correspondientes a varios eventos pueden definirse de un modo más estrecho, en particular: evento de maíz conjuntos  $G_{MIR604} \in \{Zm; tNOS\}$ ,  $G_{LY038} \in \{Zm; p35S; tNOS\}$ ,  $G_{MON88017} \in \{Zm; p35S; tNOS; CP4-EPSPS\}$ ; evento de colza oleaginosa conjunto  $G_{OXY235} \in \{Bn; p35S\}$ ; evento de algodón conjuntos  $G_{MON531} \in \{Gs; p35S; tNOS\}$ ,  $G_{MON15985} \in \{Gs; p35S; tNOS\}$ ; y evento de patata conjunto  $G_{EH92-527-1} \in \{St; tNOS\}$ .

**[0080]** Por tanto, la presencia de material derivado de un evento de interés  $X$  en la muestra pueden entonces determinarse realizando el conjunto respectivo de operaciones lógicas  $G_x$  de interés del siguiente modo (etapa iii):

- 40 - si  $G_x$  es igual a  $G_{SAM}$  ( $G_x = G_{SAM}$ ), entonces el material derivado del evento de planta transgénica  $X$ , o de un cruce del mismo, o de un evento relacionado con el mismo, está potencialmente presente en la muestra;
- si  $G_x$  es un subconjunto apropiado de  $G_{SAM}$  ( $G_x \subset G_{SAM}$ ), entonces el material derivado del evento de planta transgénica  $X$ , o de un cruce del mismo, o de un evento relacionado con el mismo, está potencialmente presente en la muestra;
- 45 - si  $G_x$  no es igual a  $G_{SAM}$  y  $G_x$  no es un subconjunto apropiado de  $G_{SAM}$ , ( $G_x \neq G_{SAM}$  y  $G_x \not\subset G_{SAM}$ ), entonces el material derivado del evento de planta transgénica  $X$ , o de un cruce del mismo, o de un evento relacionado con el mismo, está ausente de la muestra.

- 50 **[0081]** En realizaciones preferidas, estas operaciones lógicas pueden realizarse ventajosamente por un dispositivo de computación.

- [0082]** Se apreciará que aunque el anterior algoritmo para su uso en la etapa (2) de los presentes métodos está explicado en la presente memoria en relación a la conclusión de la presencia de material de ciertos eventos usando la detección de ácidos nucleicos particulares, dicho algoritmo es en principio fácilmente aplicables a métodos que intentan concluir la presencia de cualquier evento, tales como eventos diferentes o adicionales a los anteriores mencionados específicamente, usando detección de cualquier ácido nucleico, tales como ácidos nucleicos diferentes a o adicionales a los enumerados en a) - u) anteriores.

- 60 **[0083]** Los aspectos y realizaciones preferidas de la invención se describen en las siguientes secciones y en las reivindicaciones adjuntas.

**Breve descripción de las figuras****[0084]**

- 5 **Figura 1 (A-F)** ilustra secuencias seleccionadas de amplicones amplificados usando conjuntos de cebadores enumerados en la Tabla 4 y presentes en vectores de clonación, particularmente en pUC18, tales como plásmidos enumerados en la Tabla 5. Como puede apreciarse, las secuencias pueden incluir secuencias parciales de sitios de clonación múltiple que flanquean los amplicones insertados.
- 10 **Figura 2 (A)** resultados del ensayo de PCR combinada para p35S/tNOS, **(B)** curva de disociación de ensayo combinado específico de p35S/tNOS.
- Figura 3** proporciona representación gráfica de los datos usando +/- 8300 copias de molde como se enumera en la Tabla 8.

15

**Descripción detallada de la invención**

- [0085]** Como se usa en la presente memoria, las formas singulares "un", "una", y "el", "la", incluyen referentes tanto singulares como plurales salvo que el contexto indique claramente lo contrario.
- 20 **[0086]** Los términos "que comprende", "comprende", y "comprendido de" como se usan en la presente memoria son sinónimos con "que incluye", "incluye" o "que contiene", "contiene", y son globales o indefinidos y no excluyen miembros, elementos o etapas de método no recitadas adicionales.
- 25 **[0087]** El término "aproximadamente" como se usa en la presente memoria cuando se hace referencia a un valor medible tal como un parámetro, una cantidad, una duración temporal, y similares, se entiende que abarca variaciones de +/-20% o menos, preferentemente +/-10% o menos, más preferentemente +/-5% o menos, incluso más preferentemente +/-1% o menos, y aún más preferentemente +/-0,1% o menos de y desde el valor especificado, en la medida que dichas variaciones sean apropiadas para realizar la invención descrita. Debe entenderse que el valor al cual se refiere el modificador "aproximadamente" en sí mismo también se describe específica y preferentemente.
- 30 **[0088]** La enumeración de intervalos numéricos por puntos finales incluye todos los números y fracciones abarcados dentro de ese intervalo, así como los puntos finales indicados.
- 35 **[0089]** Todos los documentos citados en la presente memoria se incorporan por la presente por referencia en su totalidad. En particular, los contenidos de todos los documentos de la presente memoria mencionados específicamente se incorporan por referencia.
- 40 **[0090]** Por tanto, la memoria describe algunos métodos, más particularmente los métodos A1 - A12 descritos en la sección de Descripción resumida, para examinar una muestra para la presencia o ausencia de material derivado uno o más eventos de plantas transgénicas que comprende las etapas (1) detectar la presencia o ausencia en la muestra de ácidos nucleicos que comprenden o consisten en uno, más de uno o todos (la elección particular depende del objetivo de un ensayo dado) los ácidos nucleicos enumerados en a) - u) en la sección de Descripción resumida, y (2) concluir la presencia o ausencia en la muestra de material derivado de uno o más eventos de plantas transgénicas elegidos entre el grupo que comprende o consiste en algunos o todos los detallados en la sección de Descripción resumida.
- 45 **[0091]** Un "evento de planta transgénica" sucede con una transformación independiente de células vegetales con ácido nucleico heterólogo, típicamente una construcción de ácido nucleico que comprende uno o más transgenes de interés; regeneración de una población de plantas resultante de una inserción de la construcción o una parte de la misma incluyendo dicho transgén o transgenes de interés en el genoma de las plantas; y selección de una planta particular caracterizada por dicha inserción en una o más, preferentemente una, localización genómica particular. La expresión "evento de planta transgénica" abarca la planta transformante así seleccionada original, así como cualquier descendencia sucesiva de la misma que comprende el ácido nucleico insertado incluyendo el transgén o transgenes de interés; por ejemplo, dicha descendencia puede ser hemiciigótica u homociigótica para dicha inserción; dicha descendencia puede obtenerse, por ejemplo, por propagación vegetativa o por cruce sexual.
- 50 **[0092]** El término "planta" como se usa en la presente memoria abarca en líneas generales células vegetales; protoplastos vegetales; tejidos vegetales; células vegetales o cultivo de tejido a partir del cual puede regenerarse un organismo vegetal; callos o masas vegetales; organismos vegetales y partes de los mismos, tales como, sin limitación, flores, tépalos, pétalos, sépalos, anteras, polen, semillas, frutos, pericarpios, vainas, hojas, peciolo, tallos, raíces, rizomas, estolones, tubérculos, brotes, y similares. El término como se usa en la presente memoria abarca en líneas generales plantas de cualquier taxón clasificado en la técnica dentro del reino Plantae. Además, las
- 65 plantas, como se entiende en la presente memoria, pueden pertenecer preferentemente a plantas terrestres

(embriofitos) incluyendo, sin limitación, plantas no vasculares (briofitos) y plantas vasculares (traqueofitos); más preferentemente, a plantas vasculares (traqueofitos) incluyendo, sin limitación, licopodiofitos, equisetofitos, pteridofitos, psilotofitos, ofioglofitos, y plantas de semilla (espermatofitos); incluso más preferentemente a plantas de semilla (espermatofitos) incluyendo, sin limitación, plantas que albergan semillas (ginmoespermas) tales como, por ejemplo, pinofitos, cicadófitos, ginkgofitos y gnetófitos y plantas de flor (angiospermas) tales como magnoliofitos, incluyendo monocotiledóneas (liliopsida) y dicotiledóneas (Magnoliopsida). Las plantas preferidas pueden ser las aplicadas habitualmente en agricultura u horticultura. A modo de ejemplo y no de limitación, las plantas de cultivo preferidas pueden incluir maíz, trigo, cebada, sorgo, tabaco, tomate, patata, colza oleaginosa (colza), soja, remolacha azucarera, guisante, girasol, algodón, cacahuete, flores (por ejemplo, clavel), etc.

**[0093]** El término "material" se refiere en líneas generales a materia física. La expresión "material derivado de un evento de plantas transgénicas" abarca el evento de planta transgénica como tal, incluyendo, a modo ejemplo y no de limitación, el organismo del evento de planta transgénica; cualquier parte del organismo del evento de planta transgénica, tal como, por ejemplo, flores, tépalos, sépalos, anteras, polen, semillas, frutos, pericarpio, vainas, hojas, peciolo, tallos, raíces, rizomas, estolones, tubérculos o brotes, o partes de los mismos; células, protoplastos, tejidos, callos o masas del evento de planta transgénica; o material obtenido sometiendo cualquiera de los anteriores a una o más etapas de procesamiento corriente abajo. Estas etapas de procesamiento corriente abajo pueden comprender cualquier acción usada para procesar materiales vegetales particulares en agricultura, horticultura o en cualquier industria corriente abajo, por ejemplo, industria alimentaria incluyendo industria de bebidas, industria de piensos, industria textil (por ejemplo, algodón, lino, bambú, etc.), industria de combustible (por ejemplo, colza oleaginosa), industria de lubricantes (por ejemplo, aceite de ricino), industria de pinturas (por ejemplo, aceite de linaza, aceite de madera), industria cosmética y farmacéutica, etc.

**[0094]** A modo de ejemplo y no de limitación, dicho procesamiento corriente abajo puede incluir la recolección; la retirada de capas externas indeseadas, por ejemplo, descascarar, despellejar, etc.; secado, por ejemplo, secado al aire, secado al sol, secado por pulverización, secado por congelación, concentración de jugo, etc.; reducción, por ejemplo, majadura, molienda, troceado, rebanado, etc.; licuación, por ejemplo, recogida de jugo; conservación, por ejemplo, envasado al vacío, enlatado, conservado, pasteurización, adición de conservantes, etc.; prensado, por ejemplo, recogida de aceite; hidrogenación, por ejemplo, saturación de aceite vegetal; macerado; emulsionado; tratamiento térmico, por ejemplo, cocinado, cocinado a presión, cocinado al vapor, cocido en horno, ahumado, fritura, asado, etc.; fermentación, por ejemplo, por levaduras, bacterias y u hongos; congelación; y similares.

**[0095]** El término "muestra" como se usa en la presente memoria se refiere ampliamente a una parte representativa o fracción de un material más grande completo que se presenta para inspección, tal como, por ejemplo, para control de calidad. Preferentemente, una muestra a examinar por métodos de la invención puede ser sospechosa de comprender potencialmente material derivado de uno o más eventos transgénicos de interés. A modo de ejemplo, dicha sospecha puede existir para cualquier muestra representativa de material que se sabe que comprende, o se sospecha de comprender probable o posiblemente, plantas o partes de las mismas o material derivado de las mismas. En un ejemplo preferido, la muestra puede ser representativa de material que se sabe que comprende, o sospechoso de comprender probable o posiblemente, plantas o partes de las mismas o material derivado de las mismas, en el cual dichas plantas o partes de las mismas pertenecen al mismo taxón que un evento transgénico de interés cuya presencia en la muestra tiene que examinarse. Por ejemplo, una muestra puede ser representativa de plantas o partes de las mismas, por ejemplo, plantas recogidas o recolectadas o partes de las mismas (tal como, sin limitación, frutos, semillas, vainas, flores, etc.), o representativa de un material intermediario o final obtenido aplicando una o más etapas de procesamiento corriente abajo a las mismas, o de productos que comprenden dicho material, por ejemplo, de productos de alimentación o pienso procesados.

**[0096]** Por tanto, en una realización, la muestra puede comprender plantas o partes de las mismas, incluyendo flores, tépalos, sépalos, anteras, polen, semillas, frutos, pericarpio, vainas, hojas, peciolo, tallos, raíces, rizomas, estolones, tubérculos o brotes, o partes de los mismos, células vegetales, protoplastos vegetales y/o tejidos vegetales, y/o material derivado de plantas, preferentemente material para alimentación o pienso, incluyendo material para alimentación o pienso procesado.

**[0097]** Los métodos de la invención detectan la presencia o ausencia en la muestra de ácidos nucleicos, es decir, de material genético y preferentemente ADN genómico, que se origina o deriva de eventos de plantas transgénicas de interés. La presencia o ausencia de dichos ácidos nucleicos es indicativa de, respectivamente, la presencia o ausencia en la muestra de éste material y material potencialmente adicional derivado de los eventos de plantas transgénicas respectivos; tales como, por ejemplo, materiales que se co-purifican o co-separan con los ácidos nucleicos durante las diversas etapas de procesamiento aplicadas a los eventos de plantas transgénicas.

**[0098]** Se sabe que los ácidos nucleicos, y particularmente el ADN genómico, son comparablemente duraderos y pueden tolerar una diversidad de etapas de procesamiento aplicadas a materiales vegetales en agricultura e industria, por ejemplo, en la industria de alimentos o piensos, de modo que moléculas de ADN de longitudes que permiten la detección específica de secuencia de las mismas pueden encontrarse después de dichas etapas e

incluso en productos finales.

**[0099]** Por consiguiente, una muestra preferida de la invención comprende ácidos nucleicos, más preferentemente ADN genómico, incluso más preferentemente ADN genómico que tiene al menos tamaños que permiten la detección específica de secuencia del mismo, tal como, por ejemplo, de promedio, al menos aproximadamente 20 pb, por ejemplo, al menos aproximadamente 30 pb, preferentemente al menos aproximadamente 50 pb, por ejemplo, al menos aproximadamente 75 pb, más preferentemente al menos aproximadamente 100 pb, por ejemplo, aproximadamente 150 pb, o incluso más preferentemente al menos aproximadamente 200 pb, o al menos aproximadamente 300 pb, o al menos aproximadamente 500 pb, o al menos aproximadamente 1 kb, o más.

**[0100]** Aunque puede asumirse que la mayoría de las etapas de procesamiento a las cuales se expondría un evento de planta transgénica habitualmente en la práctica, conservarían ácidos nucleicos detectables como anteriormente en el producto final, y así en la muestra de la misma a examinar, los inventores también prevén un control positivo dirigido a verificar si dicha muestra comprende ácidos nucleicos detectables derivados de planta.

**[0101]** En particular, el método de la memoria puede comprender adicionalmente detectar la presencia o ausencia en la muestra de un ácido nucleico genérico derivado de plantas. En una realización preferida, dicho ácido nucleico genérico derivado de plantas se obtiene de un gen presente en y preferentemente altamente conservado (por ejemplo,  $\geq 80\%$ , preferentemente  $\geq 90\%$ , más preferentemente  $\geq 95\%$ , incluso más preferentemente  $\geq 96\%$ ,  $\geq 97\%$ ,  $\geq 98\%$  o  $\geq 99\%$  de identidad de secuencia) entre diversos taxones de plantas; preferentemente al menos dentro de los espermatofitos; o al menos dentro de las angiospermas, tal como entre y/o dentro de monocotiledóneas y dicotiledóneas; o preferentemente al menos entre taxones de plantas habitualmente usadas en agricultura e industria, tal como, sin limitación, entre maíz, trigo, arroz, cebada, sorgo, tabaco, tomate, patata, colza oleaginosa (colza), soja, remolacha azucarera, guisante, girasol, algodón, cacahuete y flores (por ejemplo, clavel); o preferentemente al menos entre taxones de plantas que comprenden o consisten en aquellas de los eventos de plantas transgénicas ensayados en la muestra.

**[0102]** En ejemplos preferidos, dicho ácido nucleico genérico derivado de plantas se obtiene de la subunidad pequeña de cloroplastos del gen Rubisco o del gen de la CHL-ARNt sintetasa.

**[0103]** Como se ha mencionado, los métodos de la memoria incluyen en la etapa (1) detectar la presencia o ausencia en la muestra de ácidos nucleicos que comprenden o consisten en uno, más de uno o todos los enumerados en a) - u) en la Descripción resumida. El término "que detecta" o "detección" como se usa en la presente memoria abarca cualquier medio para determinar la presencia o ausencia de un ácido nucleico dado en la muestra.

**[0104]** Preferentemente, la presencia de una molécula particular de ácido nucleico en una muestra puede detectarse usando uno o más reactivos que hibridan específicamente con secuencia o secuencias respectivas de nucleótidos comprendidas dentro de dicha molécula de ácido nucleico.

**[0105]** Los términos "hibridación" e "hibridar" se refieren a un proceso mediante el cual una hebra de ácido nucleico hibrida con secuencia o secuencias complementarias o sustancialmente complementarias comprendidas en la misma u otra hebra polinucleotídica a través de apareamiento de bases, preferentemente apareamiento de bases de Watson-Crick.

**[0106]** Los términos "complementario" y "complementariedad" se refieren a la unión normal de polinucleótidos en condiciones salinas (fuerza iónica) y de temperatura permisivas por apareamiento de bases, preferentemente apareamiento de bases de Watson-Crick. A modo de ejemplo, sucede apareamiento de bases complementarias de Watson-Crick entre las bases A y T, A y U o G y C. Por ejemplo, la secuencia A-G-T (es decir, 5'-A-G-T-3') es así secuencia complementaria a la secuencia A-C-T (es decir, 5'-A-C-T-3').

**[0107]** El "grado de complementariedad" de una hebra de ácido nucleico (A) a una hebra de ácido nucleico (B) puede expresarse como la proporción (porcentaje) de nucleótidos de la hebra de ácido nucleico (A) que se esperaba que coincidiera, es decir, formara pares de bases de Watson-Crick, con nucleótidos de la hebra de ácido nucleico (B), cuando dichas hebras de ácido nucleico (A) y (B) hibridaran, preferentemente en condiciones de alta rigurosidad.

**[0108]** "Complementario" como se usa en la presente memoria así se refiere a complementariedad completa, de modo que todos los nucleótidos respectivos de las hebras de ácido nucleico se unirían cuando hibriden las hebras. A modo de ejemplo, una hebra de ácido nucleico relativamente más corta mostraría complementariedad total con una hebra de ácido nucleico relativamente más larga, si la última hebra comprendiera una secuencia completamente complementaria a la secuencia de la primera hebra. "Sustancialmente complementaria" se refiere a complementaria en mayor medida pero no completamente, en particular, a al menos un 85% complementaria, por ejemplo, un 90% complementaria, preferentemente al menos un 95% complementaria, por ejemplo al menos un 96%, 97%, 98% o al menos un 99% complementaria.

**[0109]** "Hibrida específicamente" e "hibridación específica" refleja una situación en que un reactivo hibrida con una secuencia dada más fácilmente de lo que hibridaría con una secuencia no relacionada aleatoria. Por ejemplo, un reactivo que hibrida específicamente con una secuencia de nucleótidos dada (A) presenta preferentemente poca o ninguna hibridación con otros polinucleótidos, y preferentemente con homólogos u ortólogos de la secuencia de ácido nucleico (A), en condiciones en las que hibridaría específicamente con dicho polinucleótido (A).

**[0110]** Preferentemente, los reactivos que pueden hibridar específicamente con la secuencia o secuencias respectivas de nucleótidos comprendidas dentro de las moléculas de ácido nucleico enumeradas en a) - u) anteriores pueden ser sondas o cebadores.

10

**[0111]** Una "sonda" es un ácido nucleico aislado al cual se une deseablemente un marcador detectable o resto indicador, por ejemplo, un isótopo radiactivo (por ejemplo, <sup>32</sup>P, <sup>33</sup>P), ligando, agente quimioluminiscente, fluoróforo (por ejemplo, fluoresceína, tetraclorofluoresceína, TAMRA, ROX, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Texas Red, etc.), vitamina (por ejemplo, biotina), esteroide (por ejemplo, digoxina), enzima (por ejemplo, HRP, AP, etc.), etc. Dicha sonda complementaria o sustancialmente complementaria a una secuencia comprendida en una hebra de un ácido nucleico diana, en el caso de la presente memoria, de un ácido nucleico, preferentemente ADN genómico, enumerado en a) - u) anteriores. Las sondas de acuerdo con la presente memoria pueden ser ácidos desoxirribonucleicos, ácidos ribonucleicos, o ácidos nucleicos que comprenden tanto desoxirribonucleótidos como ribonucleótidos; pueden comprender bases convencionales de purina y/o pirimidina (A, G, T, C, U y/o I), pero también otras bases nucleotídicas naturales, modificadas química o bioquímicamente (por ejemplo, metiladas), no naturales, o derivatizadas; pueden incluir estructuras que comprenden azúcares y grupos fosfato, como los que pueden encontrarse típicamente en ARN o ADN, así como uno o más azúcares modificados o sustituidos (tales como, 2'-O-alkilados, por ejemplo, 2'-O-metilados o 2'-O-etilados; o 2'-O,4'-C-alkinilados, por ejemplo, 2'-O,4'-C-etilados) o uno o más grupos fosfato modificados o sustituidos - por ejemplo, análogos estructurales en ácidos nucleicos pueden incluir fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato, fosforamidoato, alquil fosfortriéster, sulfamato, 3'-tioacetal, metileno (metilimino), 3'-N-carbamato, morfolino carbamato, y ácidos peptidonucleicos (PNA).

**[0112]** Las sondas pueden ser de al menos 10 nucleótidos de longitud, por ejemplo, de al menos 11, de al menos 12, de al menos 13 o de al menos 14 nucleótidos de longitud, preferentemente de al menos 15 nucleótidos, por ejemplo, de al menos 16, de al menos 17, de al menos 18 o de al menos 19 nucleótidos de longitud, más preferentemente de al menos 20 nucleótidos de longitud, por ejemplo, de al menos 21, de al menos 22, de al menos 23, o de al menos 24 nucleótidos de longitud, incluso más preferentemente de al menos 25 nucleótidos de longitud, por ejemplo, de al menos 30, de al menos 35, de al menos 40, de al menos 45, de al menos 50, de al menos 75, de al menos 100 o de al menos 200 o más nucleótidos de longitud.

35

**[0113]** "Cebadores" son ácidos nucleicos aislados, preferentemente ácidos desoxirribonucleicos o, en otros ejemplos preferidos, ácidos ribonucleicos o PNA, complementarios o sustancialmente complementarios a una secuencia comprendida en un ácido nucleico diana (en el caso de la presente memoria, a una secuencia comprendida en un ácido nucleico, preferentemente ADN genómico, que comprende o consiste en los enumerados a) - u) anteriores), que puede hibridar con dicho ácido nucleico diana y puede actuar como punto de inicio de síntesis de un producto de extensión de cebador en presencia de nucleótidos y un agente para la polimerización de ácido nucleico, tal como polimerasa dependiente de ADN o dependiente de ARN.

**[0114]** Un cebador tiene que ser suficientemente largo para cebar la síntesis de un producto de extensión en presencia de un agente para la polimerización. Un cebador típico puede así ser de al menos 10 nucleótidos de longitud, por ejemplo, de al menos 11, de al menos 12, de al menos 13 o de al menos 14 nucleótidos de longitud, preferentemente de al menos 15 nucleótidos de longitud, por ejemplo, de al menos 16, de al menos 17, de al menos 18 o de al menos 19 nucleótidos de longitud, más preferentemente de al menos 20 nucleótidos de longitud. Cebadores preferidos adicionales están entre aproximadamente 10 y aproximadamente 40 nucleótidos de longitud, más preferentemente entre aproximadamente 15 y aproximadamente 30 nucleótidos de longitud, mucho más preferentemente entre aproximadamente 20 y aproximadamente 25 nucleótidos de longitud.

**[0115]** "Pares de cebadores" se refiere a combinaciones de cebadores que son adecuadas para la amplificación de amplicones desde dentro de ácidos nucleicos diana (en el caso de la presente memoria, desde dentro de ácidos nucleicos, preferentemente ADN genómico, que comprenden o consisten en los enumerados en a) - u) anteriores) por métodos adecuados de amplificación de ácidos nucleicos. Por consiguiente, la capacidad de amplificar un amplicón desde dentro de un ácido nucleico diana dado usando un par de cebadores diseñado para hibridar específicamente dentro de dicho ácido nucleico diana indica la presencia (y opcionalmente cantidad) de dicho ácido nucleico diana en la muestra.

60

**[0116]** Métodos ejemplares pero no limitantes para preparar y usar sondas y cebadores se describen, por ejemplo, en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., vol. 1-3, ed. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989 ("Sambrook et al. 1989"); *Current Protocols in Molecular Biology*, ed. Ausubel et al., Greene Publishing y Wiley-Interscience, Nueva York, 1992 (con actualizaciones periódicas) ("Ausubel et al. 1992"); e Innis et al., *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press: San Diego, 1990. Los

65



pares de cebadores de PCR pueden derivarse de una secuencia conocida, por ejemplo, usando programas informáticos pretendidos para ese fin tales como Primer3 (Rozen y Skaletsky. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. En: Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pág. 365-386) o el paquete GCG™ v. 11.1.2 de Accelrys.

5

**[0117]** La hibridación específica de las sondas, cebadores o pares de cebadores de la invención con sus respectivas secuencias complementarias dentro de los ácidos nucleicos diana, por ejemplo, aquellos que comprenden o consisten en los enumerados en a) - u) anteriores, pueden conseguirse preferentemente en condiciones altamente rigurosas de hibridación.

10

**[0118]** Condiciones de "alta rigurosidad" incluyen condiciones equivalentes a las siguientes condiciones ejemplares para unir o hibridar a 65°C en una solución que consiste en SSPE 5x (43,8 gr/l de NaCl, 6,9 gr/l de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O y 1,85 gr/l de EDTA, pH ajustado a 7,4 con NaOH), SDS al 0,1%, reactivo de Denhardt 5x (Denhardt 50x contiene por 500 ml: 5 gr de Ficoll (Tipo 400, Pharmacia), 5 gr de BSA (Fracción V; Sigma) y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado), seguido por lavado en una solución que comprende SSPE 5x, SDS al 0,1% a 65°C cuando se emplea una sonda de aproximadamente 500 nucleótidos de longitud. Otras condiciones ejemplares para hibridación a "alta rigurosidad" para secuencias de ácido nucleico sobre aproximadamente 20-100 nucleótidos de longitud, preferentemente aproximadamente 30-100 nucleótidos de longitud, por ejemplo, entre 30-50 nucleótidos de longitud, incluyen condiciones equivalentes a hibridación en SSC 6x a 45°C, seguido por uno o más lavados en SSC 0,2x, SDS al 0,1% o incluso SSC 0,1x, SDS al 0,1% a 65°C. pueden emplearse numerosas condiciones equivalentes para variar las condiciones de rigurosidad; factores tales como la longitud y naturaleza (ADN, ARN, composición de bases) de la sonda y naturaleza de la diana (ADN, ARN, composición de bases, presente en solución o inmovilizada, etc.) y la concentración de las sales y otros componentes (por ejemplo, la presencia o ausencia de formamida, sulfato de dextrano, polietilenglicol) se toman en consideración y la solución de hibridación puede variarse para generar condiciones de hibridación de baja o alta rigurosidad diferentes de, pero equivalentes a, las condiciones enumeradas anteriormente. Además, la técnica conoce condiciones que promueven la hibridación en condiciones de alta rigurosidad (por ejemplo, aumentando la temperatura de las etapas de hibridación y/o lavado, el uso de formamida en la solución de hibridación, etc.). Pueden encontrarse directrices para realizar reacciones de hibridación, por ejemplo, en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y., 6.3.1-6.3.6, 1989, y ediciones actualizadas más recientes, todas las cuales se incorporan por referencia.

30

**[0119]** Respecto a la amplificación de amplicones desde dentro de los ácidos nucleicos diana usando pares de cebadores, "condiciones rigurosas" o "condiciones de alta rigurosidad" son condiciones que permiten que un par de cebadores hibride solamente con su secuencia diana respectiva de ácido nucleico y produzca un producto de amplificación único, es decir, el amplicón, sustancialmente sin producción no pretendida, es decir, productos de amplificación no específicos. Por ejemplo, preferentemente menos del 20%, más preferentemente menos del 10%, incluso más preferentemente menos del 5%, por ejemplo, menos del 4%, menos del 3%, o menos del 2%, incluso más preferentemente menos del 1%, por ejemplo, menos del 0,1% o menos del 0,01% de la cantidad total (por ejemplo, peso) del producto de amplificación en una reacción de amplificación sería no específico cuando dicha reacción se realiza en condiciones rigurosas (por ejemplo, analizado por electroforesis cuantitativa en gel, o por determinación de T<sub>m</sub>, o similares).

35

40

**[0120]** Puede usarse cualquier método convencional para detectar hibridación específica de una sonda con un ácido nucleico diana en la muestra. Por ejemplo, pueden inmovilizarse ácidos nucleicos, preferentemente ADN, de una muestra y desnaturalizarse en un soporte sólido e hibridarse de este modo con sondas respectivas (por ejemplo, transferencia de Southern, slot blot, dot blot, etc.). Si una sonda - y por consiguiente su marcador detectable - se retiene en el soporte sólido, esto indica que el ácido nucleico diana para el cual es específico la sonda está presente en la muestra.

45

50

**[0121]** Asimismo, puede usarse cualquier método de amplificación existe de ácidos nucleicos para amplificar amplicones desde dentro de secuencias diana de interés, indicando de ese modo la presencia de las correspondientes secuencias diana en la muestra: incluyendo aunque sin limitación la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (documento US 4.683.202; documento US 4.965.188), amplificación por desplazamiento de hebra (SDA) (documento US 5.455.166; documento EP 0684315), LCR, TAS, 3SR, NASBA (documento US 5.409.818; documento EP 0329822), RCA y amplificación Q-beta.

55

**[0122]** En un ejemplo particularmente preferido, los métodos de la memoria emplean reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar amplicones desde dentro de ácidos nucleicos diana elegidos entre los que comprenden o consisten en aquellos enumerados en a) - u) anteriores. Las expresiones "reacción en cadena de la polimerasa" y "PCR" cubren ampliamente cualquier método mencionado como tal en la técnica y en particular métodos para amplificación de secuencias diana de ácido nucleico, especialmente secuencias diana de ADN, usando ADN polimerasa o polimerasas termoestables y dos cebadores, especialmente cebadores oligonucleotídicos, uno complementario a la hebra (+) en un extremo de la secuencia a amplificar y el otro complementario a la hebra (-) en el otro extremo. El término abarca modificaciones de la PCR prototipo, tal como, por ejemplo, PCR de alta fidelidad, PCR de inicio caliente, PCR touch-down, PCR anidada, PCR combinada, PCR

60

65

cuantitativa, PCR cuantitativa a tiempo real, PCR de rango completo, RT-PCR, etc. (véase, por ejemplo, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, eds. Innis et al., Academic Press, San Diego, 1990).

5 **[0123]** Los productos de amplificación obtenidos usando los anteriores métodos de amplificación, y en particular usando PCR, pueden evaluarse, por ejemplo, para su presencia o ausencia, para su especificidad y/o cantidad, por cualquiera de los modos habituales en la técnica. Por ejemplo, el tamaño (como una indicación de la especificidad de amplificación) y/o la cantidad de un producto de amplificación pueden evaluarse usando electroforesis en gel, tales como, por ejemplo, electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida, donde los productos de amplificación se visualizan usando colorantes adecuados de unión a ADN, tales como, por ejemplo, bromuro de etidio.

10 **[0124]** Alternativamente, los productos de amplificación pueden evaluarse por métodos que emplean sondas que hibridan con secuencias específicas dentro de los productos de amplificación. Por ejemplo, un producto de amplificación pueden inmovilizarse y desnaturalizarse en un soporte sólido y posteriormente hibridarse con una sonda marcada.

15 **[0125]** De otra manera, el producto de amplificación puede marcarse en sí mismo, por ejemplo, incluyendo un marcador detectable (por ejemplo, un fluoróforo) en uno o ambos cebadores y/o en virtud de los nucleótidos de sustrato incorporados en el producto de amplificación durante la amplificación, y el producto de PCR así obtenido pueden desnaturalizarse posteriormente e hibridarse con sondas específicas (oligonucleotídicas) unidas a un soporte sólido. La presencia y cantidad del marcador detectable en posiciones seleccionadas en el soporte sólido así indica la especificidad y cantidad, respectivamente, del producto de amplificación. Por ejemplo, dicha configuración es adecuada para su uso con series de sondas, por ejemplo, microseries.

20 **[0126]** En modos ejemplares adicionales, los productos de amplificación pueden evaluarse usando clonación y secuenciación; secuenciación directa; pirosecuenciación mediada por oligonucleótido (Ahmadian et al. 2000. Anal Biochem 280: 103-110); cromatografía, por ejemplo, DHPLC, ensayos de ligamiento de oligonucleótidos (Landegren et al. 1988. Science 241: 1077; Eggerding et al. 1995. Hum Mutat 5: 153-165; Nickerson et al. 1990. PNAS 87: 8923-8927); ensayo de protección de RNAsa; etc.

30 **[0127]** Un modo particularmente ventajoso para evaluar el producto de amplificación es amplificación a tiempo real, especialmente PCR a tiempo real. La expresión "amplificación a tiempo real" pretende indicar cualquier técnica de amplificación, preferentemente PCR ("PCR a tiempo real"), que hace posible controlar la evolución una reacción de amplificación en curso (véase, por ejemplo, Real-Time PCR: An Essential Guide, eds. Edwards et al., Horizon Scientific Press, 2004; Marras SAE et al. 2006. Real-time assays with molecular beacons and other fluorescent nucleic acid hybridization probes. Clin Chim Acta 363: 48-60; para un análisis de diversas plataformas de PCR a tiempo real).

35 **[0128]** A modo de ejemplo y no de limitación, la amplificación a tiempo real, especialmente la PCR a tiempo real, pretendida en la presente memoria abarca sistemas completamente convencionales, tales como, por ejemplo, el sistema TaqMan™ desarrollado por Applied Biosystems, que depende de la liberación y detección de una sonda fluorogénica durante cada ronda de amplificación de ADN (Holland et al. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase. PNAS 88: 7276-80). El método usa la actividad 5' exonucleasa de la polimerasa Taq durante la extensión de cebador para escindir una sonda fluorogénica con marcaje doble hibridada con el ADN diana entre los cebadores de PCR. Antes de la escisión, un fluoróforo indicador, tal como 6-carboxifluoresceína (6-FAM) en el extremo 5' de la sonda está inactivado por 6-carboxi-tetrametilrodamina (TAMRA) a través de transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET). Después de la digestión, se libera FAM. La fluorescencia resultante medida a tiempo real a aproximadamente 518 nm durante la fase logarítmica de acumulación de producto es proporcional a la cantidad de copias de la secuencia diana.

40 **[0129]** Adicionalmente los sistemas de detección de amplificación a tiempo real, especialmente PCR a tiempo real, también pueden utilizar FRET, tal como, por ejemplo, sistemas basados en balizas moleculares. Las balizas moleculares son sondas polinucleotídicas monocatenarias que poseen una estructura de horquilla tronco y bucle. La parte de bucle es una secuencia de sonda complementaria a una secuencia dentro de un amplicón a evaluar, y el tronco está formado por cortas secuencias complementarias localizadas en los extremos opuestos de la baliza molecular. La baliza molecular se marca con un fluoróforo (por ejemplo, 6-FAM) en un extremo y un inactivador (por ejemplo, TAMRA) en el otro extremo. Cuando está libre en solución, el tronco mantiene el fluoróforo y el inactivador en cercana proximidad, causando que la fluorescencia del fluoróforo esté inactivada por FRET. Sin embargo, cuando se une a su diana complementaria, el híbrido sonda-diana fuerza al tronco a desenrollarse, separando el fluoróforo del inactivador, y restaurando la fluorescencia. Por consiguiente, cuando la cantidad de un amplicón aumenta durante la amplificación, esto puede controlarse como un aumento en la fluorescencia de la baliza correspondiente (véase, por ejemplo, Manganelli et al. 2001. Real-time PCR using molecular beacons. Methods Mol Med 54: 295-310; Marras SAE. 2006. Selection of fluorophore and quencher pairs for fluorescent nucleic acid hybridization probes. Methods Mol Biol 335: 3-16; Marras SAE et al. 2006. Real-time assays with molecular beacons and other fluorescent nucleic acid hybridization probes. Clin Chim Acta 363: 48-60 para un análisis adicional de la detección de

balizas moleculares).

**[0130]** Un sistema de amplificación y detección por PCR a tiempo real particularmente ventajoso para su uso en la presente memoria es el sistema Light Upon Extension (LUX™) comercializado por Invitrogen (Carlsbad, CA) y descrito en detalle en Nazarenko et al. 2002 (Nucleic Acids Research 30: e37) y Nazarenko et al. 2002 (Nucleic Acids Research 30: 2089-2095). Este sistema emplea pares de cebadores en los cuales habitualmente uno de los cebadores de dicho par de cebadores está marcado por un fluoróforo (tal como, por ejemplo, FAM o JOE o Alexa Fluor 546). La estructura particular del cebador "libre" inactiva la señal del fluoróforo unido al mismo, mientras que la intensidad de señal del fluoróforo aumenta cuando el cebador asume una conformación extendida una vez incorporado en el producto de amplificación. La secuencia de los cebadores de la presente memoria, tal como de los cebadores particularmente preferidos enumerados en las Tablas 1 y 4, puede adaptarse para realizar la tecnología LUX™, siguiendo instrucciones de las publicaciones anteriores de Nazarenko et al. 2002 o usando herramientas de software proporcionadas por Invitrogen en [www.invitrogen.com/lux](http://www.invitrogen.com/lux). La tecnología LUX™ es particularmente muy adecuada para combinación (es decir, realización en una única reacción) de dos o más amplificaciones usando diferentes conjuntos de cebadores, ya que cada uno de los conjuntos de cebadores puede marcarse usando un fluoróforo diferente.

**[0131]** Para una descripción de modos adicionales para detectar y evaluar productos de amplificación a tiempo real (por ejemplo, usando sondas adyacentes; sondas de 5'-nucleasa tales como Taqman™; sondas Light-up; cebadores Duplex scorpion; cebadores Amplifluor; y formatos adicionales alternativos de hibridación fluorescente véase, por ejemplo, Marras SAE et al. 2006, Real-time assays with molecular beacons and other fluorescent nucleic acid hybridization probes. Clin Chim Acta 363: 48-60, esp. sección 6 y referencias en el mismo).

**[0132]** En realizaciones preferidas, la amplificación a tiempo real, preferentemente PCR a tiempo real, de la memoria usa (sustancialmente) reactivos no específicos de secuencia para detectar y evaluar la acumulación de productos de amplificación. Estos sistemas habitualmente emplean fluorocromos (colorantes fluorescentes) que se unen al ADN (es decir, de unión a ADN), preferentemente a ADN bicatenario, de un modo sustancialmente no específico de secuencia, y tras dicha unión su fluorescencia se obtiene o potencia. Por consiguiente, el aumento observado en la fluorescencia es indicativo de la aparición y cantidad del producto de amplificación acumulado (bicatenario). Si dichos fluorocromos se unen preferente o exclusivamente a ADN bicatenario y/o si su fluorescencia se potencia preferente o exclusivamente cuando se unen a ADN bicatenario, entonces la especificidad del productos de amplificación puede determinarse realizando su "curva de fusión", es decir, diagrama de fluorescencia frente a temperatura, y determinando la T<sub>m</sub> del producto, es decir, la temperatura a la cual el 50% del producto se ha fundido y ha perdido así su fluorescencia potenciada. La observación de una única T<sub>m</sub> esperada para un producto de amplificación (o múltiples T<sub>m</sub> esperadas en amplificación combinada) corrobora la especificidad de amplificación.

**[0133]** Fluorocromos ejemplares para su uso en los anteriores métodos de detección no específicos de secuencia incluyen, sin limitación, agentes de unión al surco mayor, agentes de unión al surco menor, colorante intercalantes, o similares; tales como, por ejemplo, SYBR Green I (2-[N-(3-dimetilaminopropil)-N-propilamino]-4-[2,3-dihidro-3-metil-(benzo-1,3-tiazol-2-il)-metilideno]-1-fenil-quino-linio; Zipper et al. 2004, Nucleic Acid Res 32: e103), bromuro de etidio, Hoechst 33258, PicoGreen™ (Molecular Probes), preferentemente SYBR Green I o PicoGreen™.

**[0134]** En una realización preferida adicional, las reacciones de amplificación a tiempo real de los presentes métodos pueden combinarse, es decir, pueden amplificarse dos o más amplicones diferentes usando dos o más pares de cebadores correspondientes en la misma muestra o muestras en la misma reacción. Los cebadores concebidos por los presentes inventores, en particular los cebadores enumerados en cualquiera de la Tabla 1 o Tabla 4 o variantes o derivados de los mismos, pueden usarse particularmente para aplicaciones de combinación *inter alia* porque funcionan adecuadamente en condiciones de reacción sustancialmente iguales o similares (por ejemplo, composición de la reacción y condiciones de termociclado), y también porque producen productos de tamaño similar.

**[0135]** Se entiende bien que la combinación generalmente requiere que los diferentes productos de amplificación que surgen en la reacción puedan distinguirse. En el presente contexto, si se usan métodos no específicos de secuencia (por ejemplo, SYBR Green u otro colorante de unión de ADN) para detectar los productos de amplificación, la combinación puede verse particularmente cuando los productos de amplificación tienen T<sub>m</sub> suficientemente diferente para distinguirse realizando una curva de fusión (por ejemplo, diferencia de T<sub>m</sub> en aproximadamente 5°C o más). Sin embargo, cuando se usan métodos de detección específicos de amplicón (por ejemplo, cebadores marcados de forma diferente o sondas marcadas de forma diferente para diferentes amplicones), en principio es posible una combinación radical de los presentes ensayos.

**[0136]** Por tanto, la diana para la detección descrita anteriormente usando sondas y/o molde para la amplificación usando pares de cebadores, sería ácido nucleico originado a partir de respectivos eventos de plantas transgénicas comprendidos en la muestra. Preferentemente, este ácido nucleico diana y/o molde sería ADN genómico originado a partir de dichos eventos transgénicos que, debido a su mayor estabilidad, se espera que se conserven mejor en la muestra que otros tipos de ácido nucleico, tales como, por ejemplo, ARNnh o ARNm. No obstante, la memoria

también describe la detección de ARNm o ADNc (por ejemplo, por los correspondientes ensayos de RT-PCT), o ADN derivado de plásmidos, donde sea aplicable.

5 **[0137]** El presente método así preferentemente emplea amplificación usando pares de cebadores diseñados para hibridar específicamente dentro de y amplificar amplicones correspondientes de dentro de ácidos nucleicos, cuya presencia o ausencia en la muestra tiene que detectarse, tal como, preferentemente, ácidos nucleicos que comprenden o que consisten en aquellos enumerados en a) - u) anteriores, como medio para detectar la presencia o ausencia de dichos ácidos nucleicos en la muestra.

10 **[0138]** A este respecto, los presentes inventores comprendieron que si el material de un evento de planta transgénica se ha expuesto a una o más etapas de procesamiento corriente abajo, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente, los ácidos nucleicos, tales como el ADN genómico de los mismos, pueden estar fragmentados. Por lo tanto, para aumentar las posibilidades de que los respectivos amplicones se amplifique de forma representativa a partir del ADN así fragmentado, la memoria también muestra que reduce ventajosamente el tamaño de los  
15 amplicones.

**[0139]** Por consiguiente, en realizaciones preferidas, los amplicones son de menos de aproximadamente 300 pb, por ejemplo, menos de 280 pb, menos de 260 pb, menos de 240 pb, o menos de 220 pb, más preferentemente menos de aproximadamente 200 pb, por ejemplo, menos de 190 pb, menos de 180 pb, menos de 170 pb o menos  
20 de 160 pb, incluso más preferentemente menos de aproximadamente 150 pb, por ejemplo, menos de 140 pb, menos de 130 pb, menos de 120 pb o menos de 110 pb, aún más preferentemente menos de aproximadamente 100 pb, y aún más preferentemente menos de aproximadamente 90 pb, por ejemplo aproximadamente 85 pb, aproximadamente 80 pb, aproximadamente 75 pb, aproximadamente 70 pb, aproximadamente 65 pb, aproximadamente 60 pb, aproximadamente 55 pb o aproximadamente 50 pb.

25 **[0140]** En realizaciones preferidas adicionales, los amplicones son entre aproximadamente 50 pb y aproximadamente 150 pb, entre aproximadamente 50 pb y aproximadamente 100 pb, preferentemente entre aproximadamente 50 pb y aproximadamente 90 pb, más preferentemente entre aproximadamente 60 pb y aproximadamente 80 pb, y aún más preferentemente entre aproximadamente 65 pb y aproximadamente 75 pb.

30 **[0141]** Como se ha explicado, los anteriores métodos detectan ácidos nucleicos particulares, preferentemente ADN genómico, en una muestra. Puede apreciarse que podrían realizarse algunos protocolos de detección robustos, por ejemplo, algunos protocolos de PCR, sobre muestras sin purificación o enriquecimiento previo de sus ácidos nucleicos constituyentes. Por otro lado, las detecciones de la memoria pueden realizarse de forma más coherente si  
35 los ácidos nucleicos, tales como preferentemente ADN genómico, se enriquecen o aíslan primero de la muestra. Los métodos para el aislamiento de ácidos nucleicos, tales como ADN genómico, de muestras, particularmente muestras que comprenden material vegetal, están bien arraigados en la técnica e incluyen métodos basados en, mediante ejemplo y sin limitación, extracción con disolvente orgánico (por ejemplo, extracción con fenol-cloroformo) y precipitación en etanol o alcohol isopropílico; unión a resinas de intercambio iónico; separación en densidad de cloruro de cesio; cromatografía en columna de centrifugación, separación magnética, etc. (véase, por ejemplo, Milligan 1992, Plant DNA isolation. pág. 59-88 en Hoelzel, ed. Molecular genetic analysis of populations: a practical approach. IRL Press, Oxford, RU).

40 **[0142]** La calidad del ADN así aislado puede evaluarse, por ejemplo, por electroforesis en gel y/o midiendo la proporción de absorbancia  $A_{260}/A_{280}$ . Preferentemente, la proporción  $A_{260}/A_{280}$  para ácidos nucleicos usados en los métodos de detección de la invención puede ser entre 1,6 y 2,3, más preferentemente entre 1,6 y 2,0, incluso más preferentemente entre 1,7 y 1,9, aún más preferentemente entre 1,75 y 1,85 y mucho más preferentemente de aproximadamente 1,8. La cantidad del ADN así aislado puede evaluarse, por ejemplo, midiendo la absorbancia  $A_{260}$  (Sambrook 1989), o preferentemente usando los fluorocromos PicoGreen™ o SYBR Green I (Ahn et al. 1996,  
50 Nucleic Acids Res 24: 2623-5; Schneeberger et al. 1995, PCR Methods Appl 4: 234-8).

**[0143]** En una realización preferida, la preparación de material de ácido nucleico, particularmente ADN genómico, para su uso en los métodos de la invención también puede implicar fragmentación para obtener tamaños promedio más bajos de los fragmentos de ácido nucleico, tal como, por ejemplo, usando digestión enzimática o sonicación  
55 conocidos en la técnica. La longitud promedio preferible de los ácidos nucleicos así fragmentados puede ser entre 200 y 2000 pb, más preferentemente entre 300 y 1500 pb, incluso más preferentemente entre 500 y 1000 pb, por ejemplo, aproximadamente 500, aproximadamente 600, aproximadamente 700, aproximadamente 800 aproximadamente 900 o aproximadamente 1000 pb.

60 **[0144]** Los anteriores métodos así detectan la presencia o ausencia de ácidos nucleicos seleccionados en una muestra, preferentemente usando sistemas de detección y protocolos descritos hasta ahora. Como se usa en la presente memoria, la "presencia" de un ácido nucleico dado en una muestra se concluye generalmente cuando el valor de intensidad de señal (cantidad de señal) obtenida para ese ácido nucleico usando un ensayo de detección adecuado (por ejemplo, señal fluorescente, señal quimioluminiscente, señal de reacción enzimática, etc.) en la  
65 muestra es mayor, preferentemente significativamente mayor estadísticamente, que la de un control negativo.

**[0145]** Un control negativo no contiene el ácido nucleico que se está ensayando, pero puede ser ventajosamente comparable con la muestra en otros aspectos, preferentemente la mayor parte de los demás aspectos, por ejemplo, en el tipo y cantidad de material vegetal contenido en la misma, en etapas de procesamiento corriente abajo a las cuales se ha expuestos el material, etc.

5

**[0146]** Preferentemente, los métodos de detección de la invención pueden realizarse sobre ácidos nucleicos, más preferentemente sobre ADN genómico, aislado de la muestra (véase anteriormente). En dicho caso, el control negativo puede constar esencialmente de ácidos nucleicos aislados, no comprendiendo el ácido nucleico objeto de detección. Preferentemente, el método de detección entonces emplearía la misma o aproximadamente la misma

10

cantidad de ácidos nucleicos aislados tanto de la muestra como de, para referencias, el control negativo. También preferentemente, la pureza y/o calidad de los ácidos nucleicos aislados de la muestra y del control negativo también pueden ser iguales o aproximadamente iguales; además preferentemente, puede usarse el mismo método de aislamiento para aislar ácidos nucleicos tanto de la muestra como del control negativo.

15

**[0147]** En las anteriores situaciones, la presencia de un ácido nucleico dado en una muestra puede concluirse preferentemente cuando el valor de intensidad de señal (cantidad de señal) obtenido de ese ácido nucleico en la muestra es al menos 2 x mayor que el del control negativo, por ejemplo, al menos 3 x o al menos 4 x mayor, más preferentemente al menos 5 x mayor, por ejemplo, al menos 6 x mayor, al menos 7 x mayor, al menos 8 x mayor o al menos 9 x mayor, incluso más preferentemente al menos 10 x mayor, por ejemplo, al menos 15 x mayor, aún más

20

preferentemente al menos 20 x mayor, por ejemplo, al menos 30 x mayor o al menos 40 x mayor, aún más preferentemente al menos 50 x mayor, por ejemplo, al menos 100 x mayor, al menos 200 x mayor, al menos 300 x mayor, al menos 400 x mayor, al menos 500 x mayor, al menos 1000 x mayor o incluso mayor que la señal en el control negativo.

25

**[0148]** Por tanto, cuando el valor de señal (cantidad de señal) obtenido para el ácido nucleico ensayado en la muestra no es mayor (por ejemplo, es igual, aproximadamente igual o inferior) que el valor de señal obtenido para el ácido nucleico ensayado en el control negativo, o preferentemente no es mayor por los múltiplos preferidos recitados anteriormente, generalmente puede concluirse la "ausencia" de dicho ácido nucleico en la muestra.

30

**[0149]** En realizaciones preferidas, la presencia o ausencia en la muestra de un ácido nucleico de interés se evalúa por amplificación a tiempo real, preferentemente PCR a tiempo real. En estos sistemas, una medida común usada para expresar la cantidad del molde para un ácido nucleico dado en una muestra es el valor  $C_t$ . En resumen, el valor  $C_t$  indica el número de ciclo al cual la fluorescencia atribuible a los productos de amplificación que se acumulan ( $\Delta R_n$ ) pasa a través de un valor de fluorescencia umbral arbitrario, el último se establece por encima de la

35

fluorescencia basal pero dentro de la fase exponencial de amplificación (es decir, dentro de la parte que aparecería lineal en un diagrama log 2 de la fluorescencia frente a los datos de n° de ciclo).

**[0150]** Por consiguiente, en amplificación a tiempo real, la presencia de un ácido nucleico dado en una muestra puede concluirse generalmente cuando el  $C_t$  de la muestra ("SAM  $C_t$ ") es inferior al  $C_t$  de un control negativo ("NC  $C_t$ "); y puede concluirse preferentemente cuando  $SAM C_t \leq (NC C_t - 1)$ , por ejemplo,  $SAM C_t \leq (NC C_t - 2)$ ,  $SAM C_t \leq (NC C_t - 3)$  o  $SAM C_t \leq (NC C_t - 4)$ , más preferentemente cuando  $SAM C_t \leq (NC C_t - 5)$ , por ejemplo,  $SAM C_t \leq (NC C_t - 6)$ ,  $SAM C_t \leq (NC C_t - 7)$ ,  $SAM C_t \leq (NC C_t - 8)$  o  $SAM C_t \leq (NC C_t - 9)$ , incluso más preferentemente cuando  $SAM C_t \leq (NC C_t - 10)$ , por ejemplo,  $SAM C_t \leq (NC C_t - 11)$ ,  $SAM C_t \leq (NC C_t - 12)$ ,  $SAM C_t \leq (NC C_t - 13)$ ,  $SAM C_t \leq (NC C_t - 13)$  o  $SAM C_t \leq (NC C_t - 14)$ , aún más preferentemente cuando  $SAM C_t \leq (NC C_t - 15)$ , por ejemplo,  $SAM C_t \leq (NC C_t - 16)$ ,  $SAM C_t \leq (NC C_t - 17)$ ,  $SAM C_t \leq (NC C_t - 18)$  o  $SAM C_t \leq (NC C_t - 19)$ , aún más preferentemente cuando  $SAM C_t \leq (NC C_t - 20)$ , por ejemplo,  $SAM C_t \leq (NC C_t - 25)$ ,  $SAM C_t \leq (NC C_t - 30)$  o  $SAM C_t \leq (NC C_t - 35)$ .

40

45

**[0151]** Por tanto, en amplificación a tiempo real, cuando  $SAM C_t$  no es inferior (por ejemplo, es igual, aproximadamente igual o mayor) que  $NC C_t$ , o preferentemente no es inferior por los diferenciales preferidos recitados anteriormente, generalmente puede concluirse la "ausencia" de dicho ácido nucleico en la muestra.

50

**[0152]** Como se ha apreciado anteriormente, en sistemas de amplificación a tiempo real que no emplean sondas específicas de secuencia (por ejemplo, cuando el producto de amplificación se detecta usando colorantes de ADN no específicos de secuencia tales como, por ejemplo, SYBR Green I), la especificidad del producto de amplificación puede verificarse realizando un análisis de curva de fusión y determinando la  $T_m$ . La presencia de producto de amplificación específico puede concluirse cuando la  $T_m$  observada es idéntica o sustancialmente idéntica (preferentemente dentro de un intervalo de  $\pm 3^\circ C$ , más preferentemente  $\pm 2^\circ C$ , aún más preferentemente  $\pm 1^\circ C$ , incluso más preferentemente  $\pm 0,5^\circ C$ , y aún más preferentemente  $\pm 0,2^\circ C$  o  $\pm 0,1^\circ C$ ) a la temperatura de fusión calculada y/o determinada experimentalmente del amplicón esperado.

55

60

**[0153]** Además, la amplificación específica puede concluirse preferentemente cuando el análisis de curva de fusión del producto de amplificación presenta una única  $T_m$ . Alternativa o adicionalmente, la amplificación específica puede concluirse preferentemente cuando el producto de amplificación presente un único tamaño esperado en electroforesis en gel. Sin embargo, la aparición de uno o más productos de amplificación no específicos podría ser tolerable en alguna medida en la práctica, preferentemente si dicho producto o productos de amplificación no

65

específicos constituiría menos del 50%, más preferentemente menos del 40%, incluso más preferentemente menos del 30%, aún más preferentemente menos del 20%, aún más preferentemente menos del 10%, adicionalmente más preferentemente menos del 5%, incluso más preferentemente menos del 2% y mucho más preferentemente menos del 1%, por ejemplo, menos del 0,5% o menos del 0,1%, de la cantidad total (p/p) del producto de amplificación.

5 Dicho producto o productos de amplificación no específicos pueden observarse, por ejemplo, mediante la aparición de uno o más picos adicionales de T<sub>m</sub> en el análisis de curva de fusión y/o la aparición de uno o más tamaños adicionales de producto en electroforesis en gel.

10 **[0154]** En un desarrollo adicional de la invención, se aprecia que los amplicones amplificados usando el mismo conjunto de cebadores sobre ácidos nucleicos originados a partir de diferentes eventos pueden mostrarse distintos valores de T<sub>m</sub>, presumiblemente debido a algunas diferencias en la secuencia entre dichos amplicones. A modo de ejemplo y no de limitación, los amplicones amplificados usando el conjunto de cebadores SEC ID N° 11 y 12 (Tabla 4) en Bt11 y Bt176 muestra dicha diferencia en sus T<sub>m</sub>. Por consiguiente, el valor T<sub>m</sub> observado puede servir como información distintiva adicional para su uso en el método de la invención, de modo que se obtenga una indicación  
15 incluso más detallada de la presencia o ausencia de ácidos nucleicos de dichos eventos particulares.

20 **[0155]** Alternativa o adicionalmente, en una variación adicional, un particular ácido nucleico puede amplificarse usando un conjunto particular de cebadores de uno o más eventos, aunque el mismo cebador no amplificaría el correspondiente ácido nucleico en uno o más eventos diferentes, presumiblemente debido a algunas diferencias de secuencia en los sitios de unión a cebador. Aunque dicha situación necesitaría el uso de dos o más conjuntos de cebadores para amplificar el correspondiente ácido nucleico procedente de diferentes eventos (y puede ser, en ese aspecto, menos ventoso que elegir un conjunto de cebadores que amplifique el ácido nucleico de todos los eventos de plantas de interés), puede dar la ventaja de proporcionar información adicional acerca de la presencia o ausencia de ácidos nucleicos de eventos particulares en la muestra. Por ejemplo, el ácido nucleico Cry1Ab puede detectarse  
25 ventajosamente de MON810 usando el conjunto de cebadores SEC ID N° 30 y 31 y de Bt11 y Bt176 usando el conjunto de cebadores SEC ID N° 11 y 12 (Tabla 4).

30 **[0156]** Un experto en la materia puede apreciar que las reacciones de amplificación, por ejemplo, PCR, pueden dar lugar a un subproducto "cebador-dímero" no específico. Dichos productos cebador-dímero típicamente pueden distinguirse fácilmente de los productos de amplificación específicos por su diferente, muy a menudo más pequeño, tamaño y/o T<sub>m</sub>. Por tanto, un experto en la materia sería capaz de reconocer y minimizar el efecto de dichos artefactos sobre el análisis de la reacción de amplificación. Los cebadores preferidos de la memoria, tales como los enumerados en las Tablas 1 y 4, se han diseñado para minimizar el efecto de cebador dímero.

35 **[0157]** Una cuestión adicional es la sensibilidad de los métodos de detección usados en la presente memoria, que puede expresarse ventajosamente como "límite de detección" (LOD) de los mismos, que se refiere en la presente memoria a la cantidad o concentración más baja de un analito (en la presente memoria de un ácido nucleico dado a detectar) en una muestra que puede detectarse de forma fiable, aunque no necesariamente cuantificarse. "Detectado de forma fiable" como se usa en la presente memoria significa que muestras que contienen la cantidad o  
40 concentración LOD del analito darán un resultado positivo en  $\geq 50\%$  de detecciones repetidas, preferentemente en  $\geq 60\%$ , más preferentemente en  $\geq 70\%$ , incluso más preferentemente en  $\geq 80\%$ , aún más preferentemente en  $\geq 90\%$ , y mucho más preferentemente en  $\geq 95\%$  o incluso en  $\geq 99\%$  de detecciones repetidas.

45 **[0158]** Preferentemente, el LOD de los métodos de detección adecuados para su uso en la memoria, expresado en la presente memoria como el número de copia LOD de un ácido nucleico dado de interés en una muestra sometida a detección, puede ser 10 000 o menos, por ejemplo, 9 000 o menos, 8 000 o menos, 7 000 o menos o 6 000 o menos, más preferentemente 5 000 o menos, por ejemplo, 4 000 o menos, 3 000 o menos o 2 000 o menos, incluso más preferentemente 1 000 o menos, por ejemplo, 900 o menos, 800 o menos, 700 o menos o 600 o menos, aún más preferentemente 500 o menos, por ejemplo, 400 o menos, 300 o menos o 200 o menos, aún más preferentemente 100 o menos, por ejemplo, 90 o menos, 80 o menos, 70 o menos o 60 o menos, y mucho más preferentemente 50 o menos, incluyendo realizaciones ejemplares preferidas 40 o menos, 30 o menos, 20 o menos o incluso 10 o menos, tal como, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9. Los cebadores preferidos de la memoria, tales como los enumerados en las Tablas 1 y 4, se han diseñado para conseguir sensibilidad particularmente alta (bajo LOD).  
50

55 **[0159]** Como se usa en la presente memoria, el término "maíz" se refiere a *Zea mays*, preferentemente *Zea mays* ssp. *Mays*, e incluye todas las variedades vegetales que pueden generarse con maíz, incluyendo especies silvestres de maíz; los términos "colza", "colza oleaginosa" o "canola" se refieren de forma intercambiable a *Brassica napus*, e incluyen todas las variedades vegetales que pueden generarse con colza, incluyendo especies silvestres de colza; los términos "soja", o "semilla de soja" se refieren de forma intercambiable a *Glycine max*, e incluyen todas las variedades vegetales que pueden generarse con soja, incluyendo especies silvestres de soja; el término "arroz" se refiere a *Oryza sativa*, incluyendo, sin limitación, ssp. *indica* y *japonica*, e incluye todas las variedades vegetales que pueden generarse con arroz, incluyendo especies silvestres de arroz; el término "remolacha azucarera" se refiere a *Beta vulgaris*, e incluye todas las variedades vegetales que pueden generarse con remolacha azucarera, incluyendo  
60 especies silvestres de remolacha azucarera; el término "algodón" se refiere a especies *Gossypium*, preferentemente

*Gossypium hirsutum*, e incluye todas las variedades vegetales que pueden generarse con algodón, incluyendo especies silvestres de algodón; el término "patata" se refiere a *Solanum tuberosum*, e incluye todas las variedades vegetales que pueden generarse con patata, incluyendo especies silvestres de patata.

- 5 [0160] Los eventos de plantas transgénicas se mencionan en la presente memoria por sus denominaciones empleadas comúnmente en la técnica y familiares para los expertos en la materia. No obstante, mediante asistencia adicional, la siguiente Tabla 2 resumen información suficiente para la identificación específica de eventos recitados.

Tabla 2 Identificación de eventos de plantas transgénicas

Evento	Compañía	Taxón hospedador	ID única (UI)
Bt176	Syngenta	<i>Zea mays</i>	SYN-EV176-9
Bt11	Syngenta	<i>Zea mays</i>	SYN-BT011-1
MON810	Monsanto	<i>Zea mays</i>	MON-00810-6
MON863	Monsanto	<i>Zea mays</i>	MON-00863-5
TC1507	Pioneer Hi-Bred / Dow AgroScience	<i>Zea mays</i>	DAS-01507-1
NK603	Monsanto	<i>Zea mays</i>	MON-00603-6
T25	Bayer CropScience	<i>Zea mays</i>	ACS-ZM003-2
GA21	Monsanto	<i>Zea mays</i>	MON-00021-9
DAS-59122	Dow AgroSciences / Pioneer Hi-Bred	<i>Zea mays</i>	DAS-DAS-59122-7
MIR604	Syngenta Seeds	<i>Zea mays</i>	SYN-IR604-5
LY038	Renessen LLC / Monsanto	<i>Zea mays</i>	REN-00038-3
MON88017	Monsanto	<i>Zea mays</i>	MON88017-3
Topas 19/2	Bayer CropScience	<i>Brassica napus</i>	ACS-BN007-1
MS1	Bayer CropScience	<i>Brassica napus</i>	ACS-BN004-7
RF1	Bayer CropScience	<i>Brassica napus</i>	ACS-BN001-4
RF2	Bayer CropScience	<i>Brassica napus</i>	ACS-BN002-5
RF3	Bayer CropScience	<i>Brassica napus</i>	ACS-BN003-6
MS8	Bayer CropScience	<i>Brassica napus</i>	ACS-BN005-8
GT73	Monsanto	<i>Brassica napus</i>	MON-00073-7
T45	Bayer CropScience	<i>Brassica napus</i>	ACS-BN008-2
Liberator pHoe6/Ac	Bayer CropScience	<i>Brassica napus</i>	ACS-BN010-4
GS40/90pHoe6/Ac	Bayer CropScience	<i>Brassica napus</i>	ACS-BN010-4
MS1/RF1	Bayer CropScience	<i>Brassica napus</i>	ACS-BN004-7 x ACS-BN001-4
MS1/RF2	Bayer CropScience	<i>Brassica napus</i>	ACS-BN004-7 x ACS-BN002-5
MS8/RF3	Bayer CropScience	<i>Brassica napus</i>	ACS-BN005-8 x ACS-BN003-6
OXY235	Bayer CropScience	<i>Brassica napus</i>	ACS-BN011-5
MON 40-3-2	Monsanto	<i>Glycine max</i>	MON-04032-6
MON89788	Monsanto	<i>Glycine max</i>	MON-89788-1
A2704-12	Bayer CropScience	<i>Glycine max</i>	ACS-GM005-3
A5547-127	Bayer CropScience	<i>Glycine max</i>	ACS-GM006-4
LL62	Bayer CropScience	<i>Oryza sativa</i>	ACS-OS002-5
LL06	Bayer CropScience	<i>Oryza sativa</i>	ACS-OS001-4
T120-7	Bayer CropScience	<i>Beta vulgaris</i>	ACS-BV001-3
H7-1	KWS SAAT AG / Monsanto	<i>Beta vulgaris</i>	KM-000H71-4
A5-15	DANISCO Seed; DLF Trifolium A/S; Monsanto	<i>Beta vulgaris</i>	DLF-0A515-7
LL cotton 25	Bayer CropScience	<i>Gossypium hirsutum</i>	ACS-GH001-3
MON 1445	Monsanto	<i>Gossypium hirsutum</i>	MON-01445-2
MON 531	Monsanto	<i>Gossypium hirsutum</i>	MON-00531-6
MON 15985	Monsanto	<i>Gossypium hirsutum</i>	MON-15985-7
EH-92-527-1	Amylogen HB (BASF Plant Science	<i>Solanum tuberosum</i>	BPS-25271-9

10

- [0161] Los identificadores únicos enumerados anteriormente (UI) representan un sistema para clasificación única de eventos de plantas transgénicas iniciada por la Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) y descrita en sus publicaciones ENV/JM/MONO(2002)7: "OECD Guidance for the Designation of a Unique Identifier for Transgenic Plants", del 20 de octubre de 2004, y ENV/JM/MONO(2002)7/REV1 del 7 de noviembre de 2006. Dichos identificadores únicos se usan, reconocen y asigna internacionalmente, incluyendo en Europa (véase, por ejemplo, el reglamento de la comisión (EC) N° 65/2004 del 14 de enero de 2004 que establece un sistema para el desarrollo y asignación de identificadores únicos para organismos modificados genéticamente).

15

- [0162]** Puede accederse a información detallada respecto a los anteriores y adicionales eventos de plantas transgénicas de interés, tal como, por ejemplo, información sobre taxones hospedadores, construcciones transformantes, secuencias insertadas, etc. a través de los portales disponibles al público de diversas autoridades reguladoras incluyendo, por ejemplo, la OECD BioTrack Product Database (<http://www2.oecd.org/biotech/default.aspx>), la US FDA (<http://www.cfsan.fda.gov/>), el European Community Register of GM Food and Feed ([http://ec.europa.eu/food/dyna/gm\\_register/index\\_en.cfm](http://ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_en.cfm)), la Agbios database ([www.agbios.com](http://www.agbios.com)), o la EC GMO Compass database (<http://www.gmo-compass.org/>), así como en bibliografía científica, etc. Un experto en la materia es muy consciente de estas fuentes de bases de datos y puede usarlas.
- 10 **[0163]** Además, los métodos de detección específica de evento y los métodos de detección específica de construcción (por ejemplo, véase *Codex Alimentarium*) están disponibles y permiten distinguir de forma inequívoca los anteriores y adicionales eventos. Por ejemplo, el European Community Reference Laboratory (CRL) (<http://gmo-crl.jrc.it/>; <http://gmo-crl.jrc.it/statusofdoss.htm>) enumera métodos validados para detección específica de evento, proporcionados por los fabricantes, descritos en bibliografía científica o desarrollados por el propio CRL.
- 15 **[0164]** Como se ha apreciado anteriormente, los métodos de la memoria permiten concluir la presencia o ausencia en una muestra de material derivado de eventos seleccionados, cruces de los mismos, o eventos relacionados de los mismos.
- 20 **[0165]** La expresión "cruces de los mismos" en este contexto se refiere a la descendencia obtenida por uno o más cruces posteriores de dos o más eventos compatibles (es decir, eventos capaces de cruzarse, particularmente eventos que pertenecen al mismo taxón), de modo que dicha descendencia resultante comprenda insertos transgénicos de los dos o más eventos precursores que se están cruzando.
- 25 **[0166]** La expresión "eventos relacionados de los mismos" en este contexto se refiere a eventos que se han generado introduciendo en los mismos taxones las mismas construcciones transformantes que las de los respectivos eventos recitados, pero que son no obstante distintos de los eventos recitados, por ejemplo, pueden diferir típicamente en la cantidad y/o sitio de integraciones genómicas de la construcción transformante. A menudo, dichos eventos pueden estar sujetos en sí mismos a autorización. En otros casos, dichos eventos relacionados pueden estar presentes como contaminantes indeseados. Por tanto, detectando elementos genéticos de dentro de las construcciones transformantes, los métodos de la memoria permiten ventajosamente detectar dichos eventos.
- 30 **[0167]** Como se ha apreciado anteriormente, los métodos de la memoria implican la detección de la presencia o ausencia en muestras de uno o más ácidos nucleicos que comprenden o que consisten en los enumerados en a) - u) definidos anteriormente.
- 35 **[0168]** A este respecto, la cita "un ácido nucleico derivado de y específico para" un taxón dado, tal como se define para los ácidos nucleicos enumerados en a) "Zm", b) "Bn", c) "Gm", o) "Or", p) "Bv", q) "Gs", y t) "St", significa que dicho ácido nucleico en la muestra se origina del material genético, preferentemente ADN genómico, de dicho taxón dado y no está presente - y así no sería detectable usando el método de detección elegido - en el material genético originado de otros taxones, tales como los taxones restantes enumerados anteriormente. A modo de ejemplo y no de limitación, dichos ácido nucleico derivado del taxón dado puede no tener homólogos en otros taxones o sus homólogos en otros taxones pueden tener secuencias suficientemente distintas de modo que no se detectarían por el método de detección elegido. Por ejemplo, en un sitio de detección, por ejemplo, en un sitio en el cual hibridaría una sonda o uno o más cebadores de amplificación dentro del ácido nucleico dado, dichos homólogos pueden mostrarse menos del 100% de identidad de secuencia, preferentemente menos del 95%, incluso más preferentemente menos del 90%, aún más preferentemente menos del 85%, aún más preferentemente menos del 80%, y mucho más preferentemente menos del 75%, en realizaciones ejemplares preferidas menos del 70%, menos del 65%, menos del 60%, menos del 55% o menos del 50% de identidad de secuencia con el ácido nucleico dado.
- 40 **[0169]** Además, el término ácido nucleico "derivado de" que se usa especialmente en a) - u) significa que dichos ácidos nucleicos se originan de sus respectivos taxones, elementos genéticos, genes, pauta abierta de lectura, etc., aunque pueden - como se encuentran en la muestra - diferir en parte estructuralmente de los mismos.
- 45 **[0170]** Por ejemplo, el procesamiento corriente debajo de material vegetal puede causar alteraciones en la estructura de ácido nucleico (por ejemplo, ADN), y quizás de forma muy notable puede causar fragmentación del mismo. Además, a veces pueden usarse fragmentos funcionales o variantes de elementos de longitud completa en plantas transgénicas. Por consiguiente, los ácidos nucleicos "derivados de" los recitados en a) - u) anteriores pueden ser, por ejemplo, fragmentos de los mismos, en la medida en que dichos fragmentos permiten su atribución específica a los ácidos nucleicos original. Por ejemplo, dichos fragmentos pueden incluir al menos 15 pb continuas de la secuencia de la cual derivan, preferentemente al menos 20 pb continuas, por ejemplo, al menos 30 o al menos 40 pb continuas, más preferentemente al menos 50 pb continuas, por ejemplo, al menos 60 o al menos 70 pb continuas, incluso más preferentemente al menos 80 pb continuas, por ejemplo, al menos 90 pb continuas, aún más preferentemente al menos 100 pb continuas, por ejemplo, al menos 150 pb continuas, aún más preferentemente al menos 200 pb continuas, por ejemplo, al menos 300 pb continuas, al menos 400 pb continuas o al menos 500 pb continuas o más y pueden incluso incluir elementos de longitud completa.
- 60 **[0170]** Por ejemplo, el procesamiento corriente debajo de material vegetal puede causar alteraciones en la estructura de ácido nucleico (por ejemplo, ADN), y quizás de forma muy notable puede causar fragmentación del mismo. Además, a veces pueden usarse fragmentos funcionales o variantes de elementos de longitud completa en plantas transgénicas. Por consiguiente, los ácidos nucleicos "derivados de" los recitados en a) - u) anteriores pueden ser, por ejemplo, fragmentos de los mismos, en la medida en que dichos fragmentos permiten su atribución específica a los ácidos nucleicos original. Por ejemplo, dichos fragmentos pueden incluir al menos 15 pb continuas de la secuencia de la cual derivan, preferentemente al menos 20 pb continuas, por ejemplo, al menos 30 o al menos 40 pb continuas, más preferentemente al menos 50 pb continuas, por ejemplo, al menos 60 o al menos 70 pb continuas, incluso más preferentemente al menos 80 pb continuas, por ejemplo, al menos 90 pb continuas, aún más preferentemente al menos 100 pb continuas, por ejemplo, al menos 150 pb continuas, aún más preferentemente al menos 200 pb continuas, por ejemplo, al menos 300 pb continuas, al menos 400 pb continuas o al menos 500 pb continuas o más y pueden incluso incluir elementos de longitud completa.
- 65 **[0170]** Por ejemplo, el procesamiento corriente debajo de material vegetal puede causar alteraciones en la estructura de ácido nucleico (por ejemplo, ADN), y quizás de forma muy notable puede causar fragmentación del mismo. Además, a veces pueden usarse fragmentos funcionales o variantes de elementos de longitud completa en plantas transgénicas. Por consiguiente, los ácidos nucleicos "derivados de" los recitados en a) - u) anteriores pueden ser, por ejemplo, fragmentos de los mismos, en la medida en que dichos fragmentos permiten su atribución específica a los ácidos nucleicos original. Por ejemplo, dichos fragmentos pueden incluir al menos 15 pb continuas de la secuencia de la cual derivan, preferentemente al menos 20 pb continuas, por ejemplo, al menos 30 o al menos 40 pb continuas, más preferentemente al menos 50 pb continuas, por ejemplo, al menos 60 o al menos 70 pb continuas, incluso más preferentemente al menos 80 pb continuas, por ejemplo, al menos 90 pb continuas, aún más preferentemente al menos 100 pb continuas, por ejemplo, al menos 150 pb continuas, aún más preferentemente al menos 200 pb continuas, por ejemplo, al menos 300 pb continuas, al menos 400 pb continuas o al menos 500 pb continuas o más y pueden incluso incluir elementos de longitud completa.



**[0171]** Otras modificaciones de ácidos nucleicos esperadas del procesamiento corriente debajo de material vegetal, por ejemplo, desaminación parcial, etc., también se contemplan bajo el término "derivado de".

**[0172]** En una realización preferida, el ácido nucleico a) "Zm" deriva del gen de la alcohol deshidrogenasa I endógena (*adh-1*) de *Zea mays*. Una secuencia ejemplar pero no limitante del gen *adh-1* de *Zea mays* se encuentra en el número de acceso AF123535.1 en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

**[0173]** En una realización preferida adicional, el ácido nucleico b) "Bn" deriva del gen de la acetil-CoA carboxilasa endógena (*acc*) o el gen de la cruciferina endógena de *Brassica napus*. Una secuencia ejemplar pero no limitante del gen *acc* de *Brassica napus* se encuentra en el número de acceso X77576.1 en la base de datos GenBank; una secuencia ejemplar del gen de la cruciferina de *Brassica napus* se encuentra en el número de acceso X14555.1 en la base de datos GenBank.

**[0174]** En una realización preferida adicional, el ácido nucleico c) "Gm" deriva del gen de la lectina endógena (*lec*) de *Glycine max*. Una secuencia ejemplar pero no limitante del gen *lec* de *Glycine max* se encuentra en el número de acceso K00821.1 en la base de datos GenBank.

**[0175]** En una realización preferida adicional, el ácido nucleico o) "Or" deriva del gen de la fosfolipasa D endógena (*pld*) de *Oryza sativa*. Una secuencia ejemplar pero no limitante del gen *pld* de *Oryza sativa* se encuentra en el número de acceso AB001919.

**[0176]** En una realización preferida, el ácido nucleico p) "Bv" deriva del gen de la glutamina sintetasa endógena (*GluA3*) de *Beta vulgaris*. Una secuencia ejemplar pero no limitante del gen *GluA3* de *Beta vulgaris* se encuentra en el número de acceso AY026353.1 en la base de datos GenBank.

**[0177]** En una realización preferida, el ácido nucleico q) "Gs" deriva del gen del homólogo 7 de sinopsis arábidoopsis endógeno (*sah-7*) de *Gossypium*. Una secuencia ejemplar pero no limitante del gen *sah-7* de *Gossypium* se encuentra en el número de acceso AY117067 (Autores: Senchina et al. 2003, Mol Biol Evol 20 (4): 633-643) en la base de datos GenBank).

**[0178]** En una realización preferida, el ácido nucleico t) "St" deriva del gen de la UDP-glucosa pirofosforilasa endógena (*UGPasa*) de *Solanum tuberosum*. Una secuencia ejemplar pero no limitante del gen *UGPasa* de *Solanum tuberosum* se encuentra en el número de acceso U20345 en la base de datos GenBank.

**[0179]** En una realización preferida adicional, el ácido nucleico genérico derivado de plantas deriva del gen RBCL de cloroplastos endógeno (*rbcl*) de *Zea mays*. Una secuencia ejemplar pero no limitante del gen *rbcl* de *Zea mays* se encuentra en el número de acceso Z11973.1 en la base de datos GenBank.

**[0180]** Un experto en la materia sería capaz de diseñar y verificar sondas específicas o pares de cebadores a partir de las secuencias citadas anteriormente para su uso en las etapas de detección del presente método.

**[0181]** Las referencias a elementos de secuencia y genes recitadas en esta memoria para los ácidos nucleicos enumerados en d) - n), r), s) y u) son conocidas para un experto en la materia en el campo de la modificación genética de plantas. Por tanto, un experto en la materia entiende a qué secuencias se refieren estas designaciones y también apreciaría el nivel de alteraciones a estas decencias que es habitual en la generación de plantas transgénicas.

**[0182]** En un ejemplo, el ácido nucleico presente en un evento transgénico puede incluir la pauta abierta de lectura o una parte funcional de la misma (es decir, una parte que consigue el efecto deseado en la planta transgénica) de los genes recitados en la presente memoria, esp. los genes enumerados en f) - n), r), s) y u) anteriores.

**[0183]** No obstante, a modo de aclaración adicional y no de limitación, aquí se enumeran secuencias ejemplares para los genes y elementos particular mencionados en d) - n), r), s) y u), y un ácido nucleico genérico derivado de plantas ejemplar:

55	Elemento de secuencia / gen	número de acceso a GenBank
	promotor p35S de CMV	V00140 (genoma CAMV completo)
	terminador NOS	V00087.1
	ORF Cry1Ab	AF465640
60	ORF gen <i>bar</i>	AY346130.1
	ORF gen <i>pat</i>	DQ156557.1
	ORF gen <i>EPSPS</i>	AY125353.1
	ORF gen <i>Cry3A</i> modificado	AR836206.1
	promotor <i>Glb1</i>	CS155614.1
65	ORF gen <i>Cry3Bb1</i>	CS410008.1

	ORF gen <i>Bxn</i>	E01313.1
	ORF gen <i>Cry1Ac</i>	EF094884.1
	ORF gen <i>Cry2Ab2</i>	DQ361266.1
	ORF gen <i>Gbss</i>	X58453.1
5	gen <i>rbcl</i> de cloroplastos de <i>Zea mays</i>	Z11973.1

**[0184]** Se apreciará que los ácidos nucleicos realmente presentes en eventos de plantas transgénicas pueden comprender secuencias que pueden diferir en algún grado de las anteriores secuencias ejemplares. Por ejemplo, dichas diferencias pueden incluir deleciones, adicionales y/o sustituciones de bases, truncamientos (por ejemplo, inclusión de fragmentos funcionales), fusiones con otros elementos (por ejemplo, fusión para transporte de membrana o señales de clasificación de orgánulos), etc.

**[0185]** Las secuencias reales de los anteriores y otros elementos encontradas en los eventos transgénicos se han determinado en muchos casos y son accesibles mediante GenBank y otras bases de datos de secuencias. Por consiguiente, se realizarán alineaciones de secuencia para identificar regiones dentro de los anteriores ácidos nucleicos más adecuados para derivación de sondas o amplicones de los mismos.

**[0186]** Por tanto, una sonda o un amplicón (y el correspondiente conjunto de cebadores) pueden derivarse ventajosamente de partes de cada uno de los anteriores ácidos nucleicos que se encuentran en la mayoría de los eventos transgénicos y/o que muestran la mayor identidad de secuencia entre los diversos eventos transgénicos. Dicha sonda o par de cebadores aumentará la probabilidad de detección de ese ácido nucleico particular entre diversos eventos transgénicos. Un experto en la materia puede seguir estas instrucciones para realizar las alineaciones de secuencia necesarias.

**[0187]** Como se expone en la sección de descripción resumida, la invención también proporciona un modo ventajoso de concluir la presencia potencial o ausencia de material de uno o más eventos de plantas transgénicas de interés a usar en la etapa (2) de los anteriores métodos. En particular, los resultados obtenidos para la muestra en la etapa (1) están representados como un conjunto  $G_{SAM}$  que simboliza un grupo de aquellos ácidos nucleicos, elegidos entre los que comprenden o que consisten en los enumerados en a) - u) anteriores, que se detectaron como presentes en la muestra; y comparando dicho conjunto  $G_{SAM}$  con uno o más conjuntos de interés  $G_X$  que representan los eventos individuales a evaluar. Los conjuntos de interés  $G_X$  constan de, es decir, representan un grupo de aquellos ácidos nucleicos elegidos entre los que comprenden o que consisten en los enumerados en a) - u) anteriores que se encontraron en los respectivos eventos y así se detectarían en la etapa (1) (en la medida en que dicha etapa (1) detecta la presencia de dichos ácidos nucleicos) si la muestra contuviera material derivado de los respectivos eventos, o un cruce que implica éstos, o un evento relacionado.

**[0188]** La siguiente Tabla 3 enumera qué ácidos nucleicos de los enumerados en a) - u) anteriores están presentes en eventos particulares de interés:

Tabla 3. Características de eventos.

Evento	a	b	c	d	e	f	g	h	i	J	k	l	m	n	o	p	q	r	s	t	u
Bt176	+	-	-	+	-	+	+														
Bt11	+	-	-	+	+	+	-	+													
Bt10	+	-	-	+	+	+	-	+													
MON810	+	-	-	+	+	+															
MON863	+	-	-	+	+																
TC1507	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NK603	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T25	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GA21	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DAS-59122	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MIR604	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LY038	+	-	-	+	+						+	+									
MON88017	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Topas 19/2	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MS1	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RF1	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RF2	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RF3	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MS8	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GT73	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T45	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Liberator pHoe6/Ac	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Evento	a	b	c	d	e	f	g	h	i	J	k	l	m	n	o	p	q	r	s	t	u	
GS40/90pHoe6/Ac	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MS1/RF1	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MS1/RF2	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MS8/RF3	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
OXY235	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
MON 40-3-2	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MON89788	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
A2704-12	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
A5547-127	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
LL62	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	
LL06	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
LL601	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
T120-7	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
H7-1	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
A5-15	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
LL cotton 25	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
MON 1445	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
MON 53 1	-	-	-	+	+												+	+	-	-	-	
MON 15985	-	-	-	+	+												+	+	+	-	-	
EH-92-527-1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

[0189] Como ya se ha explicado:

- 5 - si  $G_X$  es igual a  $G_{SAM}$  ( $G_X = G_{SAM}$ ), entonces el material derivado del evento de planta transgénica X o de un cruce del mismo, o de un evento relacionado con el mismo, está potencialmente presente en la muestra;
- si  $G_X$  es un subconjunto apropiado de  $G_{SAM}$  ( $G_X \subset G_{SAM}$ ), entonces el material derivado del evento de planta transgénica X o de un cruce del mismo, o de un evento relacionado con el mismo, está potencialmente presente en la muestra;
- 10 - si  $G_X$  no es igual a  $G_{SAM}$  y  $G_X$  no es un subconjunto apropiado de  $G_{SAM}$ , ( $G_X \neq G_{SAM}$  y  $G_X \not\subset G_{SAM}$ ), entonces el material derivado del evento de planta transgénica X o de un cruce del mismo, o de un evento relacionado con el mismo, está ausente de la muestra.

15 [0190] En una realización preferida adicional, si  $G_X$  es igual a  $G_{SAM}$ , y si ningún conjunto o la suma de dos o más conjuntos que representan eventos (en particular, conjuntos que representan eventos elegidos entre un grupo que comprende o que consiste en:  $G_{Bt176}$ ,  $G_{Bt11}$ ,  $G_{Bt10}$ ,  $G_{MON810}$ ,  $G_{MON863}$ ,  $G_{TC1507}$ ,  $G_{NK603}$ ,  $G_{T25}$ ,  $G_{GA21}$ ,  $G_{DAS-59122}$ ,  $G_{MIR604}$ ,  $G_{LY038}$ ,  $G_{MON88017}$ ,  $G_{Topas19/2}$ ,  $G_{MS1}$ ,  $G_{RF1}$ ,  $G_{RF2}$ ,  $G_{MS1/RF1}$ ,  $G_{MS1/RF2}$ ,  $G_{MS8}$ ,  $G_{RF3}$ ,  $G_{MS8/RF3}$ ,  $G_{GT73}$ ,  $G_{T45}$ ,  $G_{LiberatorpHoe6/Ac}$ ,  $G_{GS40/90pHoe6/Ac}$ ,  $G_{OXY235}$ ,  $G_{MON40-3-2}$ ,  $G_{MON89788}$ ,  $G_{A2704-12}$ ,  $G_{A5547-127}$ ,  $G_{LL62}$ ,  $G_{LL06}$ ,  $G_{LL601}$ ,  $G_{T120-7}$ ,  $G_{H7-1}$ ,  $G_{A5-15}$ ,  $G_{LLcotton25}$ ,  $G_{MON1445}$ ,  $G_{MON531}$ ,  $G_{MON15985}$  y  $G_{EH92-527-1}$ ) diferente de  $G_X$  es igual a  $G_X$ , entonces el material derivado del evento de planta transgénica X o de un cruce del mismo, o de un evento relacionado con el mismo, está presente en la muestra.

25 [0191] En un desarrollo adicional de este modo de evaluación, a los ácidos nucleicos que comprenden o que consisten en los enumerados en a) - u) anteriores se les asignan valores únicos respectivos. Por tanto, al conjunto  $G_{SAM}$  entonces se le asigna un valor " $VG_{SAM}$ " que es un múltiplo de los valores únicos asignados a aquellos ácidos nucleicos detectados en la etapa (1) como presentes en la muestra; y a un conjunto de interés  $G_X$  se le asigna un valor " $VG_X$ " que es un múltiplo de los valores únicos asignados a aquellos ácidos nucleicos elegidos entre los que comprenden o que consisten en los enumerados en a) - u) anteriores que se encontraron dicho evento y así se

30 detectarían en la etapa (1).

[0192] Por consiguiente, en un ejemplo preferido, a ácidos nucleicos "Zm", "Bn", "Gm", "p35S", "tNOS", "Cry1Ab", "PAT/bar", "PAT/pat", "CP4-EPSPS", "mCry3A", "cordap A", "Glb1", "Cry3Bb1", "Bxn", "Or", "Bv", "Gs", "Cry1Ac", "Cry2ab2", "St" y "Gbss" se les asignarían valores únicos respectivos " $V_{Zm}$ ", " $V_{Bn}$ ", " $V_{Gm}$ ", " $V_{p35S}$ ", " $V_{tNOS}$ ", " $V_{Cry1Ab}$ ", " $V_{PAT/bar}$ ", " $V_{PAT/pat}$ ", " $V_{CP4-EPSPS}$ ", " $V_{mCry3A}$ ", " $V_{cordapA}$ ", " $V_{Glb1}$ ", " $V_{Cry3Bb1}$ ", " $V_{Bxn}$ ", " $V_{Or}$ ", " $V_{Bv}$ ", " $V_{Gs}$ ", " $V_{Cry1Ac}$ ", " $V_{Cry2ab2}$ ", " $V_{St}$ " y " $V_{Gbss}$ ";

y a cada conjunto de interés  $G_X$  se le asignaría un valor respectivo " $VG_X$ " elegido entre valores del grupo que comprende o que consiste en valores " $VG_{Bt176}$ ", " $VG_{Bt11}$ ", " $VG_{Bt10}$ ", " $VG_{MON810}$ ", " $VG_{MON863}$ ", " $VG_{TC1507}$ ", " $VG_{NK603}$ ", " $VG_{T25}$ ", " $VG_{GA21}$ ", " $VG_{DAS-59122}$ ", " $VG_{MIR604}$ ", " $VG_{LY038}$ ", " $VG_{MON88017}$ ", " $VG_{Topas 19/2}$ ", " $VG_{MS1}$ ", " $VG_{RF1}$ ", " $VG_{RF2}$ ", " $VG_{MS1/RF1}$ ", " $VG_{MS1/RF2}$ ", " $VG_{MS8}$ ", " $VG_{RF3}$ ", " $VG_{MS8/RF3}$ ", " $VG_{GT73}$ ", " $VG_{T45}$ ", " $VG_{LiberatorpHoe6/Ac}$ ", " $VG_{GS40/90pHoe6/Ac}$ ", " $VG_{OXY235}$ ", " $VG_{MON40-3-2}$ ", " $VG_{MON89788}$ ", " $VG_{A2704-12}$ ", " $VG_{A5547-127}$ ", " $VG_{LL62}$ ", " $VG_{LL06}$ ", " $VG_{LL601}$ ", " $VG_{T120-7}$ ", " $VG_{H7-1}$ ",

"VG<sub>A5-15</sub>", "VG<sub>LLcotton25</sub>", "VG<sub>MON1445</sub>", "VG<sub>MON531</sub>", "VG<sub>MON15985</sub>" y "VG<sub>EH92-527-1</sub>", en los cuales:

- VG<sub>Bt176</sub> = V<sub>Zm</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>Cry1Ab</sub> X V<sub>PAT/bar</sub>,
- VG<sub>Bt11</sub> = V<sub>Zm</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>tNOS</sub> X V<sub>Cry1Ab</sub> X V<sub>PAT/pat</sub>,
- 5 - VG<sub>Bt10</sub> = V<sub>Zm</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>tNOS</sub> X V<sub>Cry1Ab</sub> X V<sub>PAT/pat</sub>,
- VG<sub>MON810</sub> = V<sub>Zm</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>tNOS</sub> X V<sub>Cry1Ab</sub>,
- VG<sub>MON863</sub> = V<sub>Zm</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>tNOS</sub>,
- VG<sub>TC1507</sub> = V<sub>Zm</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>PAT/pat</sub>,
- VG<sub>NK603</sub> = V<sub>Zm</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>tNOS</sub> X V<sub>CP4-EPSPS</sub>,
- 10 - VG<sub>T25</sub> = V<sub>Zm</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>PAT/pat</sub>,
- VG<sub>GA21</sub> = V<sub>Zm</sub> X V<sub>tNOS</sub>,
- VG<sub>DAS-59122</sub> = V<sub>Zm</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>PAT/bar</sub>,
- VG<sub>MIR604</sub> = V<sub>Zm</sub> X V<sub>tNOS</sub> X V<sub>mCry3A</sub>,
- VG<sub>LY038</sub> = V<sub>Zm</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>tNOS</sub> X V<sub>cordapA</sub> X V<sub>Glb1</sub>,
- 15 - VG<sub>MON88017</sub> = V<sub>Zm</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>tNOS</sub> X V<sub>CP4-EPSP</sub> X V<sub>Cry3Bb1</sub>,
- VG<sub>Topas 19/2</sub> = V<sub>Bn</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>PAT/pat</sub>,
- VG<sub>MS1</sub> = V<sub>Bn</sub> X V<sub>tNOS</sub> X V<sub>PAT/bar</sub>,
- VG<sub>RF1</sub> = V<sub>Bn</sub> X V<sub>tNOS</sub> X V<sub>PAT/bar</sub>,
- VG<sub>RF2</sub> = V<sub>Bn</sub> X V<sub>tNOS</sub> X V<sub>PAT/bar</sub>,
- 20 - VG<sub>MS8</sub> = V<sub>Bn</sub> X V<sub>tNOS</sub> X V<sub>PAT/bar</sub>,
- VG<sub>RF3</sub> = V<sub>Bn</sub> X V<sub>tNOS</sub> X V<sub>PAT/bar</sub>,
- VG<sub>MS1/RF1</sub> = V<sub>Bn</sub> X V<sub>tNOS</sub> X V<sub>PAT/bar</sub>,
- VG<sub>MS1/RF2</sub> = V<sub>Bn</sub> X V<sub>tNOS</sub> X V<sub>PAT/bar</sub>,
- VG<sub>MS8/RF3</sub> = V<sub>Bn</sub> X V<sub>tNOS</sub> X V<sub>PAT/bar</sub>,
- 25 - VG<sub>GT73</sub> = V<sub>Bn</sub> X V<sub>CP4-EPSPS</sub>,
- VG<sub>T45</sub> = V<sub>Bn</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>PAT/pat</sub>,
- VG<sub>Liberator pHoe6/Ac</sub> = V<sub>Bn</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>PAT/pat</sub>,
- VG<sub>GS40/90pHoe6/Ac</sub> = V<sub>Bn</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>PAT/pat</sub>,
- VG<sub>OXY235</sub> = V<sub>Bn</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>Bxn</sub>,
- 30 - VG<sub>MON40-3-2</sub> = V<sub>Gm</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>tNOS</sub> X V<sub>CP4-EPSPS</sub>,
- VG<sub>MON89788</sub> = V<sub>Gm</sub> X V<sub>CP4-EPSPS</sub>,
- VG<sub>2704-12</sub> = V<sub>Gm</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>PAT/pat</sub>,
- VG<sub>A5547-127</sub> = V<sub>Gm</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>PAT/pat</sub>,
- VG<sub>LL62</sub> = V<sub>Or</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>PAT/bar</sub>,
- 35 - VG<sub>LL06</sub> = V<sub>Or</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>PAT/bar</sub>,
- VG<sub>LL601</sub> = V<sub>Or</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>tNOS</sub> X V<sub>PAT/bar</sub>,
- VG<sub>T120-7</sub> = V<sub>Bv</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>PAT/pat</sub>,
- VG<sub>H7-1</sub> = V<sub>Bv</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>CP4-EPSPS</sub>,
- VG<sub>A5-15</sub> = V<sub>Bv</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>tNOS</sub> X V<sub>CP4-EPSPS</sub>,
- 40 - VG<sub>LL cotton 25</sub> = V<sub>Gs</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>tNOS</sub> X V<sub>PAT/bar</sub>,
- VG<sub>MON1445</sub> = V<sub>Gs</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>tNOS</sub> X V<sub>CP4-EPSPS</sub>,
- VG<sub>MON531</sub> = V<sub>Gs</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>tNOS</sub> X V<sub>Cry1Ac</sub>,
- VG<sub>MON15985</sub> = V<sub>Gs</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>tNOS</sub> X V<sub>Cry1Ac</sub> X V<sub>Cry1Ac</sub>,
- y VG<sub>EH92-527-1</sub> = V<sub>St</sub> X V<sub>tNOS</sub> X V<sub>Gbss</sub>.

45 **[0193]** Obsérvese que en la medida en que los métodos no ensayan la presencia de todos los ácidos nucleicos en a) - u), los valores anteriores se definirán en términos de aquellos ácidos nucleicos cuya presencia se ensaya de forma eficiente. A modo de ejemplo y no de limitación, cuando no se ensaya la presencia de ácidos nucleicos enumerados en j) - n), r) s) y u) definidos anteriormente, que corresponden a rasgos específicos además de los  
50 definidos en d) - i), entonces los valores correspondientes a varios eventos pueden definirse de un modo más estrecho, en particular: evento de maíz valores VG<sub>MIR604</sub> = V<sub>Zm</sub> X V<sub>tNOS</sub>, VG<sub>LY038</sub> = V<sub>Zm</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>tNOS</sub>, VG<sub>MON88017</sub> = V<sub>Zm</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>tNOS</sub> X V<sub>CP4-EPSP</sub>, evento de colza oleaginosa valor VG<sub>OXY235</sub> = V<sub>Bn</sub> X V<sub>p35S</sub>, evento de algodón valores VG<sub>MON531</sub> = V<sub>Gs</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>tNOS</sub>, VG<sub>MON15985</sub> = V<sub>Gs</sub> X V<sub>p35S</sub> X V<sub>tNOS</sub>, evento de patata valor VG<sub>EH92-527-1</sub> = V<sub>St</sub> X V<sub>tNOS</sub>.

55 **[0194]** Por consiguiente, la etapa (iii) de esta realización comprendería realizar para cada conjunto de interés Gx operaciones lógicas:

- si VG<sub>SAM</sub> / VG<sub>X</sub> es igual a 1, entonces el material derivado / del evento de planta transgénica X o de un cruce del mismo, o de un evento relacionado con el mismo, está potencialmente presente en la muestra;
- 60 - si VG<sub>SAM</sub> / VG<sub>X</sub> es igual a un valor o un múltiplo de dos o más valores elegidos entre un grupo que comprende o que consiste en los valores V<sub>Zm</sub>, V<sub>Bn</sub>, V<sub>Gm</sub>, V<sub>p35S</sub>, V<sub>tNOS</sub>, V<sub>Cry1Ab</sub>, V<sub>PAT/bar</sub>, V<sub>PAT/pat</sub>, V<sub>CP4-EPSPS</sub>, V<sub>mCry3A</sub>, V<sub>cordapA</sub>, V<sub>Glb1</sub>, V<sub>Cry3Bb1</sub>, V<sub>Bxn</sub>, V<sub>Or</sub>, V<sub>Bv</sub>, V<sub>Gs</sub>, V<sub>Cry1Ac</sub>, V<sub>Cry2ab2</sub>, V<sub>st</sub> y V<sub>Gbss</sub>, entonces el material derivado del evento de planta transgénica X o de un cruce del mismo, o de un evento relacionado con el mismo, está potencialmente presente  
65 en la muestra;

- si  $VG_{SAM} / VG_X$  no es igual a 1 y no es igual a un valor o un múltiplo de dos o más valores elegidos entre un grupo que comprende o que consiste en los valores  $V_{Zm}$ ,  $V_{Bn}$ ,  $V_{Gm}$ ,  $V_{p35S}$ ,  $V_{tNOS}$ ,  $V_{Cry1Ab}$ ,  $V_{PAT/bar}$ ,  $V_{PAT/pat}$ ,  $V_{CP4-EPSPS}$ ,  $V_{mCry3A}$ ,  $V_{cordapA}$ ,  $V_{Glb1}$ ,  $V_{Cry3Bb1}$ ,  $V_{Bxn}$ ,  $V_{Or}$ ,  $V_{Bv}$ ,  $V_{Gs}$ ,  $V_{Cry1Ac}$ ,  $V_{Cry2ab2}$ ,  $V_{st}$  y  $V_{Gbss}$ , entonces el material derivado del evento de planta transgénica X o de un cruce del mismo, o de un evento relacionado con el mismo, está ausente de la muestra.

5

**[0195]** En una variante preferida adicional de la realización anterior, si  $VG_{SAM} / VG_X$  es igual a 1, y si ningún valor o el múltiplo de dos o más valores de conjuntos que representan eventos (en particular, valores elegidos entre un grupo que comprende o que consiste en  $VG_{Bt176}$ ,  $VG_{Bt11}$ ,  $VG_{Bt10}$ ,  $VG_{MON810}$ ,  $VG_{MON863}$ ,  $VG_{TC1507}$ ,  $VG_{NK603}$ ,  $VG_{T25}$ ,  $VG_{GA21}$ ,  $VG_{DAS-59122}$ ,  $VG_{MIR604}$ ,  $VG_{LY038}$ ,  $VG_{MON88017}$ ,  $VG_{Topas 19/2}$ ,  $VG_{MS1}$ ,  $VG_{RF1}$ ,  $VG_{RF2}$ ,  $VG_{MS1/RF1}$ ,  $VG_{MS1/RF2}$ ,  $VG_{MS8}$ ,  $VG_{RF3}$ ,  $VG_{MS8/RF3}$ ,  $VG_{GT73}$ ,  $VG_{T45}$ ,  $VG_{LiberatorpHoe6/Ac}$ ,  $VG_{GS40/90pHoe6/Ac}$ ,  $VG_{OXY235}$ ,  $VG_{MON40-3-2}$ ,  $VG_{MON89788}$ ,  $VG_{A2704-12}$ ,  $VG_{A5547-127}$ ,  $VG_{LL62}$ ,  $VG_{LL06}$ ,  $VG_{LL601}$ ,  $VG_{T120-7}$ ,  $VG_{H7-1}$ ,  $VG_{A5-15}$ ,  $VG_{LLcotton25}$ ,  $VG_{MON1445}$ ,  $VG_{MON531}$ ,  $VG_{MON15985}$  y  $VG_{EH92-527-1}$ ) diferente de  $VG_X$  es igual a  $VG_X$ , entonces el material derivado del evento de planta transgénica X o de un cruce del mismo, o de un evento relacionado con el mismo, está presente en la muestra.

15

**[0196]** En una realización preferida adicional, los valores únicos asignados a los ácidos nucleicos que comprenden o que consisten en los enumerados en a) - u), es decir, los valores elegidos entre el grupo que comprende o que consiste en  $V_{Zm}$ ,  $V_{Bn}$ ,  $V_{Gm}$ ,  $V_{p35S}$ ,  $V_{tNOS}$ ,  $V_{Cry1Ab}$ ,  $V_{PAT/bar}$ ,  $V_{PAT/pat}$ ,  $V_{CP4-EPSPS}$ ,  $V_{mCry3A}$ ,  $V_{cordapA}$ ,  $V_{Glb1}$ ,  $V_{Cry3Bb1}$ ,  $V_{Bxn}$ ,  $V_{Or}$ ,  $V_{Bv}$ ,  $V_{Gs}$ ,  $V_{Cry1Ac}$ ,  $V_{Cry2ab2}$ ,  $V_{st}$  y  $V_{Gbss}$  son números primos únicos, y la etapa (iii) comprende realizar para cada conjunto de interés  $G_X$  operaciones lógicas,

20

- si  $VG_{SAM} / VG_X$  es igual a 1, entonces el material derivado del evento de planta transgénica X o de un cruce del mismo, o de un evento relacionado con el mismo, está potencialmente presente en la muestra;
- si  $VG_{SAM} / VG_X$  es un número entero mayor de 1, entonces el material derivado del evento de planta transgénica X o de un cruce del mismo, o de un evento relacionado con el mismo, está potencialmente presente en la muestra;
- si  $VG_{SAM} / VG_X$  no es un número entero, entonces el material derivado del evento de planta transgénica X o de un cruce del mismo, o de un evento relacionado con el mismo, está ausente de la muestra.

25

30

**[0197]** Los inventores reconocieron que el uso de números primos para representar los rasgos ensayados individuales (ácidos nucleicos), como se describe en el párrafo anterior, es particularmente directo y ventajosamente racionalizado y facilita el análisis de los datos.

35

**[0198]** En vista de ello, los inventores también contemplan la aplicabilidad general del método de análisis de datos explicado en la presente memoria usando números primos en otras aplicaciones, tales como, por ejemplo, en el campo de biología molecular o medicina molecular, etc. Por tanto, en una aplicación, el método puede usarse generalmente para determinar la composición de una muestra, en el cual dicha muestra puede contener dos o más eventos diferentes (la palabra evento como se usa en este párrafo tiene un significado general no limitado a eventos de plantas transgénicas) o material de los mismos, en el cual cada evento se caracteriza por una o más características o rasgos (las palabras características y rasgos como se usan en este párrafo conllevan un significado general no limitado a, aunque incluyendo preferentemente, ácidos nucleicos). Por tanto, la muestra así como cada evento puede representarse como un producto (es decir, operación "x") de valores primos únicos asignados a cada una de las características o rasgos ensayados, y la presencia (potencial) o ausencia de dicho evento o material del mismo en dicha muestra puede ensayarse dividiendo (es decir, operación "/" ) el valor obtenido para la muestra por el valor calculado y asignado a cada evento individual, y considerando el resultado de dicha división como se ha descrito anteriormente *mutatis mutandis*.

40

45

50

**[0199]** En una realización preferida, las etapas anteriores de cálculo de la etapa (2) del método se realizan mediante un dispositivo de computación, por ejemplo, una calculadora o un ordenador; y en aspectos adicionales, la invención también contempla un dispositivo de computación que realiza los anteriores cálculos, un soporte de datos (por ejemplo, un disquete, CD-ROM, etc.) que comprende instrucciones para que un dispositivo de computación programable realice la etapa (2) del método de la invención, incluyendo los anteriores cálculos. La memoria también describe un kit que comprende dicho soporte de datos junto a uno o más reactivos también útiles en los métodos de la memoria. Además, la memoria describe una aplicación basada en red que permite realizar el algoritmo de la etapa (2), opcionalmente en la cual puede accederse a la información acerca de eventos potencialmente presentes en la muestra directamente en una base de datos asociada mediante un hipervínculo incluido.

55

60

**[0200]** Debe apreciarse que los identificadores " $G_{SAM}$ ", " $G_X$ ", " $VG_{SAM}$ ", " $VG_X$ " etc. usados en la anterior descripción se eligieron arbitrariamente en la presente memoria para representar los conceptos subyacentes de *inter alia* conjuntos y valores, respectivamente, y que pueden sustituirse por otros identificadores (por ejemplo, otras letras, palabras o expresiones) para representar dichos conjuntos y valores.

65

**[0201]** Como se ha mencionado, el método de la memoria puede evaluar preferentemente la presencia o ausencia de ácidos nucleicos de interés, especialmente ácidos nucleicos elegidos entre el grupo que comprende o que

consiste en los enumerados en a) - u) anteriores, usando amplificación y particularmente amplificación por PCR de amplicones de los mismos.

**[0202]** Puede apreciarse que un experto en la materia puede ser capaz en general de diseñar conjuntos de cebadores individuales para amplificación específica a partir de secuencias conocidas de ácido nucleico.

**[0203]** No obstante, como ya se ha descrito, la Tabla 1 enumera pares de cebadores particularmente ventajosos que se han diseñado cuidadosamente por los inventores para proporcionar numerosos beneficios cuando se usan en la presente metodología. Además, la Tabla 4 enumera los cebadores de la Tabla 1 e incluye adicionalmente 10 cebadores y pares de cebadores adicionales que también funcionan muy satisfactoriamente en el presente método, aunque los cebadores de la Tabla 1 siguen siendo la elección principal de los inventores. Estos conjuntos de cebadores pueden conseguir ventajosamente la amplificación a partir de ácidos nucleicos respectivos presentes en los eventos vegetales relevantes y a partir de material vegetal diversamente procesado, e implican diversas ventajas como se describe en otra parte en esta memoria.

15

Tabla 4. Secuencias de cebadores.

Ácido nucleico	Cebadores
"Zm" (adh-1)	Dir: 5' CgTCgTTTCCCATCTCTTCCTCC 3' (SEC ID N° 1) Inv: 5' CCACTCCgAgACCCTCAgTC 3' (SEC ID N° 2)
"Zm" (adh-1)	Dir: 5' TCTCTTCCTCCTTTAGAGCTACCACTA 3' (SEC ID N° 56) Inv: 5' AATCGATCCAAAGCGAGATGA 3' (SEC ID N° 57)
"Bn" (ACC)	Dir1: 5' GAGAATGAGGAGGACCAAGCTC 3' (SEC ID N° 4) Dir2: 5'GGTGAGCTGTATAATCGAGCGA 3' (SEC ID N° 79) Inv: 5' GCGCAGCATCGGCT 3' (SEC ID N° 3)
"Bn" (cruciferina)	Dir: 5' CAGCTCAACAGTTTCCAAACGA 3' (SEC ID N° 24) Inv: 5' CGACCAGCCTCAGCCTTAAG 3' (SEC ID N° 25)
"Gm" (lectina)	Dir: 5' CATTACCTATgATgCCTCCACC 3' (SEC ID N° 5) Inv: 5' AAgCACgTCATgCgATTC 3' (SEC ID N° 6) Inv: 5' AAgCACgTCATgCgATTCC 3' (SEC ID N° 49)
"Gm" (lectina) (SLTM)	Dir: 5' AACCGGTAGCGTTGCCAG 3' (SEC ID N° 58) Inv: 5' AGCCCATCTGCAAGCCTTT 3' (SEC ID N° 59)
"p35S" (más largo)	Dir: 5'-GACAGTGGTCCCAAAGATGG-3' (SEC ID N° 7) Inv: 5'-GTCTTGCGAAGGATAGTGGG-3' (SEC ID N° 8)
"p35S" (más corto)	Dir: 5' AAAGCAAGTGGATTGATGTGATA 3' (SEC ID N° 60) Inv: 5' GGGTCTTGCGAAGGATAGTG 3' (SEC ID N° 61)
"tNOS" ("TNOS-D")	Dir: 5'-GATTAGAGTCCCgCAATTATACATTTAA-3' (SEC ID N° 9) Inv: 5'-TTATCCTAGKTTGCGCGCTATATTT-3' (SEC ID N° 10)
"tNOS" (TNOS-L)	Dir: 5' CGTTCAAACATTTGGCAATAAAG 3' (SEC ID N° 28) Inv: 5' AAATGTATAATTGCGGGACTCTAATC 3' (SEC ID N° 29)
"Cry1Ab"	Dir: 5'-ACCGGTTACTCCCATCGA-3' (SEC ID N° 11) Inv: 5'-CAGCACCTGGCAGGAACTC-3' (SEC ID N° 12)
"Cry1Ab"	Dir: 5' GACATCATCTGGGGYATCTT 3' (SEC ID N° 30) Inv: 5' GCGCTGTTCATGTGCTTGAA 3' (SEC ID N° 31)
"Cry1Ab"	Dir: 5' ACGCCTTCCTGGTGCAA 3' (SEC ID N° 47) Inv: 5' CCTGGTTCCTGGCGAACTC 3' (SEC ID N° 48)
"PAT/bar"	Dir: 5'-CGTCAACCACTACATCGAGACAA-3' (SEC ID N° 13) Inv: 5'-GTCCACTCCTGCGGTTCT-3' (SEC ID N° 14)
"PAT/pat"	Dir: 5'-CCGCGGTTTGTGATATCGTT-3' (SEC ID N° 15) Inv: 5'-TCTTGCAACCTCTCTAGATCATCAA-3' (SEC ID N° 16)
"CP4-EPSPS"	Dir1: 5-GGCTCTGAGCTTCGCTCCTCCTAAGG-3' (SEC ID N° 17) Dir1': 5'-GGCTCTGAGCTTCGCTCCTCCTAAGG-3' (SEC ID N° 50) Dir2: 5'-ATCAGTGGCTACAGCCTGCAT-3' (SEC ID N° 18) Inv: 5'-GAATGCGGACGGTCCGAAAG-3' (SEC ID N° 19)
"CP4-EPSPS"	Dir: 5' GCATGCTTCACGGTGCAA 3' (SEC ID N° 22) Inv: 5' GGACCTGTGGGAGATAGACTTGTC 3' (SEC ID N° 23) Inv 1: 5' TGAAGGACCGGTGGGAGAT 3' (SEC ID N° 62) Inv 2: 5' TGAAGGACCTGTGGGAGAT 3' (SEC ID N° 63)
"Or"	Dir: 5' GCTTAGGGAACAGGGAAGTAAAGTT 3' (SEC ID N° 20) Dir: 5' GCTTAGGGAACAGGGAAGTAAAGT 3' (SEC ID N° 51) Inv: 5' CTTAGCATAGTCTGTGCCATCCA 3' (SEC ID N° 21)
"Bv" (GluA3)	Dir: 5' GACCTCCATATTACTGAAAGGAAG 3' (SEC ID N° 64) Inv: 5' GAGTAATTGCTCCATCCTGTTCA 3' (SEC ID N° 65)

Ácido nucleico	Cebadores
"Gs"	Dir: 5' AGTTTGTAGGTTTTGATGTTACATTGAG 3' (SEC ID N° 66) Inv: 5' GCATCTTTGAACCGCCTACTG 3' (SEC ID N° 67)
"St" (UGPasa)	Dir: 5' GGACATGTGAAGAGACGGAGC 3' (SEC ID N° 68) Inv: 5' CCTACCTCTACCCCTCCGC 3' (SEC ID N° 69)
Planta genérica (Rbcl)	Dir: 5' AGGTCTAADGGRTAAGCTAC 3' (SEC ID N° 26) Inv: 5' AGYCTTGATCGTTACAAAGG 3' (SEC ID N° 27)

**[0204]** Donde la Tabla 4 incluye más de una fila que se refiere a la amplificación en un cierto ácido nucleico (tal como, por ejemplo, varias filas para "Cry1Ab" y "CP4-EPSPS") por diferentes conjuntos de cebadores, puede usarse uno cualquiera o más de dichos conjuntos de cebadores de dichas diferentes filas de la Tabla 4 para la amplificación. Donde la Tabla 4 enumera, dentro de una única fila, más de un cebador directo y/o inverso para la amplificación en un cierto ácido nucleico (tal como, por ejemplo, para "Bn" (ACC), "Gm" (lectina) o "CP4-EPSPS"), puede usarse uno cualquier o cualquier combinación de dicho cebador o cebadores directos conjuntamente con uno cualquiera o cualquier combinación de dicho cebador o cebadores inversos para obtener la amplificación.

**[0205]** Además, la memoria también describe cebadores variantes que incluyen una o más variaciones de secuencia frente a los cebadores enumerados en la Tabla 4, tales como, por ejemplo, una o más deleciones, inserciones y/o sustituciones, en la medida en que dichos cebadores / pares de cebadores aún puedan conseguir la amplificación adecuada de sus respectivos amplicones. Preferentemente, dichos cebadores variantes mostrarían al menos un 85%, más preferentemente al menos un 90%, incluso más preferentemente al menos un 95%, y aún más preferentemente al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98% o al menos un 99% de identidad de secuencia con los cebadores enumerados en la Tabla 4. Las alineaciones de secuencia y la determinación de la identidad de secuencia pueden hacerse, por ejemplo, usando la Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) originalmente descrita por Altschul et al. 1990 (J Mol Biol 215: 403-10), tal como el algoritmo "Blast 2 sequences" descrito por Tatusova y Madden 1999 (FEMS Microbiol Lett 174: 247-250).

**[0206]** Además, la memoria también describe cebadores y pares de cebadores anidados adecuados para la amplificación de amplicones desde dentro de aquellos amplificados a partir de los respectivos ácidos nucleicos usando los pares de cebadores enumerados en cualquiera de la Tabla 1 o Tabla 4.

**[0207]** La memoria también describe derivados, como se describe en otra parte en esta memoria, de los cebadores y pares de cebadores enumerados en cualquiera de la Tabla 1 o Tabla 4.

**[0208]** Por consiguiente, la memoria describe los cebadores y pares de cebadores enumerados en cualquiera de la Tabla 1 o Tabla 4, así como variantes y derivados de los mismos, opcionalmente en cualquiera combinación adecuada de dichos cebadores y/o pares de cebadores o variantes o derivados de los mismos.

**[0209]** La memoria también describe productos de amplificación que se pueden obtener de los respectivos ácidos nucleicos usando los anteriores cebadores y pares de cebadores, y particularmente usando pares de cebadores expuestos en cualquiera de la Tabla 1 o Tabla 4 o variantes o derivados de los mismos. Dichos productos de amplificación pueden procesarse adicionalmente, tal como, por ejemplo, aislarse, clonarse en vectores o plásmidos adecuados, transformarse en hospedadores recombinantes, por ejemplo, hospedadores bacterianos adecuados tales como *E. coli*, propagarse con los mismos y aislarse de los mismos, secuenciarse, etc.

**[0210]** Ventajosamente, dichos productos de amplificación, preferentemente clonados y re-aislados, y posiblemente comprendidos en plásmidos o vectores adecuados, pueden usarse como controles positivos para verificar el funcionamiento de las etapas de detección de los métodos de la memoria dirigidos a la detección del respectivo ácido nucleico en una muestra. Alternativa o adicionalmente, dichos productos de amplificación (clonados o aislados) pueden usarse como calibradores para determinar la cantidad de moldes particulares en una muestra, por ejemplo, en PCR a tiempo real.

**[0211]** Por consiguiente, la memoria también describe *E. coli* recombinante depositada según el Tratado de Budapest con la Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM) el 10 de enero de 2007 con los números de acceso LMBP LMBP 5452, LMBP 5453, LMBP 5454, LMBP 5455, LMBP 5456, LMBP 5457, LMBP 5458, LMBP 5459 y LMBP 5460, el 6 de marzo de 2007 con el número de acceso LMBP LMBP 5451, y el 19 de abril de 2007 con los números de acceso LMBP LMBP 5587, LMBP 5588, LMBP 5589 y LMBP 5590.

**[0212]** Dicha *E. coli* recombinante comprende los productos de amplificación obtenidos en eventos de molde usando conjuntos de cebadores enumerados en la Tabla 5, clonados en los sitios *EcoRI* del vector de clonación pUC18 MCS:

Tabla 5

Nº de acc. LMBP	Par de cebadores	Amplificado en el evento	Inserto secuenciado (Fig. 1)
LMBP 5460	SEC ID Nº 7 SEC ID Nº 8	BT11	SEC ID Nº 34
LMBP 5456	SEC ID Nº 9 SEC ID Nº 10	40-3-2	SEC ID Nº 35
LMBP 5452	SEC ID Nº 47 SEC ID Nº 48	MON810	SEC ID Nº 36
LMBP 5453	SEC ID Nº 11 SEC ID Nº 12	Bt176	SEC ID Nº 37
LMBP 5454	SEC ID Nº 11 SEC ID Nº 12	Bt11	SEC ID Nº 38
LMBP 5457	SEC ID Nº 13 SEC ID Nº 14	BT176	SEC ID Nº 39
LMBP 5455	SEC ID Nº 15 SEC ID Nº 16	BT11	SEC ID Nº 40
LMBP 5458	SEC ID Nº 26 SEC ID Nº 27	Bt11 de maíz	SEC ID Nº 41
LMBP 5459	SEC ID Nº 26 SEC ID Nº 27	OSR (aceite de semilla de colza) wt	SEC ID Nº 42
LMBP 5451	SEC ID Nº 28 SEC ID Nº 29	Bt11	SEC ID Nº 43
LMBP 5587	SEC ID Nº 22 SEC ID Nº 23	Soja RRS	SEC ID Nº 53
LMBP 5588	SEC ID Nº 22 SEC ID Nº 23	GT 73	SEC ID Nº 54
LMBP 5589	SEC ID Nº 24 SEC ID Nº 25	GT 73	SEC ID Nº 55
LMBP 5590	SEC ID Nº 51 SEC ID Nº 21	Arroz WT	SEC ID Nº 52

**[0213]** Además de los plásmidos y *E. coli* depositados enumerados en la Tabla 5, la memoria también describe plásmidos ejemplares adicionales, tales como, por ejemplo, pUC18, que contiene insertos amplificados usando, por ejemplo:

- el par de cebadores SEC ID Nº 3 y 4 para el gen acc de *Brassica* (secuencia de inserto ejemplar SEC ID Nº 44 en la Fig. 1 amplificada en OSR wt);
- 10 - CP4-EPSP pares de cebadores SEC ID Nº 18 y 19, y SEC ID Nº 50 y 19 (insertos ejemplares amplificados en, respectivamente, evento 40-3-2 y evento NK603, para obtener las respectivas secuencias de inserto ejemplares mostradas como SEC ID Nº 45 y 46 en la Fig. 1) (el cebador SEC ID Nº 17 también puede usarse conjuntamente con el cebador SEC ID Nº 19; sin embargo, el cebador SEC ID Nº 17 contiene una secuencia que desaparece en el nucleótido 20 en comparación con la SEC ID Nº 50, siendo por lo tanto el último más preferido);
- 15 - el par de cebadores SEC ID Nº 1 y 2 para el gen *adh-1* de maíz (secuencia de inserto ejemplar SEC ID Nº 32 en la Fig. 1 amplificada en maíz no mutante);
- los pares de cebadores SEC ID Nº 5 y 49 para el gen de lectina de soja (secuencia de inserto ejemplar SEC ID Nº 33 en la Fig. 1 amplificada en soja no mutante);
- 20 - el par de cebadores SEC ID Nº 56 y 57 para un amplicón más corto dentro del gen *adh-1* de *Zea mays* (secuencia de inserto ejemplar SEC ID Nº 70 en la Fig. 1);
- 25 - el par de cebadores SEC ID Nº 58 y 59 (SLTM) para un amplicón de lectina de *Glycine max* (secuencia de inserto ejemplar SEC ID Nº 71 en la Fig. 1);
- el par de cebadores SEC ID Nº 60 y 61 para un amplicón más corto dentro del elemento p35S (secuencia de inserto ejemplar SEC ID Nº 72 en la Fig. 1);
- 30 - el par de cebadores SEC ID Nº 64 y 65 para un amplicón dentro del gen *GluA3* de *Beta vulgaris* (secuencia de inserto ejemplar SEC ID Nº 76 en la Fig. 1);
- el par de cebadores SEC ID Nº 66 y 67 para un amplicón dentro del gen *sah-7* de *Gossypium* (secuencia de inserto ejemplar SEC ID Nº 77 en la Fig. 1);
- 35



- el par de cebadores SEC ID N° 68 y 69 para un amplicón dentro del gen UGPasa de patada (secuencia de inserto ejemplar SEC ID N° 78 en la Fig. 1);
- el par de cebadores SEC ID N° 11 y 12 para un amplicón dentro del rasgo Cry1Ab (secuencia de inserto ejemplar SEC ID N° 73 en la Fig. 1 amplificada en material MON 810);
- el par de cebadores SEC ID N° 22 y 62 (RRS) o 22 y 63 (GT 73) para un amplicón dentro del rasgo CP4-EPSPS (secuencia de inserto ejemplar en la Fig. 1: SEC ID N° 74 amplificada en GT73 y SEC ID N° 75 amplificada en RRS).

10

**[0214]** Se aprecia que debido al tamaño más corto del correspondiente amplicón, el par de cebadores SEC ID N° 22 y 23 o SEC ID N° 22 conjuntamente con uno cualquiera o ambos cebadores SEC ID N° 62 y 63, puede usarse preferentemente para amplificar CP4-EPSPS a partir de un material vegetal no procesado (por ejemplo, tejido vegetal o semillas) así como material procesado (por ejemplo, alimentos o piensos), mientras que los pares de cebadores SEC ID N° 18 y 19 o 50 y 19, que definen un amplicón más largo, pueden usarse preferentemente en material no procesado. Por tanto, el par de cebadores SEC ID N° 22 y 23 o SEC ID N° 22 conjuntamente con uno cualquiera o los dos cebadores SEC ID N° 62 y 63, puede ser más preferido en los presentes métodos y kits.

15

**[0215]** La memoria describe adicionalmente plásmidos recombinantes aislados obtenibles de las bacterias *E. coli* recombinantes enumeradas en la Tabla 5, así como insertos aislados, preferentemente insertos EcoRI, de los mismos. La memoria también describe cualquier microorganismo recombinante adicional transformado con los plásmidos así aislados.

20

**[0216]** Un experto en la materia también puede apreciar que la memoria puede describir demasiadas combinaciones de dichos plásmidos o insertos de los mismos, en los cuales dichas combinaciones son representativas de aquellos ácidos nucleicos que se pretenden detectar en una muestra.

25

**[0217]** Además, la memoria también describe el uso de plásmidos recombinantes o insertos encontrados en y obtenibles de las bacterias de la Tabla 5 u otras explicadas anteriormente para su uso como controles positivos y/o calibradores en los métodos de la presente memoria. Por ejemplo, dichos plásmidos o insertos de los mismos pueden incluirse en los métodos y kits de la memoria en cantidades adecuadas para facilitar también la toma de la decisión de si está presente ácido nucleico de uno o más eventos en una cantidad que justifique la cuantificación adicional, o está presente en un umbral aceptable.

30

**[0218]** La memoria también describe que cualquiera de los cebadores de la memoria, tal como en particular los cebadores enumerados en cualquiera de la Tabla 1 o Tabla 4 o variantes o derivados de los mismos, puede usarse en una estrategia de paseo genómico para identificar secuencias adyacentes a dicho cebador en ADN genómico de un evento. Asimismo, la memoria describe que cualquier cebador diseñado en la base de la secuencia de cualquier amplicón de la presente memoria, tal como en particular cualquier cebador localizado dentro de o solapante con cualquiera de las secuencias de amplicón SEC ID N° 34 a SEC ID N° 78, o a variante o derivado de dicho cebador, puede usarse en una estrategia de paseo genómico para identificar secuencias adyacentes a dicho amplicón en ADN genómico de un evento. Esto puede ser particularmente útil cuando los presentes métodos de amplificación producen un amplicón que tiene características (por ejemplo, longitud, Tm o secuencia) que no pueden atribuirse de forma inequívoca a un evento particular. En dicha situación, el paseo genómico fuera del amplicón en cuestión proporcionaría información adicional de secuencia acerca del evento y de ese modo ayudaría a identificar dicho evento. En ejemplos particularmente preferidos, el cebador específico puede derivarse de amplicones p35 o tNOS.

35

40

45

**[0219]** En general, las estrategias de paseo genómico son bien conocidas en la técnica. Ejemplos incluyen *inter alia* PCR inversa o el método vectorette de Riley et al. 1990 (Nucleic Acids Res 18: 2887-90) comercializado como Universal Vectorette™ System (Sigma), así como posteriores simplificaciones del mismo (véase, por ejemplo, Kilstrup y Kristiansen 2000, Nucleic Acids Res 28: e55).

50

**[0220]** En un ejemplo particular, la memoria describe un método de paseo genómico de dos etapas. En una primera etapa de amplificación, se usa un cebador marcado con LUX™ (o de otro modo) de la memoria junto con una mezcla de cebadores aleatorios (generalmente de aproximadamente 8 a 15 pb de longitud), y se usan preferentemente condiciones de PCR en gradiente para aumentar la rigurosidad. El marcador en el cebador permite hacer el seguimiento de si tiene lugar la amplificación que implica el cebador marcado. En una segunda etapa de amplificación, se realiza una PCR anidada usando otros cebador anidado del amplicón, preferentemente también marcado con LUX™ o de otro modo, junto con dichos cebadores aleatorios, y preferentemente a condiciones de PCR de alta rigurosidad. El marcador en el cebador permite hacer el seguimiento de si tiene lugar la amplificación que implica el cebador marcado. Finalmente, se secuencian el producto así obtenido, identificando de ese modo las secuencias adyacentes al amplicón.

55

60

**[0221]** La memoria también describe kits de partes para realizar los métodos de la presente memoria, es decir, para examinar una muestra para la presencia potencial o ausencia de material derivado de uno o más eventos de

65

plantas transgénicas.

**[0222]** En un ejemplo, un kit según la memoria puede comprender sondas adecuadas para la detección de uno o más o todos los ácidos nucleicos enumerados en a) - u) anteriores.

5

**[0223]** En un ejemplo, un kit según la memoria puede comprender cebadores, preferentemente pares de cebadores, adecuados para la amplificación de amplicones de dentro de uno o más o todos los ácidos nucleicos enumerados en a) - u) definidos anteriormente.

10 **[0224]** En otro ejemplo, el kit puede comprender cebadores, preferentemente pares de cebadores, adecuados para la amplificación de uno, más de uno, y preferentemente todos los ácidos nucleicos enumerados en a) - i) anteriores.

15 **[0225]** En otro ejemplo, el kit puede comprender cebadores, preferentemente pares de cebadores, adecuados para la amplificación de uno, más de uno, y preferentemente todos los ácidos nucleicos enumerados en a) - i), o), p), q) y t) anteriores.

20 **[0226]** En otro ejemplo, el kit puede comprender cebadores, preferentemente pares de cebadores, adecuados para la amplificación de uno, más de uno, o todos los ácidos nucleicos enumerados en a) - c) anteriores y uno, más de uno o preferentemente todos los ácidos nucleicos enumerados en d) - i) anteriores.

**[0227]** En otro ejemplo, el kit puede comprender cebadores, preferentemente pares de cebadores, adecuados para la amplificación de uno, más de uno, o todos los ácidos nucleicos enumerados en a) - c), o), p), q), t) anteriores y uno, más de uno o preferentemente todos los ácidos nucleicos enumerados en d) - i) anteriores.

25

**[0228]** Además, el kit también puede comprender cebadores o pares de cebadores para la amplificación de una secuencia genérica de plantas, como se describe en otra parte en esta memoria.

30 **[0229]** Se apreciará que los cebadores y pares de cebadores para la amplificación en diversos ácidos nucleicos mostrados en la presente memoria pueden incluirse en kits diseñados de forma variada, según la preferencia a cuanto a los eventos transgénicos que se quiere detectar.

35 **[0230]** En un ejemplo preferido, y teniendo en cuenta las diversas selecciones de ácidos nucleicos a amplificar analizadas en los párrafos precedentes, el kit puede comprender uno o más, o todos los cebadores, preferentemente uno, más de uno o todos los pares de cebadores, definidos en cualquiera de la Tabla 1 o Tabla 4, o variantes o derivados de los mismos.

**[0231]** En un ejemplo particularmente preferido, uno o ambos cebadores de cualquier par de cebadores incluido en el kit puede estar marcado.

40

**[0232]** En otro ejemplo particularmente preferido, cualquier par de cebadores incluido en el kit puede contener al menos uno, y habitualmente un cebador marcado con un fluoróforo adecuado y diseñado para permitir la detección a tiempo real usando el sistema de detección LUX™ descrito anteriormente.

45 **[0233]** En un ejemplo adicional, el kit también puede comprender productos de amplificación, por ejemplo, clonados y re-aislados y posiblemente comprendidos en plásmidos o vectores adecuados, que pueden usarse como controles positivos y/o calibradores en los métodos de la memoria, como se ha explicado anteriormente. Por ejemplo, pueden proporcionarse cantidades medidas de forma precisa o diluciones de dichos productos de amplificación, por ejemplo, clonados y re-aislados y posiblemente comprendidos en plásmidos o vectores  
50 adecuados, para dichos propósitos. Como se ha explicado anteriormente, la memoria también describe diversas combinaciones de dichos reactivos.

**[0234]** En un ejemplo particular, el kit puede comprender uno, más de uno o todos los organismos *E. coli* enumerados en la Tabla 5, y/o plásmidos obtenibles de los mismos, y/o insertos aislados, preferentemente insertos  
55 *EcoRI*, de dichos plásmidos, o combinaciones de los mismos.

**[0235]** En un ejemplo adicional, como ya se ha explicado, el kit también puede comprender un soporte de datos que contiene instrucciones para que un dispositivo de computación programable realice las acciones de la etapa (2) de los métodos de la memoria.

60

**[0236]** Como es lógico, dichos kits pueden comprender componentes adicionales, tales como componentes útiles para hibridación, PCR, detección, etc. Un experto en la materia apreciará el uso potencial de dichos componentes.

**[0237]** En un ejemplo preferido, el kit puede comprender uno o más compartimentos de reacción, por ejemplo  
65 compartimentos de reacción proporcionados dentro de una tira o placa multi-pocillo (formato multi-pocillo),

comprendiendo cada compartimento una composición de todos los componentes necesarios para una reacción de amplificación por PCR (por ejemplo, nucleótidos, sales, polimerasa termoestable, etc.), e incluyendo el uno o más (cuando se combina) pares de cebadores deseados como se ha definido anteriormente, pero sin incluir ADN molde. Por consiguiente, la reacción de PCR podría iniciarse una vez el usuario a introducido un ADN muestra a analizar a dicha composición. Opcionalmente, para asegurar la estabilidad, también puede excluirse la polimerasa Taq u otra termoestable de la composición (pero puede incluirse por separado en el kit), y puede que se necesite añadir por el usuario. Generalmente, la composición puede ser líquida, aunque especialmente para propósitos de transporte y almacenamiento puede congelarse. Sin embargo, la memoria también describe composiciones liofilizadas.

## 10 Ejemplos

### Ejemplo 1: Condiciones de amplificación para pares de cebadores seleccionados enumerados en las Tablas 1 y 4

**[0238]** Se optimizó PCR a tiempo real con detección de SYBR Green para la amplificación de amplicones de ácidos nucleicos "p35S", "tNOS", "Cry1Ab", "PAT/Bar", "PAT/pat" y "CP4-EPSPS" usando los respectivos pares de cebadores enumerados en las Tablas 1 y 4.

**[0239]** Se aisló el ADN de eventos que contenían (control positivo) o carecían (control negativo) estos ácidos nucleicos, incluyendo eventos Bt11, Bt176, MON810, MON40-3-2, TC1507, NK603, MS8/RF3 (véase la Tabla 5), usando aislamiento CTAB de material tisular foliar.

**[0240]** Las reacciones de PCR contenían mezcla maestra de PCR SYBR Green (Diagenode, ref: GMO-GS2X-A300) 1 x, cebador directo 250 nM, cebador inverso 250 nM, ADN molde 50 ng en volumen total de 20 µl. El ciclado de PCR implicó Etapa 1: 1 x [50°C, 120 s]; Etapa 2: 1x [95°C 600 s]; y Etapa 3: 40x [95°C 15 s, 60°C 60 s] con adquisición de fluorescencia. Se usó Applied Biosystems Prism 7700. El análisis de curva de fusión se hizo en gradiente de 50°C a 95°C sobre 1200 s.

**[0241]** Para todos los pares de cebadores, se obtuvieron productos de amplificación específicos como se muestra por una única Tm específica y una única banda en electroforesis en gel de agarosa. Los ensayos tenían bajo LOD:

**RBCL:** cebadores SEC ID N° 26 y SEC ID N° 27; Tm = 76,5°C; tamaño = 95 pb; LOD = ± 0,039 ng ADN diana

**Zea mays ADH (amplicón más largo):** cebadores SEC ID N° 1 y SEC ID N° 2; Tm = 79,5°C; tamaño = 138 pb; LOD = ± 0,016 ng de ADN diana (± 6 genomas haploides)

**Zea mays ADH (amplicón más corto):** cebadores SEC ID N° 56 y SEC ID N° 57; Tm = 75,5°C; tamaño = 83 pb; LOD = ± 0,016 ng de ADN diana (± 6 genomas haploides)

**Colza oleaginosa ACC:** cebadores SEC ID N° 79 y SEC ID N° 3; Tm = 79°C; tamaño = 103 pb; LOD = ± 0,05 ng de ADN diana (± 20 genomas haploides)

**Colza oleaginosa crucifera:** cebadores SEC ID N° 24 y SEC ID N° 25; Tm = 80°C; tamaño = 85 pb; LOD = ± 0,015 ng de ADN diana (± 12 genomas haploides)

**Soja lectina (amplicón más largo):** cebadores SEC ID N° 5 y SEC ID N° 49; Tm = 81,5°C; tamaño = 178 pb; LOD = ± 0,016 ng de ADN diana (± 13 genomas haploides)

**Soja (lectina):** cebadores SEC ID N° 58 y SEC ID N° 59 (SLTM); Tm = 79,5°C; tamaño = 81 pb; LOD = ± 0,063 ng de ADN diana (± 50 genomas haploides)

**Arroz PLD:** cebadores SEC ID N° 20 y SEC ID N° 21; Tm = 76,5°C; tamaño = 80 pb; LOD = ± 0,01 ng de ADN diana (± 20 genomas haploides)

**Remolacha azucarera GluA3:** cebadores SEC ID N° 64 y SEC ID N° 65; Tm = 77°C; tamaño = 118 pb; LOD = ± 0,01 ng de ADN diana (± 13 genomas haploides)

**Algodón SAH7:** cebadores SEC ID N° 66 y SEC ID N° 67; Tm = 75,5°C; tamaño = 115 pb; LOD = ± 0,02 ng de ADN diana (± 9 genomas haploides)

**Patata UGPasa:** cebadores SEC ID N° 68 y SEC ID N° 69; Tm = 81°C; tamaño = 87 pb; LOD = ± 0,0002 ng de ADN diana

**p35S (amplicón más largo):** cebadores SEC ID N° 7 y SEC ID N° 8; Tm = 80,5°C; tamaño = 147 pb; LOD = ± 0,016 ng de ADN diana (± 6 genomas haploides)

**p35S (amplicón más corto):** cebadores SEC ID N° 60 y SEC ID N° 61; Tm = 76°C; tamaño = 75 pb; LOD: RRS 100% ± 0,032 ng de ADN diana (± 25 genomas haploides); NK603 5% ± 6,25 ng de ADN diana (± 62,5 genomas haploides)

**tNOS-L:** cebadores SEC ID N° 28 y SEC ID N° 29; Tm = 72°C; tamaño = 172 pb; LOD = ± 0,03 ng de ADN diana (± 25 genomas haploides)

**tNOS-D:** cebadores SEC ID N° 9 y SEC ID N° 10; Tm = 72°C; tamaño = 69 pb; LOD = ± 0,03 ng de ADN diana (± 25 genomas haploides)

**Cry1Ab:** cebadores SEC ID N° 11 y SEC ID N° 12; Tm = 78,5°C; tamaño = 73 pb; LOD = ± 0,06 ng (±12 genomas haploides)

**PAT/Bar:** cebadores SEC ID N° 13 y SEC ID N° 14; Tm = 80°C; tamaño = 69bp; LOD = ± 0,125 ng (±50 genomas haploides)

**PAT/pat:** cebadores SEC ID N° 15 y SEC ID N° 16; Tm = 77°C; tamaño = 109 pb; LOD = ± 0,03 ng (±12

genomas haploides)

**CP4-EPSP:** cebadores SEC ID N° 22, SEC ID N° 62 y SEC ID N° 63; Tm = 80,5 o 84,5°C; tamaño = 108 pb; LOD: NK603 5% ±3,125 ng (±31 genomas haploides), RRS 100% ± 0,032 ng (± 25 genomas haploides), GT73 100% ± 0,016 ng (±12 genomas haploides)

- 5 **CP4-EPSP:** cebadores SEC ID N° 17, SEC ID N° 18 y SEC ID N° 19; Tm = 85°C; tamaños = 94 pb o 124 pb; LOD = ± 0,03 ng (± 25 genomas haploides)

Ejemplo 2: Método simplificado ejemplar según la invención

- 10 **[0242]** Se preparó una muestra hipotética añadiendo ADN Bt176 a ADN portador no relacionado. La muestra se exploró para la presencia o ausencia de "p35S", "tNOS", "Cry1Ab", "PAT/Bar", "PAT/pat" y "CP4-EPSPS" usando los métodos de PCR a tiempo real del Ejemplo 1.

- 15 **[0243]** El presente método simplificado pretende concluir la presencia potencial o ausencia en la muestra de material derivado de Bt176, Bt11 y NK603.

- [0244]** Después del ensayo, la muestra es positiva para p35S, Cry1Ab y Pat/Bar pero no para los otros ácidos nucleicos ensayados. Por tanto, la muestra puede representarse como conjunto  $G_{SAM} \in \{p35S; Cry1Ab; Pat/bar\}$ . En este ensayo ejemplar (donde no se examina la presencia de ácidos nucleicos de *Zea mays*), el evento Bt176 está  
20 presentado por el conjunto  $G_{Bt176} \in \{p35S; Cry1Ab; Pat/bar\}$ , el evento Bt11 por el conjunto  $G_{Bt11} \in \{p35S; tNOS; Cry1Ab; Pat/pat\}$  y el evento NK603 por el conjunto  $G_{NK603} \in \{p35S; tNOS; CP4-EPSP\}$ .

- [0245]** Por consiguiente, como  $G_{Bt176} = G_{SAM}$ , el material del evento Bt176 puede estar presente en la muestra. Por otro lado, como  $G_{Bt11} \neq G_{SAM}$  y  $G_{Bt11} \not\subset G_{SAM}$ , el material del evento Bt11 no está presente en la muestra. Asimismo,  
25 como  $G_{NK603} \neq G_{SAM}$  y  $G_{NK603} \not\subset G_{SAM}$ , el material del evento NK603 no está presente en la muestra.

**[0246]** En una representación alternativa, a "p35S", "tNOS", "Cry1Ab", "PAT/Bar", "PAT/pat" y "CP4-EPSPS" se les asignan valores primos respectivos  $V_{p35S} = 3$ ,  $V_{tNOS} = 5$ ,  $M_{Cry1Ab} = 7$ ,  $M_{PAT/Bar} = 11$ ,  $M_{PAT/pat} = 13$  y  $V_{CP4-EPSPS} = 17$ .

- 30 **[0247]** Por consiguiente, al conjunto  $G_{SAM}$  se le asigna un valor  $VG_{SAM}$  que es un múltiplo de los valores respectivos asignados a ácidos nucleicos detectados en el mismo, es decir,  $VG_{SAM} = V_{p35S} \times V_{Cry1Ab} \times V_{PAT/Bar} = 231$ . Además, al conjunto  $G_{Bt176}$  se le asigna un valor  $VG_{Bt176}$  que es un múltiplo de los valores asignados a los de los ácidos nucleicos ensayados que se encuentran en el evento Bt176, es decir,  $VG_{Bt176} = V_{p35S} \times V_{Cry1Ab} \times V_{PAT/Bar} = 231$ . Asimismo, al conjunto  $G_{Bt11}$  se le asigna un valor  $VG_{Bt11} = V_{p35S} \times V_{tNOS} \times V_{Cry1Ab} \times V_{PAT/pat} = 1365$ ; y al conjunto  
35  $G_{NK603}$  se le asigna un valor  $VG_{NK603} = V_{p35S} \times V_{tNOS} \times V_{CP4-EPSP} = 255$ .

- [0248]** Por consiguiente, como  $VG_{SAM} / VG_{Bt176} = 1$ , el material del evento Bt176 puede estar presente en la muestra. Por otro lado, como  $VG_{SAM} / VG_{Bt11} = 0,169$ , es decir, no es 1 y no es un número entero mayor que 1, el material del evento Bt11 no está presente en la muestra. Asimismo, como  $VG_{SAM} / VG_{NK603} = 0,906$ , es decir, no es 1  
40 y no es un número entero mayor que 1, el material del evento NK603 no está presente en la muestra.

Ejemplo 3: Descripción ejemplar de un kit según la invención (configuración de placa de 96 pocillos)

- 45 **[0249]** Ácidos nucleicos a explorar: "Zm", "Bn", "Gm", "p35S", "tNOS", "CP4-EPSPS", "Cry1Ab", "PAT/bar", "PAT/pat" definidos anteriormente usando pares de cebadores definidos en la Tabla 1 anterior, así como gen genérico de plantas amplificado usando el par de cebadores SEC ID N° 26 y 27 (Tabla 4).

- [0250]** Opcionalmente, tal como a petición, el kit también puede incluir marcadores de taxón para arroz ("Or"), algodón ("Gs"), remolacha azucarera ("Bv") y/o patata ("St"), usando los correspondientes pares de cebadores  
50 definidos en la Tabla 1.

*Condiciones operativas de los métodos Q-PCR con SYBR Green*

- 55 **[0251]** Reactivos: mezcla maestra de PCR SYBR Green incluyendo la Taq-polimerasa HS; cebadores 20 µM; agua sin nucleasa

- [0252]** Equipo: sistema de detección de secuencia ABI PRISM® 7700, sistema de PCR a tiempo real 7300, flujo laminar, pipetas 20, 200 y 1000 µl, puntas de pipeta resistentes a aerosol estériles, placas de reacción de 96 pocillos Optical, tapas Optical  
60

**[0253]** Protocolo: La PCR se realiza en un sistema de detección de secuencia ABI PRISM® 7700 o el sistema de PCR a tiempo real 7300 siguiendo las instrucciones del fabricante. Se usa un programa general de PCR.

**[0254]** Preparación de mezcla de PCR: La mezcla de PCR contiene todos los componentes de una reacción de

PCR excepto el molde de ADN. Esta operación se realiza en flujo laminar, que se usa solamente para este tipo de operación.

Tabla 6: Mezcla de reacción para selección por Q-PCR

Componente	Concentración final	µl / reacción	Reacciones X
Mezcla maestra de PCR SYBRGreen (2X)	1 X	12,5 µl	
Cebador directo (20 µM)	250 nM	0,312 µl	
Cebador inverso (20 µM)	250 nM	0,312 µl	
Agua sin nucleasa		6,876 µl	
Volumen total		20 µl	

5

**[0255]** Preparación de ADN: El ADN molde se extrae usando un método convencional de extracción de ADN con CTAB y la concentración de ADN se mide por determinación de fluorescencia picogreen.

10 **[0256]** Configuración de PCR: La configuración de PCR se realiza en flujo laminar. Los moldes de ADN y la mezcla de PCR se combinan en diferentes habitaciones.

**[0257]** Ejecución de PCR: La PCR se realizará siguiendo las instrucciones del fabricante como se describe en el manual del usuario.

15 **[0258]** Las condiciones de termociclado se enumeran a continuación en la Tabla 7.

Tabla 7: Condiciones de procesamiento del termociclador

Etapa	Fase	T°C	Tiempo (segundos)	Adquisición	Ciclos
1	UNG	50°C	120"	No	1x
2	Activación Taq	95°C	600"	No	1x
3	Amplificación				40x
	Desnaturalización	95°C	15"	No	
	Hibridación y Extensión	60°C	60"	Medición	
4	Fusión	50°C a 95°C	1200"	Medición	1x

**[0259]** Posteriormente se realiza un análisis de "curva de fusión" usando un programa convencional (por ejemplo fusión gradual desde 50°C hasta 95°C y controlando la disminución de fluorescencia)

20

*Configuración de placa de 96 pocillos para selección de GMO de productos de alimentación/pienso*

25 **[0260]** A continuación se describe la configuración que incluye todos los marcadores generales de alimentos/piensos, el marcador de arroz (detección de eventos de arroz no autorizados) y el marcador de transcriptasa inversa de CAMV (ausencia de control CaMV).

Configuración de placa de 96 pocillos:

10261]

Planta	Gm	Zm	Bn	Or	p35S	tNos	CP4	Cry/Ab	PAT/pat	PAT/bar	CRT
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC
Muestra 1 A	Muestra 1 A	Muestra 1 A	Muestra 1 A	Muestra 1 A	Muestra 1 A	Muestra 1 A	Muestra 1 A	Muestra 1 A	Muestra 1 A	Muestra 1 A	Muestra 1 A
Muestra 1 B	Muestra 1 B	Muestra 1 B	Muestra 1 B	Muestra 1 B	Muestra 1 B	Muestra 1 B	Muestra 1 B	Muestra 1 B	Muestra 1 B	Muestra 1 B	Muestra 1 B
Muestra 2 A	Muestra 2 A	Muestra 2 A	Muestra 2 A	Muestra 2 A	Muestra 2 A	Muestra 2 A	Muestra 2 A	Muestra 2 A	Muestra 2 A	Muestra 2 A	Muestra 2 A
Muestra 2 B	Muestra 2 B	Muestra 2 B	Muestra 2 B	Muestra 2 B	Muestra 2 B	Muestra 2 B	Muestra 2 B	Muestra 2 B	Muestra 2 B	Muestra 2 B	Muestra 2 B

Los controles positivos (+) serían los amplicones correspondientes (plásmidos o insertos) descritos en la presente memoria en particular en la Tabla 5 amplicones a un cierto número de copias (por ejemplo 100 copias/pocillo)

**[0262]** Se prevería técnicamente que los pocillos de muestra puedan abrirse secuencialmente (por ejemplo, primero los controles positivos, después las muestras, y los último las NTC y control negativos).

**[0263]** Los valores Ct y valores Tm para cada pocillo se registran y usan en el análisis de decisión para la determinación de conjunto GM presente en las muestras respectivas.

**[0264]** Obsérvese que en principio también cada fila podría producirse por separado en una configuración alternativa (de manera que se consigue flexibilidad aumentada para el cliente).

10 Ejemplo 4: PCR combinada de p35S, tNOS

**[0265]** El presente ejemplo muestra amplificación combinada ejemplar por PCR de los amplicones p35S y tNOS, en la cual la detección se hace por SYBR Green y los productos de amplificación se distinguen en la base de una diferencia en sus temperaturas de fusión (Tm).

15

*Pares de cebadores usados (20 µM):*

**[0266]**

20 p35S: SEC ID N° 60 y 61

tNOS: SEC ID N° 9 y 10

*Molde (50 ng): Soja Roundup Ready (RRS) 100% (control doble positivo)*

25

*Programa de PCR: 95°C 10', (95°C 15", 60°C 1') x 40 ciclos*

*Programa de fusión: 50°C hasta 95°C en 20'*

30 **[0267]** La combinación de métodos de PCR de p35S y tNOS en SYBR Green es posible ya que ambos amplicones se pueden distinguir gracias a su diferente Tm (véase la Figura 2). De modo que es posible obtener información con una PCR sobre la presencia de dos dianas diferentes que son p35S y tNOS.

Ejemplo 5: Posibilidades adicionales de combinación cuando se usa SYBR Green

35

**[0268]** Experimentos análogos a los del ejemplo 4 han definido adicionalmente la viabilidad de las siguientes combinaciones de combinación:

1. Maíz adh-1 (SEC ID N° 56 y 57) con soja SLTM (SEC ID N° 58 y 59)

40

2. Maíz adh-1 (SEC ID N° 56 y 57) con colza oleaginosa cruciferina (SEC ID N° 24 y 25)

3. Soja SLTM (SEC ID N° 58 y 59) con algodón sah-7 (SEC ID N° 66 y 67)

45

4. Algodón sah-7 (SEC ID N° 66 y 67) con colza oleaginosa cruciferina (SEC ID N° 24 y 25)

Ejemplo 6: Parámetros de PCR a tiempo real usando los cebadores de la invención

**[0269]** Se han realizado reacciones usando condiciones y cebadores como se define en el ejemplo 1 sobre un número de copias definido de plásmidos de referencia que contienen los respectivos insertos de amplicón, y se ha determinado la fluorescencia relativa (UFR) después de 40 ciclos (es decir, en aproximación a o habiendo alcanzado la meseta). Los resultados de la Tabla 8 (los resultados usando +/- 8300 copias de molde también se representan gráficamente en la Figura 3) muestran que los presentes métodos y cebadores son capaces de generar valores UFR en meseta de al menos 2500, que recaen dentro de un margen de factor 3.

55

Tabla 8

	Diana de PCR (cebadores usados: SEC ID N° Dir + Inv)	Plásmido molde	UFR media de 40 ciclos con 1000 copias de plásmido molde	UFR media de 40 ciclos con +/-8300 copias de plásmido molde	Tamaño de amplicón
1	RbcL (26 + 27)	RbcL OSR Wt	2581,58	4369,51	95
2	ADH más largo (1 + 2)	ADH largo	4248,58	5447,4	135
3	ADH más corto (56 + 57)	ADH alt	2434,16	4210,28	84
4	Lectina más larga (5 + 49)	Lec larga	3854,97	5969,65	178

ES 2 531 664 T3

	Diana de PCR (cebadores usados: SEC ID N° Dir + Inv)	Plásmido molde	UFR media de 40 ciclos con 1000 copias de plásmido molde	UFR media de 40 ciclos con +/-8300 copias de plásmido molde	Tamaño de amplicón
5	Lectina SLTM (58 + 59)	SLTM	5943,98	6713,95	74
6	Cru770 (24 + 25)	Cru770	4614,59	6768,95	85
7	p35S más largo (7 + 8)	p35S largo	3490,22	4792,49	147
8	p35S más corto (60+61)	p35S corto	3963,27	6173,37	75
9	tNOS-D (9 + 10)	tNOS-D	2339,11	3731,95	69
10	CryIAb (11 + 12)	CryIAb Bt11	4299,47	6973,77	73
11	CryIAb (11 + 12)	CryIAb MON810	3957,05	6759,2	73
12	CryIAb (11 + 12)	CryIAb Bt11 y CryIAb MON810	4028,97	6641,04	73
13	CP4 (22+62+63)	CP4-RRS	3235,24	5098,82	108
14	CP4 (22+62+63)	CP4-GT73	2641,86	4968,28	108
15	CP4 (22+62+63)	CP4-RRS y CP4-GT73	3157,24	5034,91	108
16	Pat-Pat (15 + 16)	Pat-Pat	2299,71	4875,61	109
17	Pat-Bar (13 + 14)	Pat-Bar	4839,79	7370,7	69
		Promedio:	3642,93	5641,17	
		Des. típica:	1011,93	1106,76	
		Media:	3854,97	5447,40	
		Mínimo:	2299,71	3731,95	
		Máximo:	5943,98	7370,7	



## REIVINDICACIONES

1. Un método para examinar en una muestra la presencia o ausencia de material derivado de uno o más eventos de una planta transgénica que comprende las etapas de:

5

(1) detectar la presencia o ausencia en la muestra de ácidos nucleicos que comprende:

- uno, más de uno o todos los ácidos nucleicos elegidos entre:

- 10 a) "Zm": un ácido nucleico derivado de y específico para el taxón *Zea mays*, preferentemente *Zea mays* ssp. *mays*,  
 b) "Bn": un ácido nucleico derivado de y específico para el taxón *Brassica napus*,  
 c) "Gm": un ácido nucleico derivado de y específico para el taxón *Glycine max*,  
 o) "Or": un ácido nucleico derivado de y específico para el taxón *Oryza sativa*,  
 15 p) "Bv": un ácido nucleico derivado de y específico para el taxón *Beta vulgaris*,  
 q) "Gs": un ácido nucleico derivado de y específico para el taxón *Gossypium*, y  
 t) "St": un ácido nucleico derivado de y específico para el taxón *Solanum tuberosum*; y

- todos los ácidos nucleicos d) - i):

20

- d) "p35S": un ácido nucleico derivado del promotor 35S del Virus del mosaico de la coliflor,  
 e) "tNOS": un ácido nucleico derivado del terminator 3' del gen de la nopalina sintetasa de *Agrobacterium tumefaciens*,  
 f) "Cry1Ab": un ácido nucleico derivado del gen de la proteína cristal *Cry1Ab* de *Bacillus thuringiensis*,  
 25 g) "PAT/bar": un ácido nucleico derivado del gen de la fosfinotricina acetiltransferasa (PAT) *bar* de *Streptomyces hygrosopicus*,  
 h) "PAT/pat": un ácido nucleico derivado del gen de la fosfinotricina acetiltransferasa (PAT) *pat* de *Streptomyces viridochromogenes*, y  
 i) "CP4-EPSPS": un ácido nucleico derivado del gen de la 5-enol-piruvilshikimato-3-fosfato sintasa *EPSPS* de  
 30 *Agrobacterium* sp. CP4; y

(2) concluir la presencia o ausencia en la muestra de material derivado de uno o más eventos de plantas transgénicas elegidos entre el grupo que comprende: eventos Bt176, Bt11, Bt10, MON810, MON863, TC1507, NK603, T25, GA21, DAS-59122, MIR604, LY038, MON88017, cruces de los mismos, y eventos relacionados de los mismos; eventos Topas 19/2, MS1, RF1, RF2, RF3, MS8, GT73, T45, Liberator pHoe6/Ac, GS40/90pHoe6/Ac, OXY235, cruces de los mismos incluyendo MS1/RF1, MS1/RF2, MS8/RF3, y eventos relacionados de los mismos; eventos MON 40-3-2, MON89788, A2704-12, A5547-127, cruces de los mismos, y eventos relacionados de los mismos, eventos LL62, LL06 y LL601, cruces de los mismos, y eventos relacionados de los mismos; eventos T120-7, H7-1 y A5-15, cruces de los mismos, y eventos relacionados de los mismos; eventos LL cotton 25, MON 1445, 40 MON 531, MON 15985, cruces de los mismos, y eventos relacionados de los mismos; y evento EH92-527-1 y eventos relacionados del mismo,

en el cual dichos eventos relacionados se han generado introduciendo en el mismo taxón que el del evento con el cual están relacionados la misma construcción transformante que la del evento con el cual están relacionados,

en el cual en la etapa (1) la presencia o ausencia de ácidos nucleicos en una muestra se detecta usando

45

amplificación por PCR, preferentemente amplificación por PCR a tiempo real, en el cual la amplificación por PCR de los ácidos nucleicos se realiza simultáneamente a las mismas condiciones de temperatura de ciclación, usando los respectivos pares de cebadores de la siguiente tabla, o variantes que muestran al menos un 85% de identidad de secuencia con dichos pares de cebadores:

"Zm"	Dir: 5' TCTCTCCTCCTTTAGAGCTACCACTA 3' (SEC ID N° 56) Inv: 5' AATCGATCCAAAGCGAGATGA 3' (SEC ID N° 57)
"Bn"	Dir: 5' CAGCTCAACAGTTTCCAAACGA 3' (SEC ID N° 24) Inv: 5' CGACCAGCCTCAGCCTTAAG 3' (SEC ID N° 25)
"Gm"	Dir: 5' AACCGGTAGCGTTGCCAG 3' (SEC ID N° 58) Inv: 5' AGCCCATCTGCAAGCCTTT 3' (SEC ID N° 59)
"p35S"	Dir: 5' AAAGCAAGTGGATTGATGTGATA 3' (SEC ID N° 60) Inv: 5' GGGTCTTGCGAAGGATAGTG 3' (SEC ID N° 61)
"tNOS"	Dir: 5'-GATTAGAGTCCCAGCAATTATACATTTAA-3' (SEC ID N° 9) Inv: 5'-TTATCCTAGKTTGCGCGCTATATTT-3' (SEC ID N° 10)
"Cry1Ab"	Dir: 5'-ACCGGTTACACTCCCATCGA-3' (SEC ID N° 11) Inv: 5'-CAGCACCTGGCACGAACTC-3' (SEC ID N° 12)
"PAT/bar"	Dir: 5'-CGTCAACCACTACATCGAGACAA-3' (SEC ID N° 13) Inv: 5'-GTCCACTCCTGCGGTTCT-3' (SEC ID N° 14)

"PAT/pat"	Dir: 5'-CCGCGGTTTGTGATATCGTT-3' (SEC ID N° 15) Inv: 5'-TCTTGCAACCTCTCTAGATCATCAA-3' (SEC ID N° 16)
"CP4-EPSPS"	Dir: 5' GCATGCTTCACGGTGCAA 3' (SEC ID N° 22) Inv: 5' GGACCTGTGGGAGATAGACTTGTGTC 3' (SEC ID N° 23) Inv 1: 5' TGAAGGACCGGTGGGAGAT 3' (SEC ID N° 62) Inv 2: 5' TGAAGGACCTGTGGGAGAT 3' (SEC ID N° 63)
"Or"	Dir: 5' GCTTAGGGAACAGGGAAGTAAAGT 3' (SEC ID N° 51) Inv: 5' CTTAGCATAGTCTGTGCCATCCA 3' (SEC ID N° 21)
"Bv"	Dir: 5' GACCTCCATATTACTGAAAGGAAG 3' (SEC ID N° 64) Inv: 5' GAGTAATTGCTCCATCCTGTTCA 3' (SEC ID N° 65)
"Gs"	Dir: 5' AGTTTGTAGGTTTTGATGTTACATTGAG 3' (SEC ID N° 66) Inv: 5' GCATCTTTGAACCGCCTACTG 3' (SEC ID N° 67)
"St"	Dir: 5' GGACATGTGAAGAGACGGAGC 3' (SEC ID N° 68) Inv: 5' CCTACCTCTACCCCTCCGC 3' (SEC ID N° 69)

2. El método según la reivindicación 1, en el cual la etapa (1) implica la detección de la presencia o ausencia en la muestra de ácidos nucleicos que comprenden todos los ácidos nucleicos enumerados en a) - c) y d) - i).
- 5 3. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el cual la amplificación por PCR de dos o más de los ácidos nucleicos es multiplex.
4. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el cual los cebadores o pares de cebadores están marcados para permitir la detección.
- 10 5. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4,
- en el cual la etapa (1) comprende adicionalmente detectar la presencia o ausencia en la muestra del ácido nucleico j) "mCry3A": un ácido nucleico derivado del gen modificado de la proteína cristal *Cry3A* de *Bacillus thuringiensis*; y/o
  - 15 - en el cual la etapa (1) comprende adicionalmente detectar la presencia o ausencia en la muestra de uno o ambos ácidos nucleicos k) "cordapA": un ácido nucleico derivado del gen de la dihidrodipicolinato sintasa insensible a lisina (cDHDPS) *cordapA* de *Corynebacterium glutamicum* y/o l) "Glb1": un ácido nucleico derivado del promotor *Glb1* de maíz; y/o
  - 20 - en el cual la etapa (1) comprende adicionalmente detectar la presencia o ausencia en la muestra del ácido nucleico m) "Cry3Bb1": un ácido nucleico derivado del gen de la proteína cristal *Cry3Bb1* de *Bacillus thuringiensis*; y/o
  - en el cual la etapa (1) comprende adicionalmente detectar la presencia o ausencia en la muestra del ácido nucleico n) "Bxn": un ácido nucleico derivado del gen de la nitrilasa *Bxn* de *Klebsiella pneumoniae* ssp. *ozaenae*; y/o
  - 25 - en el cual la etapa (1) comprende adicionalmente detectar la presencia o ausencia en la muestra de uno o ambos ácidos nucleicos r) "Cry1Ac": un ácido nucleico derivado del gen de la proteína cristal *Cry1Ac* de *Bacillus thuringiensis* y/o s) "Cry2Ab2": un ácido nucleico derivado del gen de la proteína cristal *Cry2Ab2* de *Bacillus thuringiensis*; y/o
  - 30 - en el cual la etapa (1) comprende adicionalmente detectar la presencia o ausencia en la muestra del ácido nucleico u) "GBSS": un ácido nucleico derivado del gen de la sintasa de almidón unido a gránulo *Gbss* de *Solanum tuberosum*.
6. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el cual la etapa (1) comprende adicionalmente
- 35 detectar la presencia o ausencia en la muestra de un ácido nucleico genérico derivado de planta, preferentemente derivado de la subunidad pequeña de cloroplastos del gen de Rubisco o del gen de la CHL-ARNt sintetasa, más preferentemente en el cual la presencia o ausencia de dicho ácido nucleico genérico derivado de planta se detecta usando amplificación por PCR, preferentemente amplificación por PCR a tiempo real, usando el par de cebadores 5' AGGTCTAADGGRTAAGCTAC 3' (SEC ID N° 26) y 5' AGYCTTGATCGTTACAAAGG 3' (SEC ID N° 27), o variante
- 40 que muestra al menos un 85% de identidad de secuencia con dicho par de cebadores, opcionalmente en el cual el cebador o par de cebadores está marcado para permitir la detección.
7. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el cual los productos de amplificación se detectan usando un método de detección que es sustancialmente no específico de secuencia, preferentemente usando un
- 45 colorante fluorescente de unión a ADN, más preferentemente usando SYBR Green o PicoGreen, o en el cual los productos de amplificación se detectan mediante un marcador fluoróforo presente en al menos un cebador del par de cebadores, tal como usando la tecnología Light Upon Extension (LUX™).
8. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el cual la muestra comprende plantas o partes de las
- 50 mismas, incluyendo flores, tépalos, pétalos, sépalos, anteras, polen, semillas, frutos, pericarpios, vainas, hojas,

peciolos, tallos, raíces, rizomas, estolones, tubérculos o brotes, o partes de los mismos, células vegetales, protoplastos vegetales y/o tejidos vegetales, y/o material derivado de plantas, preferentemente material para alimentos o pienso, incluyendo material procesado para alimentos o pienso.

- 5 9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el cual en la etapa (1) la presencia o ausencia de ácidos nucleicos en una muestra se detecta usando amplificación por PCR, preferentemente amplificación por PCR a tiempo real, usando los respectivos pares de cebadores de la siguiente tabla, o variantes que muestran al menos un 85% de identidad de secuencia con dichos pares de cebadores:

"Zm"	Dir: 5' CgTCgTTTCCCATCTCTTCCTCC 3' (SEC ID N° 1) Inv: 5' CCACTCCgAgACCCTCAgTC 3' (SEC ID N° 2)
"Zm"	Dir: 5' TCTCTTCCTCCTTTAGAGCTACCACTA 3' (SEC ID N° 56) Inv: 5' AATCGATCCAAAGCGAGATGA 3' (SEC ID N° 57)
"Bn"	Dir1: 5' GAGAATGAGGAGGACCAAGCTC 3' (SEC ID N° 4) Dir2: 5'GGTGAGCTGTATAATCGAGCGA 3' (SEC ID N° 79) Inv: 5' GGCGCAGCATCGGCT 3' (SEC ID N° 3)
"Bn"	Dir: 5' CAGCTCAACAGTTTCCAAACGA 3' (SEC ID N° 24) Inv: 5' CGACCAGCCTCAGCCTTAAG 3' (SEC ID N° 25)
"Gm"	Dir: 5' CATTACCTATgAtgCCTCCACC 3' (SEC ID N° 5) Inv: 5' AAgCACgTCATgCgATTCC 3' (SEC ID N° 6) Inv': 5' AAqCACgTCATgCgATTCC 3' (SEC ID N° 49)
"Gm"	Dir: 5' AACCGGTAGCGTTGCCAG 3' (SEC ID N° 58) Inv': 5' AGCCCATCTGCAAGCCTTT 3' (SEC ID N° 59)
"p35S"	Dir: 5'-GACAGTGGTCCCAAAGATGG-3' (SEC ID N° 7) Inv: 5'-GTCTTGCGAAGGATAGTGGG-3' (SEC ID N° 8)
"p35S"	Dir: 5' AAAGCAAGTGGATTGATGTGATA 3' (SEC ID N° 60) Inv: 5' GGGTCTTGCGAAGGATAGTG 3' (SEC ID N° 61)
"tNOS"	Dir: 5'-GATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAA-3' (SEC ID N° 9) Inv: 5'-TTATCCTAGKTTGCGCGCTATATTT-3' (SEC ID N° 10)
"tNOS"	Dir: 5' CGTTCAAACATTTGGCAATAAAG 3' (SEC ID N° 28) Inv: 5' AAATGTATAATTGCGGGACTCTAATC 3' (SEC ID N° 29)
"Cry1Ab"	Dir: 5'-ACCGGTTACTACTCCCATCGA-3' (SEC ID N° 11) Inv: 5'-CAGCACCTGGCACGAAGTCC-3' (SEC ID N° 12)
"Cry1Ab"	Dir: 5' GACATCATCTGGGGYATCTT 3' (SEC ID N° 30) Inv: 5' GCGCTGTTTCATGTCGTTGAA 3' (SEC ID N° 31)
"Cry1Ab"	Dir: 5' ACGCCTTCTGGTGCAA 3' (SEC ID N° 47) Inv: 5' CCTGGTTCCTGGCGAACTC 3' (SEC ID N° 48)
"PAT/bar"	Dir: 5'-CGTCAACCACTACATCGAGACAA-3' (SEC ID N° 13) Inv: 5'-GTCCACTCCTGCGGTTCT-3' (SEC ID N° 14)
"PAT/pat"	Dir: 5'-CCGCGTTTTGTGATATCGTT-3' (SEC ID N° 15) Inv: 5'-TCTTGCAACCTCTCTAGATCATCAA-3' (SEC ID N° 16)
"CP4-EPSPS"	Dir1: 5'-GGCTCTGAGCTTCGTCCTCCTAAGG-3' (SEC ID N° 17) Dir1': 5'-GGCTCTGAGCTTCGTCCTCCTAAGG-3' (SEC ID N° 50) Dir2: 5'-ATCAGTGGCTACAGCCTGCAT-3' (SEC ID N° 18) Inv: 5'-GAATGCGGACGGTCCGAAAG-3' (SEC ID N° 19)
"CP4-EPSPS"	Dir: 5' GCATGCTTACGGTGCAA 3' (SEC ID N° 22) Inv: 5' GGACCTGTGGGAGATAGACTTGTC 3' (SEC ID N° 23) Inv 1: 5' TGAAGGACCGGTGGGAGAT 3' (SEC ID N° 62) Inv 2: 5' TGAAGGACCTGTGGGAGAT 3' (SEC ID N° 63)
"Or"	Dir: 5' GCTTAGGGAACAGGGAAGTAAAGTT 3' (SEC ID N° 20) Dir': 5' GCTTAGGGAACAGGGAAGTAAAGT 3' (SEC ID N° 51) Inv: 5' CTTAGCATAGTCTGTGCCATCCA 3' (SEC ID N° 21)
"Bv"	Dir: 5' GACCTCCATATTACTGAAAGGAAG 3' (SEC ID N° 64) Inv: 5' GAGTAATTGCTCCATCCTGTTCA 3' (SEC ID N° 65)
"Gs"	Dir: 5' AGTTTGTAGTTTTGATGTTACATTGAG 3' (SEC ID N° 66) Inv: 5' GCATCTTTGAACCGCCTACTG 3' (SEC ID N° 67)
"St"	Dir: 5' GGACATGTGAAGAGACGGAGC 3' (SEC ID N° 68) Inv: 5' CCTACCTCTACCCCTCCGC 3' (SEC ID N° 69)
planta genérica	Dir: 5' AGGTCTAADGGRTAAGCTAC 3' (SEC ID N° 26) Inv: 5' AGYCTTGATCGTTACAAAGG 3' (SEC ID N° 27)

10

10. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual la etapa (2) comprende las etapas de:

(i) definir un conjunto de ácidos nucleicos, referido como conjunto "G<sub>SAM</sub>", que consiste en ácidos nucleicos detectados en la etapa (1) como presentes en la muestra;

(ii) definir uno o más conjuntos de ácidos nucleicos, mencionados como conjunto "G<sub>X</sub>", elegidos entre el grupo de conjuntos que comprenden o consisten en conjuntos "G<sub>Bt176</sub>", "G<sub>Bt11</sub>", "G<sub>Bt10</sub>", "G<sub>MON810</sub>", "G<sub>MON863</sub>", "G<sub>TC1507</sub>", "G<sub>NK603</sub>", "G<sub>T25</sub>", "G<sub>GA21</sub>", "G<sub>DAS-59122</sub>", "G<sub>MIR604</sub>", "G<sub>LY038</sub>", "G<sub>MON88017</sub>", "G<sub>Topas 19/2</sub>", "G<sub>MS1</sub>", "G<sub>RF1</sub>", "G<sub>RF2</sub>", "G<sub>MS1/RF1</sub>", "G<sub>MS1/RF2</sub>", "G<sub>MS8</sub>", "G<sub>RF3</sub>", "G<sub>MS8/RF3</sub>", "G<sub>GT73</sub>", "G<sub>T45</sub>", "G<sub>Liberator pHoe6/Ac</sub>", "G<sub>GS40/90pHoe6/Ac</sub>", "G<sub>OXY235</sub>", "G<sub>MON40-3-2</sub>", "G<sub>MON89788</sub>", "G<sub>A2704-12</sub>", "G<sub>A5547-127</sub>", "G<sub>LL62</sub>", "G<sub>LL06</sub>", "G<sub>LL601</sub>", "G<sub>T120-7</sub>", "G<sub>H7-1</sub>", "G<sub>A5-15</sub>", "G<sub>LL cotton 25</sub>", "G<sub>MON1445</sub>", "G<sub>MON531</sub>", "G<sub>MON15985</sub>" y "G<sub>EH92-527-1</sub>"; correspondientes a uno o más eventos de plantas transgénicas respectivos de interés ("X") elegidos entre el grupo que comprende o que consiste en eventos Bt176, Bt11, Bt10, MON810, MON863, TC1507, NK603, T25, GA21, DAS-59122, MIR604, LY038, MON88017, Topas 19/2, MS1, RF1, RF2, MS1/RF1, MS1/RF2, MS8, RF3, MS8/RF3, GT73, T45, Liberator pHoe6/Ac, GS40/90pHoe6/Ac, OXY235; MON40-3-2, MON89788, A2704-12, A5547-127, LL62, LL06, LL601, T120-7, H7-1, A5-15, LL cotton 25, MON1445, MON531, MON15985 y EH92-527-1, en los cuales:

- 15 -  $G_{Bt176} \in \{Zm; p35S; Cry1Ab; PAT/bar\}$ ,
- $G_{Bt11} \in \{Zm; p35S; tNOS; Cry1Ab; PAT/pat\}$ ,
- $G_{Bt10} \in \{Zm; p35S; tNOS; Cry1Ab; PAT/pat\}$ ,
- $G_{MON810} \in \{Zm; p35S; tNOS; Cry1Ab\}$ ,
- $G_{MON863} \in \{Zm; p35S; tNOS\}$ ,
- 20 -  $G_{TC1507} \in \{Zm; p35S; PAT/pat\}$ ,
- $G_{NK603} \in \{Zm; p35S; tNOS; CP4-EPSPS\}$ ,
- $G_{T25} \in \{Zm; p35S; PAT/pat\}$ ,
- $G_{GA21} \in \{Zm; tNOS\}$ ,
- $G_{DAS-59122} \in \{Zm; p35S; PAT/bar\}$ ,
- 25 -  $G_{MIR604} \in \{Zm; tNOS; mCry3A\}$ , o  $G_{MIR604} \in \{Zm; tNOS\}$
- $G_{LY038} \in \{Zm; p35S; tNOS; cordapA; Glb1\}$ , o  $G_{LY038} \in \{Zm; p35S; tNOS\}$ ,
- $G_{MON88017} \in \{Zm; p35S; tNOS; CP4-EPSPS; Cry3Bb1\}$ , o  $G_{MON88017} \in \{Zm; p35S; tNOS; CP4-EPSPS\}$ ,
- $G_{Topas 19/2} \in \{Bn; p35S; PAT/pat\}$ ,
- $G_{MS1} \in \{Bn; tNOS; PAT/bar\}$ ,
- 30 -  $G_{RF1} \in \{Bn; tNOS; PAT/bar\}$ ,
- $G_{RF2} \in \{Bn; tNOS; PAT/bar\}$ ,
- $G_{MS1/RF1} \in \{Bn; tNOS; PAT/bar\}$ ,
- $G_{MS1/RF2} \in \{Bn; tNOS; PAT/bar\}$ ,
- $G_{MS8} \in \{Bn; tNOS; PAT/bar\}$ ,
- 35 -  $G_{RF3} \in \{Bn; tNOS; PAT/bar\}$ ,
- $G_{MS8/RF3} \in \{Bn; tNOS; PAT/bar\}$ ,
- $G_{GT73} \in \{Bn; CP4-EPSPS\}$ ,
- $G_{T45} \in \{Bn; p35S; PAT/pat\}$ ,
- $G_{Liberator pHoe6/Ac} \in \{Bn; p35S; PAT/pat\}$ ,
- 40 -  $G_{GS40/90pHoe6/Ac} \in \{Bn; p35S; PAT/pat\}$ ,
- $G_{OXY235} \in \{Bn; p35S; Bxn\}$ , o  $G_{OXY235} \in \{Bn; p35S\}$ ;
- $G_{MON40-3-2} \in \{Gm; p35S; tNOS; CP4-EPSPS\}$ ,
- $G_{MON89788} \in \{Gm; CP4-EPSPS\}$
- $G_{A2704-12} \in \{Gm; p35S; PAT/pat\}$ ,
- 45 -  $G_{A5547-127} \in \{Gm; p35S; PAT/pat\}$ ,
- $G_{LL62} \in \{Or; p35S; PAT/bar\}$ ,
- $G_{LL06} \in \{Or; p35S; PAT/bar\}$
- $G_{LL601} \in \{Or; p35S; tNOS; PAT/bar\}$ ,
- $G_{T120-7} \in \{Bv; p35S; PAT/pat\}$ ,
- 50 -  $G_{H7-1} \in \{Bv; p35S; CP4-EPSPS\}$ ,
- $G_{A5-15} \in \{Bv; p35S; tNOS; CP4-EPSPS\}$ ,
- $G_{LL cotton 25} \in \{Gs; p35S; tNOS; PAT/bar\}$ ,
- $G_{MON1445} \in \{Gs; p35S; tNOS; CP4-EPSPS\}$ ,
- $G_{MON531} \in \{Gs; p35S; tNOS; cry1Ac\}$ , o  $G_{MON531} \in \{Gs; p35S; tNOS\}$
- 55 -  $G_{MON15985} \in \{Gs; p35S; tNOS; cry1Ac; cry2Ab2\}$  o  $G_{MON15985} \in \{Gs; p35S; tNOS\}$ , y
- $G_{EH92-527-1} \in \{St; tNOS; Gbss\}$  o  $G_{EH92-527-1} \in \{St; tNOS\}$ ;

(iii) realizar para cada conjunto de interés G<sub>X</sub> operaciones lógicas:

- 60 - si G<sub>X</sub> es igual a G<sub>SAM</sub> (G<sub>X</sub> = G<sub>SAM</sub>), entonces el material derivado del evento de planta transgénica X o de un cruce del mismo, o de un evento relacionado con el mismo, está potencialmente presente en la muestra;
- si G<sub>X</sub> es un subconjunto apropiado de G<sub>SAM</sub> (G<sub>X</sub> ⊂ G<sub>SAM</sub>), entonces el material derivado del evento de planta

transgénica *X* o de un cruce del mismo, o de un evento relacionado con el mismo, está potencialmente presente en la muestra;

- si  $G_X$  no es igual a  $G_{SAM}$  y  $G_X$  no es un subconjunto apropiado de  $G_{SAM}$ , ( $G_X \neq G_{SAM}$  y  $G_X \not\subset G_{SAM}$ ), entonces el material derivado del evento de planta transgénica *X* o de un cruce del mismo, o de un evento relacionado con el mismo, está ausente de la muestra.

11. Un método para examinar en una muestra la presencia o ausencia de material derivado de uno o más eventos de plantas transgénicas que comprende las etapas de:

10 (1) detectar la presencia o ausencia en la muestra de ácidos nucleicos que comprenden:

- uno, más de uno o todos los ácidos nucleicos elegidos entre:

- 15 a) "Zm": un ácido nucleico derivado de y específico para el taxón *Zea mays*, preferentemente *Zea mays* ssp. *mays*,  
 b) "Bn": un ácido nucleico derivado de y específico para el taxón *Brassica napus*,  
 c) "Gm": un ácido nucleico derivado de y específico para el taxón *Glycine max*,  
 o) "Or": un ácido nucleico derivado de y específico para el taxón *Oryza sativa*,  
 p) "Bv": un ácido nucleico derivado de y específico para el taxón *Beta vulgaris*,  
 20 q) "Gs": un ácido nucleico derivado de y específico para el taxón *Gossypium*, y  
 t) "St": un ácido nucleico derivado de y específico para el taxón *Solanum tuberosum*;

- uno, más de uno o todos los ácidos nucleicos elegidos entre:

- 25 d) "p35S": un ácido nucleico derivado del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor,  
 e) "tNOS": un ácido nucleico derivado del terminador 3' del gen de la nopalina sintetasa de *Agrobacterium tumefaciens*,  
 f) "Cry1Ab": un ácido nucleico derivado del gen de la proteína cristal *Cry1Ab* de *Bacillus thuringiensis*,  
 g) "PAT/bar": un ácido nucleico derivado del gen de la fosfinotricina acetiltransferasa (PAT) *bar* de  
 30 *Streptomyces hygrosopicus*,  
 f) "PAT/pat": un ácido nucleico derivado del gen de la fosfinotricina acetiltransferasa (PAT) *pat* de *Streptomyces viridochromogenes*, y  
 i) "CP4-EPSPS": un ácido nucleico derivado del gen de la 5-enol-piruvilshikimato-3-fosfato sintasa *EPSPS* de *Agrobacterium* sp. CP4; y

- opcionalmente, uno, más de uno o todos los ácidos nucleicos elegidos entre:

- 35 j) "mCry3A": un ácido nucleico derivado del gen modificado de la proteína cristal *Cry3A* de *Bacillus thuringiensis*,  
 40 k) "cordapA": un ácido nucleico derivado del gen de la dihidrodipicolinato sintasa insensible a lisina (cDHDPS) *cordapA* de *Corynebacterium glutamicum*,  
 l) "Glb1": un ácido nucleico derivado del promotor *Glb1* de maíz,  
 m) "Cry3Bb1": un ácido nucleico derivado del gen de la proteína cristal *Cry3Bb1* de *Bacillus thuringiensis*,  
 n) "Bxn": un ácido nucleico derivado del gen de la nitrilasa *Bxn* de *Klebsiella pneumoniae* ssp. *ozaenae*,  
 45 r) "Cry1Ac": un ácido nucleico derivado del gen de la proteína cristal *Cry1Ac* de *Bacillus thuringiensis*,  
 s) "Cry2Ab2": un ácido nucleico derivado del gen de la proteína cristal *Cry2Ab2* de *Bacillus thuringiensis*, y  
 u) "GBSS": un ácido nucleico derivado del gen de la sintasa de almidón unido a gránulo *Gbss* de *Solanum tuberosum*; y

50 (2) concluir la presencia o ausencia en la muestra de material derivado de uno o más eventos de una planta transgénica de interés elegido entre el grupo que comprende: eventos Bt176, Bt11, Bt10, MON810, MON863, TC1507, NK603, T25, GA21, DAS-59122, MIR604, LY038, MON88017, cruces de los mismos, y eventos relacionados de los mismos; eventos Topas 19/2, MS1, RF1, RF2, RF3, MS8, GT73, T45, Liberator pHoe6/Ac, GS40/90pHoe6/Ac, OXY235, cruces de los mismos incluyendo MS1/RF1, MS1/RF2, MS8/RF3, y eventos  
 55 relacionados de los mismos; eventos MON 40-3-2, MON89788, A2704-12, A5547-127, cruces de los mismos, y eventos relacionados de los mismos, eventos LL62, LL06 y LL601, cruces de los mismos, y eventos relacionados de los mismos; eventos T120-7, H7-1 y A5-15, cruces de los mismos, y eventos relacionados de los mismos; eventos LL cotton 25, MON 1445, MON 531, MON15985, cruces de los mismos, y eventos relacionados de los mismos; y el evento EH92-527-1 y eventos relacionados del mismo,

60 en el cual dichos eventos relacionados se han generado introduciendo en el mismo taxón que el del evento con el cual están relacionados la misma construcción transformante que la del evento con el cual están relacionados;  
 en el cual en la etapa (1) la presencia o ausencia de ácidos nucleicos en una muestra se detecta usando amplificación por PCR, preferentemente amplificación por PCR a tiempo real, usando los respectivos pares de cebadores de la siguiente tabla, o variantes que muestran al menos un 85% identidad de secuencia con dichos  
 65 pares de cebadores:

"Zm"	Dir: 5' TCTCTTCCTCCTTTAGAGCTACCACTA 3' (SEC ID N° 56) Inv: 5' AATCGATCCAAAGCGAGATGA 3' (SEC ID N° 57)
"Bn"	Dir: 5' CAGCTCAACAGTTTCCAAACGA 3' (SEC ID N° 24) Inv: 5' CGACCAGCCTCAGCCTTAAG 3' (SEC ID N° 25)
"Gm"	Dir: 5' AACCGGTAGCGTTGCCAG 3' (SEC ID N° 58) Inv: 5' AGCCCATCTGCAAGCCTTT 3' (SEC ID N° 59)
"p35S"	Dir: 5' AAAGCAAGTGGATTGATGTGATA 3' (SEC ID N° 60) Inv: 5' GGGTCTTGCGAAGGATAGTG 3' (SEC ID N° 61)
"tNOS"	Dir: 5'-GATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAA-3' (SEC ID N° 9) Inv: 5'-TTATCCTAGKTTGCGCGCTATATTT-3' (SEC ID N° 10)
"Cry1Ab"	Dir: 5'-ACCGGTTACTCTCCCATCGA-3' (SEC ID N° 11) Inv: 5'-CAGCACCTGGCAGCAACTC-3' (SEC ID N° 12)
"PAT/bar"	Dir: 5'-CGTCAACCACTACATCGAGACAA-3' (SEC ID N° 13) Inv: 5'-GTCCACTCCTGCGGTTCT-3' (SEC ID N° 14)
"PAT/pat"	Dir: 5'-CCGCGGTTTGTGATATCGTT-3' (SEC ID N° 15) Inv: 5'-TCTTGCAACCTCTAGATCATCAA-3' (SEC ID N° 16)
"CP4-EPSPS"	Dir: 5' GCATGCTTACCGGTGCAA 3' (SEC ID N° 22) Inv: 5' GGACCTGTGGGAGATAGACTTGTC 3' (SEC ID N° 23) Inv 1: 5' TGAAGGACCGGTGGGAGAT 3' (SEC ID N° 62) Inv 2: 5' TGAAGGACCTGTGGGAGAT 3' (SEC ID N° 63)
"Or"	Dir: 5' GCTTAGGGAACAGGGAAAGTAAAGT 3' (SEC ID N° 51) Inv: 5' CTTAGCATAGTCTGTGCCATCCA 3' (SEC ID N° 21)
"Bv"	Dir: 5' GACCTCCATATTACTGAAAGGAAG 3' (SEC ID N° 64) Inv: 5' GAGTAATTGCTCCATCCTGTTC 3' (SEC ID N° 65)
"Gs"	Dir: 5' AGTTTGTAGGTTTTGATGTTACATTGAG 3' (SEC ID N° 66) Inv: 5' GCATCTTTGAACCGCCTACTG 3' (SEC ID N° 67)
"St"	Dir: 5' GGACATGTGAAGAGACGGAGC 3' (SEC ID N° 68) Inv: 5' CCTACCTTACCCCTCCGC 3' (SEC ID N° 69)

y en el cual la etapa (2) comprende las etapas de:

- 5 (i) asignar a ácidos nucleicos elegidos entre el grupo que comprende o que consiste en "Zm", "Bn", "Gm", "p35S", "tNOS", "Cry1Ab", "PAT/bar", "PAT/pat", "CP4-EPSPS", "mCry3A", "cordap A", "Glb1", "Cry3Bb1", "Bxn", "Or", "by", "Gs", "Cry1Ac", "Cry2ab2", "St" y "Gbs" valores primos únicos "V<sub>Zm</sub>", "V<sub>Bn</sub>", "V<sub>Gm</sub>", "V<sub>p35S</sub>", "V<sub>tNOS</sub>", "V<sub>Cry1Ab</sub>", "V<sub>PAT/bar</sub>", "V<sub>PAT/pat</sub>", "V<sub>CP4-EPSPS</sub>", "V<sub>mCry3A</sub>", "V<sub>cordapA</sub>", "V<sub>Glb1</sub>", "V<sub>Cry3Bb1</sub>", "V<sub>Bxn</sub>", "V<sub>Or</sub>", "V<sub>Bv</sub>", "V<sub>Gs</sub>", "V<sub>Cry1Ac</sub>", "V<sub>Cry2ab2</sub>", "V<sub>st</sub>" y "V<sub>Gbs</sub>", respectivamente,
- 10 (ii) asignar a cada evento de planta transgénica de interés ("X") un valor "VG<sub>X</sub>" elegido entre el grupo que comprende o que consiste en valores "VG<sub>Bt176</sub>", "VG<sub>Bt11</sub>", "VG<sub>Bt10</sub>", "VG<sub>MON810</sub>", "VG<sub>MON863</sub>", "VG<sub>TC1507</sub>", "VG<sub>NK603</sub>", "VG<sub>T25</sub>", "VG<sub>GA21</sub>", "VG<sub>DAS-59122</sub>", "VG<sub>MIR604</sub>", "VG<sub>LY038</sub>", "VG<sub>MON88017</sub>", "VG<sub>Topas 19/2</sub>", "VG<sub>MS1</sub>", "VG<sub>RF1</sub>", "VG<sub>RF2</sub>", "VG<sub>MS1/RF1</sub>", "VG<sub>MS1/RF2</sub>", "VG<sub>MMS8</sub>", "VG<sub>RF3</sub>", "VG<sub>MMS8/RF3</sub>", "VG<sub>GT73</sub>", "VG<sub>T45</sub>", "VG<sub>LiberatorpHoe6/Ac</sub>", "VG<sub>GS40/90pHoe6/Ac</sub>", "VG<sub>OXY235</sub>", "VG<sub>MON40-3-2</sub>", "VG<sub>MON89788</sub>", "VG<sub>A2704-12</sub>", "VG<sub>A5547-127</sub>", "VG<sub>LL62</sub>", "VG<sub>LL06</sub>", "VG<sub>LL601</sub>", "VG<sub>T120-7</sub>", "VG<sub>H7-1</sub>", "VG<sub>A5-15</sub>", "VG<sub>LLcotton25</sub>", "VG<sub>MON1445</sub>", "VG<sub>MON531</sub>", "VG<sub>MON15985</sub>" y "VG<sub>EH92-527-1</sub>", en los cuales:

- $VG_{Bt176} = V_{Zm} \times V_{p35S} \times V_{Cry1Ab} \times V_{PAT/bar}$ ,
- $VG_{Bt11} = V_{Zm} \times V_{p35S} \times V_{tNOS} \times V_{Cry1Ab} \times V_{PAT/pat}$ ,
- $VG_{Bt10} = V_{Zm} \times V_{p35S} \times V_{tNOS} \times V_{Cry1Ab} \times V_{PAT/pat}$ ,
- 20 -  $VG_{MON810} = V_{Zm} \times V_{p35S} \times V_{tNOS} \times V_{Cry1Ab}$ ,
- $VG_{MON863} = V_{Zm} \times V_{p35S} \times V_{tNOS}$ ,
- $VG_{TC1507} = V_{Zm} \times V_{p35S} \times V_{PAT/pat}$ ,
- $VG_{NK603} = V_{Zm} \times V_{p35S} \times V_{tNOS} \times V_{CP4-EPSPS}$ ,
- $VG_{T25} = V_{Zm} \times V_{p35S} \times V_{PAT/pat}$ ,
- 25 -  $VG_{GA21} = V_{Zm} \times V_{tNOS}$ ,
- $VG_{DAS-59122} = V_{Zm} \times V_{p35S} \times V_{PAT/bar}$ ,
- $VG_{MIR604} = V_{Zm} \times V_{tNOS} \times V_{mCry3A}$ , o  $VG_{MIR604} = V_{Zm} \times V_{tNOS}$ ,
- $VG_{LY038} = V_{Zm} \times V_{p35S} \times V_{tNOS} \times V_{cordapA} \times V_{Glb1}$  o  $VG_{LY038} = V_{Zm} \times V_{p35S} \times V_{tNOS}$ ,
- $VG_{MON88017} = V_{Zm} \times V_{p35S} \times V_{tNOS} \times V_{CP4-EPSP} \times V_{Cry3Bb1}$ , o  $VG_{MON88017} = V_{Zm} \times V_{p35S} \times V_{tNOS} \times V_{CP4-EPSP}$ ,
- 30 -  $VG_{Topas 19/2} = V_{Bn} \times V_{p35S} \times V_{PAT/pat}$ ,
- $VG_{MS1} = V_{Bn} \times V_{tNOS} \times V_{PAT/bar}$ ,
- $VG_{RF1} = V_{Bn} \times V_{tNOS} \times V_{PAT/bar}$ ,
- $VG_{RF2} = V_{Bn} \times V_{tNOS} \times V_{PAT/bar}$ ,
- $VG_{MMS8} = V_{Bn} \times V_{tNOS} \times V_{PAT/bar}$ ,
- 35 -  $VG_{RF3} = V_{Bn} \times V_{tNOS} \times V_{PAT/bar}$ ,
- $VG_{MS1/RF1} = V_{Bn} \times V_{tNOS} \times V_{PAT/bar}$ ,

- $VG_{MS1/RF2} = V_{Bn} \times V_{tNOS} \times V_{PAT/bar}$ ,
- $VG_{MS8/RF3} = V_{Bn} \times V_{tNOS} \times V_{PAT/bar}$ ,
- $VG_{GT73} = V_{Bn} \times V_{CP4-EPSPS}$ ,
- $VG_{T45} = V_{Bn} \times V_{p35S} \times V_{PAT/pat}$ ,
- 5 -  $VG_{Liberator\ pHoe6/Ac} = V_{Bn} \times V_{p35S} \times V_{PAT/pat}$ ,
- $VG_{GS40/90pHoe6/Ac} = V_{Bn} \times V_{p35S} \times V_{PAT/pat}$ ,
- $VG_{OXY235} = V_{Bn} \times V_{p35S} \times V_{Bxn}$ , o  $VG_{OXY235} = V_{Bn} \times V_{p35S}$ ,
- $VG_{MON40-3-2} = V_{Gm} \times V_{p35S} \times V_{tNOS} \times V_{CP4-EPSPS}$ ,
- $VG_{MON89788} = V_{Gm} \times V_{CP4-EPSPS}$ ,
- 10 -  $VG_{2704-12} = V_{Gm} \times V_{p35S} \times V_{PAT/pat}$ ,
- $VG_{A5547-127} = V_{Gm} \times V_{p35S} \times V_{PAT/pat}$ ,
- $VG_{LL62} = V_{Or} \times V_{p35S} \times V_{PAT/bar}$ ,
- $VG_{LL06} = V_{Or} \times V_{p35S} \times V_{PAT/bar}$ ,
- $VG_{LL601} = V_{Or} \times V_{p35S} \times V_{tNOS} \times V_{PAT/bar}$ ,
- 15 -  $VG_{T1720-7} = V_{Bv} \times V_{p35S} \times V_{PAT/pat}$ ,
- $VG_{H7-1} = V_{Bv} \times V_{p35S} \times V_{CP4-EPSPS}$ ,
- $VG_{A5-15} = V_{Bv} \times V_{p35S} \times V_{tNOS} \times V_{CP4-EPSPS}$ ,
- $VG_{LL\ cotton\ 25} = V_{Gs} \times V_{p35S} \times V_{tNOS} \times V_{PAT/bar}$ ,
- $VG_{MON1445} = V_{Gs} \times V_{p35S} \times V_{tNOS} \times V_{CP4-EPSPS}$ ,
- 20 -  $VG_{MON531} = V_{Gs} \times V_{p35S} \times V_{tNOS} \times V_{Cry1Ac}$ , o  $VG_{MON531} = V_{Gs} \times V_{p35S} \times V_{tNOS}$ ,
- $VG_{MON15985} = V_{Gs} \times V_{p35S} \times V_{tNOS} \times V_{Cry1Ac} \times V_{Cry2Ab2}$ , o  $VG_{MON15985} = V_{Gs} \times V_{p35S} \times V_{tNOS}$ ,
- y  $VG_{EH92-527-1} = V_{St} \times V_{tNOS} \times V_{Gbss}$ , o  $VG_{EH92-527-1} = V_{St} \times V_{tNOS}$ ,

- (iii) proporcionar un valor " $VG_{SAM}$ " que es un múltiplo de los valores primos únicos asignados a los ácidos nucleicos detectados en la etapa (1) como presentes en la muestra,
- 25 (iv) realizar para cada evento de interés ("X") operaciones lógicas:

- si  $VG_{SAM} / VG_X$  es igual a 1, entonces el material derivado del evento de planta transgénica X o de un cruce del mismo, o de un evento relacionado con el mismo, está potencialmente presente en la muestra;
- 30 - si  $VG_{SAM} / VG_X$  es un número entero mayor de 1, entonces el material derivado del evento de planta transgénica X o de un cruce del mismo, o de un evento relacionado con el mismo, está potencialmente presente en la muestra;
- si  $VG_{SAM} / VG_X$  no es un número entero, entonces el material derivado del evento de planta transgénica X o de un cruce del mismo, o de un evento relacionado con el mismo, está ausente de la muestra.

35 12. El método según la reivindicación 11 que incluye adicionalmente las características de cualquiera de las reivindicaciones 2, 3, 4 o 6 a 9.

40 13. Un método para determinar la presencia o ausencia de dos o más eventos, preferentemente eventos de plantas transgénicas, o material de los mismos en una muestra, en el cual dicho evento se **caracteriza por** uno o más rasgos, que comprende las etapas de:

- (1) detectar la presencia o ausencia en la muestra de dicho uno o más rasgos,
- (2) concluir la presencia o ausencia en la muestra de dicho uno o más eventos mediante un dispositivo de
- 45 computación programable, que comprende:

- (a) asignar un valor numérico primo único a cada rasgo,
- (b) representar cada evento como un producto de los valores numéricos primos asignados a rasgos
- 50 característicos de dicho evento,
- (c) representar la muestra como un producto de los valores numéricos primos asignados a rasgos detectados como presentes en la muestra, y
- (d) dividir el producto que representa la muestra definido en (c) por el producto que representa un evento
- definido en (b), de manera que:

- si el valor obtenido por dicha división es igual a 1, entonces dicho evento o material del mismo está
- potencialmente presente en la muestra;
- si el valor obtenido por dicha división es un número entero mayor de 1, entonces dicho evento o material
- del mismo está potencialmente presente en la muestra;
- si el valor obtenido por dicha división no es un número entero, entonces dicho evento o material del
- 60 mismo está ausente de la muestra.

14. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el cual la etapa (2) se realiza mediante un dispositivo de computación.

15. Un dispositivo de computación programable que comprende un medio adaptado para realizar la etapa (2) del método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

16. Un soporte de datos que comprende un programa informático adaptado para realizar la etapa (2) del método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

17. Una combinación de pares de cebadores o variantes que muestra al menos un 85% identidad de secuencia con dichos pares de cebadores, opcionalmente en la cual los cebadores o pares de cebadores están marcados para permitir la detección, que comprende:

10

- un par de cebadores para la amplificación del ácido nucleico d) como se define en la reivindicación 1,
- un par de cebadores para la amplificación del ácido nucleico e) como se define en la reivindicación 1,
- un par de cebadores para la amplificación del ácido nucleico f) como se define en la reivindicación 1,
- un par de cebadores para la amplificación del ácido nucleico g) como se define en la reivindicación 1,

15

- un par de cebadores para la amplificación del ácido nucleico h) como se define en la reivindicación 1,
- un par de cebadores para la amplificación del ácido nucleico i) como se define en la reivindicación 1, y

20

- uno, más de uno o todos los pares de cebadores seleccionados entre: un par de cebadores para la amplificación del ácido nucleico a) como se define en la reivindicación 1, un par de cebadores para la amplificación del ácido nucleico b) como se define en la reivindicación 1, un par de cebadores para la amplificación del ácido nucleico c) como se define en la reivindicación 1, un par de cebadores para la amplificación del ácido nucleico o) como se define en la reivindicación 1, un par de cebadores para la amplificación del ácido nucleico p) como se define en la reivindicación 1, un par de cebadores para la amplificación del ácido nucleico q) como se define en la reivindicación 1, y un par de cebadores para la amplificación del ácido nucleico t) como se define en la reivindicación 1,

25

en la cual los pares de cebadores o variantes de los mismos son como se definen en las reivindicaciones 1 ó 9, en donde opcionalmente la combinación comprende adicionalmente un par de cebadores para la amplificación de un ácido nucleico genérico derivado de plantas como se define en la reivindicación 6.

18. Un kit para examinar en una muestra la ausencia o presencia potencial de material derivado de uno o más eventos de una planta transgénica, comprendiendo el kit una combinación de pares de cebadores o variantes que muestran al menos un 85% de identidad de secuencia con dichos pares de cebadores, en donde los cebadores o pares de cebadores están opcionalmente marcados para permitir la detección, que comprende:

30

- un par de cebadores para la amplificación del ácido nucleico d) como se define en la reivindicación 1,
- un par de cebadores para la amplificación del ácido nucleico e) como se define en la reivindicación 1,
- un par de cebadores para la amplificación del ácido nucleico f) como se define en la reivindicación 1,
- un par de cebadores para la amplificación del ácido nucleico g) como se define en la reivindicación 1,
- un par de cebadores para la amplificación del ácido nucleico h) como se define en la reivindicación 1,
- un par de cebadores para la amplificación del ácido nucleico i) como se define en la reivindicación 1, y

40

- uno, más de uno o todos los pares de cebadores seleccionados entre: un par de cebadores para la amplificación del ácido nucleico a) como se define en la reivindicación 1, un par de cebadores para la amplificación del ácido nucleico b) como se define en la reivindicación 1, un par de cebadores para la amplificación del ácido nucleico c) como se define en la reivindicación 1, un par de cebadores para la amplificación del ácido nucleico o) como se define en la reivindicación 1, un par de cebadores para la amplificación del ácido nucleico p) como se define en la reivindicación 1, un par de cebadores para la amplificación del ácido nucleico q) como se define en la reivindicación 1, y un par de cebadores para la amplificación de ácido nucleico t) como se define en la reivindicación 1,

45

en el cual los pares de cebadores o variantes de los mismos son como se definen en las reivindicaciones 1 ó 9, en donde el kit opcionalmente comprende además un par de cebadores para la amplificación de un ácido nucleico genérico derivado de plantas como se define en la reivindicación 6.

50



**FIGURA 1A**

**ADH (*Zea Mays*)**

GAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGTATCCGTCGTTTCCCATCTCTTCCTCCTTTAGTAGCT  
ACCACTATATAAATCAGGGCTCATTTTCTCGCTCCTCACAGGCTCATCTCGCTTTGGATC  
GATTGGTTTCGTAACCTGGTGAGGGACTGAGGGTCTCGGAGTGGGTC (SEC ID N°: 32)

**ADH (*Zea mays*)**

GAATTCGCCCTTAATCGATCCAAAGCGAGATGAGCCTGTGAGGAGCGAGAAAATGAGCC  
CTGATTTATATAGTGGTAGCTCTAAAGGAGGAAGAGAAAGGGCGAATTC (SEC ID N°:  
70)

**Lectin (*Glycine max*)**

GAATTGCGCCCTTCATTACCTATGATGCCTCCACCAACCTCTTGTGTTGCTTCTTTGGTT  
CATCCTTCGCAGAGAAGCAGCTATATCCTCTCCGGATGTGGTTCGATTTGAAGACTTCTCT  
TCCCGAGTTGGGGGGTTGAGGATAGGGGTTCTCGTGCGTGCCACGTGGGACTCGACAT  
AGCCTGGGGAATCGCATGACGTGCTTAAGGGCGAATTC (SEC ID N°: 33)

**SLTM (*Glycine max*)**

GAATTCGCCCTTAACCGGTAGCGTTGCCAGCTTCGCCGCTTCCTTCAACTTCACCTTCTA  
TGCCCTGACACAAAAGGCTTGCAGATGGGCTAAGGGCGAATTC (SEC ID N°: 71)

**p35S (más largo)**

GCTCGAATTCGCCCTTGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAACATC  
GTGGAAGAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTC  
CACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACAAGGGCGAATTCG  
TAA (SEC ID N°: 34)

**FIGURA 1B**

**p35S (corto)**

GAATTCGCCCTTGGGTCTTGCGAAGGATAGTGGGATTGTGCGTCATCCCTTACGTCAGT  
GGAGATATCACATCAATCCACTTGCTTTAAGGGCGAATTC (SEC ID N°: 72)

**iNOS (TNOS-D)**

GCTCGAATTCGCCCTTTATCCTAGGTTGCGCGCTATATTTGTTTTCTATCGCGTATTAAA  
TGTATAATTGCGGGACTCTAATCAAGGGCGAATTCGTAA (SEC ID N°: 35)

**CRY1Ab**

GCTCGAATTCGCCCTTACGCCTTCCTGGTGCAAATCGAGCAGCTCATCAACCAGAGGAT  
CGAGGAGTTCGCCAGGAACCAGGAAGGGCGAATTCGTAA (SEC ID N°: 36)

**CRY 1Ab**

GCTCGAATTCGCCCTTACCGGTTACACTCCCATCGACATCTCCCTCTCCCTCACGCAGTT  
CCTGCTCAGCGAGTTCGTGCCAGGTGCTGAAGGGCGAATTCGTAA (SEC ID N°: 37)

**CRY 1Ab (Bt11)**

GCTCGAATTCGCCCTTCAGCACCTGGCACGAACTCGCTGAGCAGAACTGTGTCAAGGA  
CAAGGAGATGTCGATGGGAGTGTAAACCGGTAAGGGCGAATTCGTAA (SEC ID N°: 38)

**CRY 1Ab (MON 810)**

GAATTCGCCCTTCAGCACCTGGCACGAACTCGCTGAGCAGGAACTGCGTGAGGGAGAG  
GGAGATGTCGATGGGAGTGTAAACCGGTAAGGGCGAATTC (SEC ID N°: 73)

**FIGURA 1C**

**PAT/bar**

GCTCGAATTCGCCCTTCGTCAACCACTACATCGAGACAAGCACGGTCAACTTCCGTACC  
GAGCCGCAGGAACCGCAGGAGTGGACAAGGGCGAATTCGTAA (SEC ID N°: 39)

**PAT/pat**

GCTCGAATTCGCCCTTCGCGGTTTGTGATATCGTTAACCATTACATTGAGACGTCTACA  
GTGAACTTAGGACAGAGCCACAAACACCACAAGAGTGGATTGATGATCTAGAGAGGTT  
GCAAGAAGGGCGAATTCGTAA (SEC ID N°: 40)

**Rbcl**

GCTCGAATTCGCCCTTAGGTCTAAGGGGTAAGCTACATAACAGATATATTGATCTGGGTC  
CCCAGGAACGGGCTCGATGTGATAGCATCGTCCTTTGTAACGATCAAGGCTAAGGGCGA  
ATTCGTAA (SEC ID N°: 41)

**Rbcl (OSR Wt)**

GCTCGAATTCGCCCTTAGGTCTAAGGGGTAAGCTACATACGCAATAAATTGAGTTTCTTC  
TCCTGGAACGGGCTCGATGTGGTAGCATCGTCCTTTGTAACGATCAAGGCTAAGGGCGA  
ATTCGTAA (SEC ID N°: 42)

**tNOS (TNOS-L)**

GCTCGAATTCGCCCGTTAAATGTATAATTGCGGGACTCTAATCATAAAAACCCATCTCAT  
AAATAACGTCATGCATTACATGTTAATTATTACATGCTTAACGTAATCAACAGAAATTATA  
TGATAATCATCGCAAGACCGGCAACAGGATTCAATCTTAAGAACTTTATTGCCAAATGT  
TTGAACGAAGGGCGAATTCGTAA (SEC ID N°: 43)

**FIGURA 1D**

**ACC (*Brassica napus*)**

GCTCGAATTCGCCCTTGGCGCAGCATCGGCTCTTCTGCATAGTACCGTTTCTCCATCGA  
CCAATGGAACGAATGTCTAATAGGTGTTTCGTCTTCATCTCGCTCGATTATACAGCTCAC  
CACACCCACACCTGCGGAACACAGGCTCGAACTAATTCTTCTCTTTGAGAATTTTCTC  
CACTCTTTCTTGAGCTTGGTCCTCCTCATTCTCAAGGGCGAATTCGTAA (SEC ID N°: 44)

**CP4-EPSPS**

CTCGAATTCGCCCTTGAATGCGGACGGTTCGGAAAGGCCAGAGGATTTGCGGGCGGT  
TGCGGGCCGGCTGCTTGACCGTGAAGCATGCAGGCTGTAGCCACTGATAAGGGCGAA  
TTCGTAA (SEC ID N°: 45)

**CP4-EPSPS**

GCTCGAATTCGCCCTTGGCTCTGAGCTTCGTCTCTTAAGGTCATGTCTTCTGTTTCCAC  
GGCGTGCATGCTTACGGTGCAAGCAGCCGGCCCGCAACCGCCCGCAAATCCTCTGGC  
CTTTCCGGAACCGTCCGCATTCAAGGGCGAATTCGTAA (SEC ID N°: 46)

**CP4-EPSPS (GT 73)**

GAATTCGCCCTTTGAAGGACCTGTGGGAGATAGACTTGTACCTGGAATACGGACGGTT  
CCAGAAAGACCAGAGGACTTACGAGCAGTTGCTGGACGGCTGCTTGCACCGTGAAGCA  
TGCAAGGGCGAATTC (SEC ID N°: 74)

**CP4-EPSPS RRS**

GAATTCGCCCTTTGAAGGACCGGTGGGAGATCGACTTGTCCGGGAATGCGGACGGT  
TCCGGAAAGGCCAGAGGATTTGCGGGCGGTTGCGGGCCGGCTGCTTGCACCGTGAAG  
CATGCAAGGGCGAATTC (SEC ID N°: 75)

**FIGURA 1E**

**Fosfolipasa D (Oryza sativa)**

GCTCGAATTCGCCCTTGCTTAGGGAACAGGGAAGTAAAGTTGAATGGTGAGTATGAACC  
TGCAGGTGCGCCTTTGGATGGCACAGACTATGCTAAGAAGGGCGAATTCGTAA (SEC ID  
Nº: 52)

**CP4-EPSP**

GCTCGAATTCGCCCTTGACCTGTGGGAGATAGACTTGTGCGCCGGGAATGCGGACGGT  
TCCGGAAAGGCCAGAGGATTTGCGGGCGGTTGCGGGCCGGCTGCTTGCACCGTGAAG  
CATGCAAGGGCGAATTCGTAA (SEC ID Nº: 53)

**CP4-EPSP**

GCTCGAATTCGCCCTTGACCTGTGGGAGATAGACTTGTACCTGGAATACGGACGGTT  
CCAGAAAGACCAGAGGACTTACGAGCAGTTGCTGGACGGCTGCTTGCACCGTGAAGCA  
TGCAAGGGCGAATTCGTAA (SEC ID Nº: 54)

**Cruciferina (Brassica)**

GCTCGAATTCGCCCTTCAGCTCAACAGTTTCCAAACGAGTGCCAACTAGACCAGCTCAA  
TGCGCTGGAGCCGTCACACGTAATAAGGCTGAGGCTGGTTCGAAGGGCGAATTCGTAA  
(SEC ID Nº: 55)

**GluA3 (remolacha azucarera)**

GAATTCGCCCTTGACCTCCATATTACTGAAAGGAAGCCAAAAGGGATCAATTAAGTGCTC  
TACGAAGTTTAAAGTATGTGCCGCTCTCAAGACTGAACATGGCACTGTGAACAGGATGG  
AGCAATTACTCAAGGGCGAATTC (SEC ID Nº: 76)

**FIGURA 1F**

**Sah-7 (algodón)**

GAATTCGCCCTTAGTTTGTAGGTTTTGATGTTACATTGAGTGACAGTGAATGAAAGGGTG  
TGTAACATAAAATAATGGGAACAACCATGACATGTTGGACTGGATCAGTAGGCGGTTCA  
AAGATGCAAGGGCGAATTC (SEC ID N°: 77)

**UGPase (patata)**

GAATTCGCCCTTGGACATGTGAAGAGACGGAGCGCAGATTCCCCAGTAAGGAGGTGTG  
AGGGGCTAGTTGTAGAGGGTACGCGGAGGGGTAGAGGTAGGAAGGGCGAATTC (SEC  
ID N°: 78)

FIGURA 2

(A)

		RRS 100%		
p35S corto + tNOS	Ct	22,51	22,09	22,13
	Tm	71,5 y 76	71,5 y 76	72 y 76,5
	Ct media	22,25		
	Des. típ.	0,232		
p35S corto	Ct	22,99	22,76	22,62
	Tm	76,50	76,50	76,50
	Ct media	22,79		
	Des. típ.	0,186		
tNOS	Ct	23,03	22,83	22,76
	Tm	72,00	72,00	72,00
	Ct media	22,88		
	Des. típ.	0,142		

(B)

RRS 100% 230107 combinada

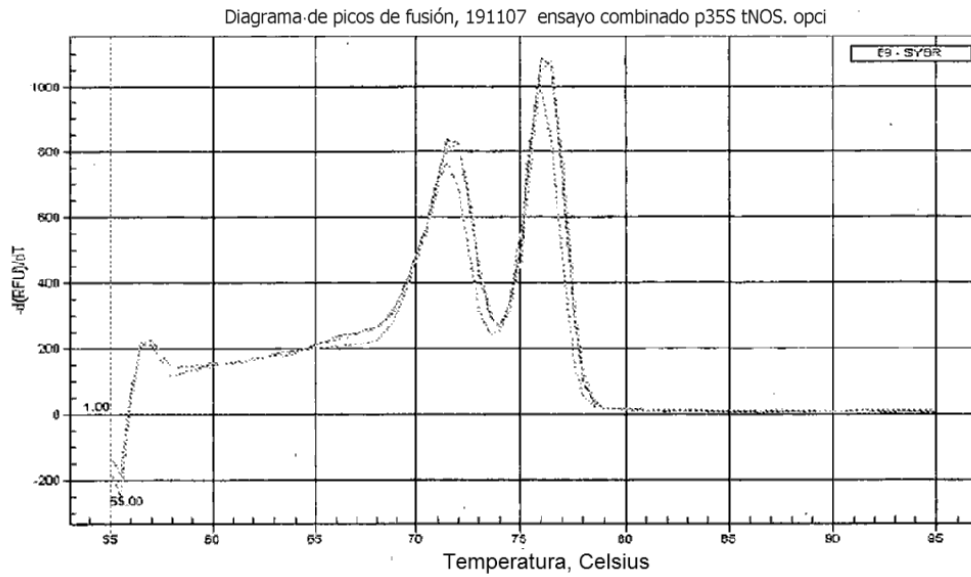
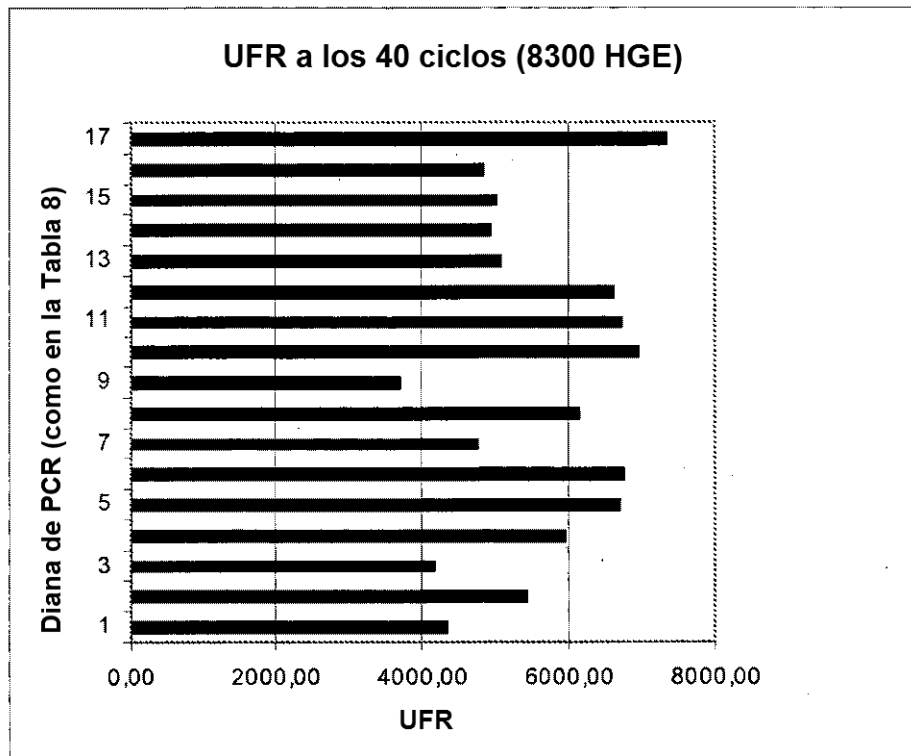


FIGURA 3





## REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

## Documentos de patentes citados en la descripción

- 10 • US 2006070139 A [0006] • DE 10005808 [0006]  
 • WO 2006108674 A [0006] • US 4683202 A [0121]  
 • US 2006282915 A [0006] • US 4965188 A [0121]  
 • WO 2005103301 A [0006] • US 5455166 A [0121]  
 15 • WO 2001032919 A [0006] • EP 0684315 A [0121]  
 • DE 19906169 [0006] • US 5409818 A [0121]  
 • EP 1724360 A [0006] • EP 0329822 A [0121]

20

## Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- 25 • DELANO et al. *J. Agr. Food Chem.*, 2003, vol. 51, 5829-5834 [0006]  
 • VESNA et al. *Acta Veterinaria*, 2002, vol. 52, 201-210 [0006]  
 • PERMINGEAT et al. *J. Agr. Food Chem.*, 2002, vol. 50, 4431-4436 [0006]  
 30 • SAXENA et al. *Soil Biol. Biochem.*, 2002, vol. 34, 133-137 [0006]  
 • LA PAZ et al. *JAOAC Int.*, 2006, vol. 89, 1347-1352 [0006]  
 35 • NADAL et al. *Electrophoresis*, 2001, vol. 27, 3879-3888 [0006]  
 • HERNÁNDEZ et al. *J Cereal Sci*, 2004, vol. 39, 99-107 [0006]  
 40 • HECK et al. *Crop Science*, 2005, vol. 45, 329-339 [0006]  
 • HERNÁNDEZ et al. *J. Agr. Food Chem.*, vol. 48, 3622-3627 [0006]  
 • YANG et al. *Transgenic Res.*, 2005, vol. 14, 817-831 [0006]  
 45 • WATANABE et al. *Biol Pharm Bull.*, 2004, vol. 27, 1333-1339 [0006]  
 • HERNANDEZ et al. *Transgenic Res*, 2003, vol. 12, 179-189 [0007]  
 50 • HERNANDEZ et al. *J Cereal Sci*, 2004, vol. 39, 99-107 [0007]  
 • BERDAL et al. *Eur Food Res Technol*, 2001, vol. 213, 432-438 [0007]  
 55 • NIELSEN et al. *Eur Food Res Technol*, 2004, vol. 219, 421-427 [0007]  
 • RONNING et al. *Eur Food Res Technol*, 2003, vol. 216, 347-354 [0007]  
 • ALTSCHUL et al. *J Mol Biol*, 1990, vol. 215, 403-10 [0066] [0205]  
 60 • TATUSOVA ; MADDEN. *FEMS Microbiol Lett*, 1999, vol. 174, 247-250 [0066] [0205]  
 • Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, vol. 1-3 [0116]  
 65 • Current Protocols in Molecular Biology. Greene Publishing and Wiley-Interscience, 1992 [0116]  
 • INNIS et al. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, 1990 [0116]  
 • Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. ROZEN ; SKALETSKY. Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, 2000, 365-386 [0116]  
 • Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, 1989, 6.3.1-6.3.6 [0118]  
 • PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, 1990 [0122]  
 • AHMADIAN et al. *Anal Biochem*, 2000, vol. 280, 103-110 [0126]  
 • LANDEGREN et al. *Science*, 1988, vol. 241, 1077 [0126]  
 • EGGERING et al. *Hum Mutat*, 1995, vol. 5, 153-165 [0126]  
 • NICKERSON et al. *PNAS*, 1990, vol. 87, 8923-8927 [0126]  
 • Real-Time PCR: An Essential Guide. Horizon Scientific Press, 2004 [0127]  
 • MARRAS SAE et al. Real-time assays with molecular beacons and other fluorescent nucleic acid hybridization probes. *Clin Chim Acta*, 2006, vol. 363, 48-60 [0127] [0129] [0131]  
 • HOLLAND et al. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *PNAS*, 1991, vol. 88, 7276-80 [0128]  
 • MANGANELLI et al. Real-time PCR using molecular beacons. *Methods Mol Med*, 2001, vol. 54, 295-310 [0129]  
 • MARRAS SAE. Selection of fluorophore and quencher pairs for fluorescent nucleic acid hybridization probes. *Methods Mol Biol*, 2006, vol. 335, 3-16 [0129]  
 • NAZARENKO et al. *Nucleic Acids Research*, 2002, vol. 30, 37 [0130]

- **NAZARENKO et al.** *Nucleic Acids Research*, 2002, vol. 30, 2089-2095 [0130]
- 5 • **ZIPPER et al.** *Nucleic Acid Res*, 2004, vol. 32, 103 [0133]
- Plant DNA isolation. **MILLIGAN.** *Molecular genetic analysis of populations: a practical approach.* IRL Press, 1992, 59-88 [0141]
- 10 • **AH et al.** *Nucleic Acids Res*, vol. 24, 2623-5 [0142]
- **SCHNEEBERGER et al.** *PCR Methods Appl*, 1995, vol. 4, 234-8 [0142]
- **SENCINA et al.** *Mol Biol Evol*, 2003, vol. 20 (4), 633-643 [0177]
- **RILEY et al.** *Nucleic Acids Res*, 1990, vol. 18, 2887-90 [0219]
- **KILSTRUP ; KRISTIANSEN.** *Nucleic Acids Res*, 2000, vol. 28, 55 [0219]