

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 654 294**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.08.2006 PCT/EP2006/007711**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.02.2007 WO07017186**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.08.2006 E 06762978 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2017 EP 1922409**

54 Título: **Plantas de algodón tolerantes a herbicidas y métodos para identificar las mismas**

30 Prioridad:

08.08.2005 EP 05076826
10.08.2005 US 707067 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.02.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

TROLINDER, LINDA y
HABEX, VEERLE

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 654 294 T3

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

DESCRIPCIÓN

Plantas de algodón tolerantes a herbicidas y métodos para identificar las mismas

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere a plantas transgénicas de algodón, materiales vegetales y semillas, caracterizados por albergar un evento de transformación específico, particularmente por la presencia de un gen que codifica una proteína que confiere tolerancia a herbicidas, en una localización específica en el genoma del algodón. Las plantas de algodón de la invención combinan el fenotipo tolerante a herbicidas con un rendimiento agronómico, estabilidad genética y adaptabilidad a diferentes fondos genéticos equivalentes a la línea de algodón no transformada en ausencia de presión de malas hierbas. Esta invención proporciona además métodos y kits para identificar la presencia de material vegetal que comprende específicamente el evento de transformación EE-GH3 en muestras biológicas.

15 Antecedentes de la invención

La expresión fenotípica de un transgén en una planta se determina tanto por la estructura del propio gen como por su localización en el genoma de la planta. Al mismo tiempo, la presencia del transgén (en un ADN foráneo) en diferentes localizaciones en el genoma influirá en el fenotipo global de la planta de diferentes maneras. La introducción agronómica o industrialmente satisfactoria de un rasgo comercialmente interesante en una planta por manipulación genética puede ser un procedimiento largo que depende de diferentes factores. La transformación real y regeneración de plantas transformadas genéticamente es únicamente lo primero en una serie de etapas de selección, que incluyen la caracterización genética extensa, el cultivo selectivo y la evaluación en ensayos de campo, que dan lugar finalmente a la selección de un evento selecto.

La fibra de algodón es el único textil más importante en todo el mundo. Se recogen aproximadamente 80 millones de acres de algodón anualmente en todo el mundo. El algodón es el quinto cultivo mayor en los Estados Unidos en términos de producción por acre, con más de 15 millones de acres plantados en 2000. Las especies de malas hierbas principales para el algodón son *Ipomoea sp.* (enredadera), *Amaranthus spp.* (verdolaga), *Cyperus spp.* (coquillo), *Xanthium spp.* (bardana) y *Sorghum spp.* (sorgo de Alepo).

Antes de la introducción de herbicidas de hoja ancha, que pudieran usarse en un campo de algodón en cultivo, los agricultores usaban aplicaciones dirigidas posteriores a la germinación de herbicidas no selectivos teniendo cuidado de que no contactaran con las plantas de cultivo en crecimiento. Como esto requiere una diferencia en la altura entre las malas hierbas y el cultivo, esto no siempre es posible. Especialmente para algodón pequeño, esta práctica consume mucho tiempo y daña potencialmente el cultivo.

La identificación inequívoca de un evento selecto está llegando a ser cada vez más importante en vista de las discusiones sobre novedosos alimentos/piensos, la segregación de GMO y productos no GMO y la identificación de material patentado. De forma ideal, dicho método de identificación es tanto rápido como simple, sin la necesidad de un entorno de laboratorio extenso. Además, el método debe proporcionar resultados que permitan la determinación inequívoca del evento selecto sin interpretación por expertos, pero que se mantendrían bajo el escrutinio por expertos si fuera necesario. En este documento se describen herramientas específicas para su uso en la identificación del evento selecto EE-GH3 en muestras biológicas.

EE-GH3 se ha identificado como un evento selecto de una población de plantas transgénicas de algodón en el desarrollo de algodón (*Gossypium hirsutum*) resistente al herbicida N-fosfometilglucina y sales de la misma, también conocido como glifosato. Las plantas transgénicas de algodón contenían un gen quimérico que confiere tolerancia a glifosato, que comprende un gen *epsps* modificado de *Zea mays* que codifica 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) tolerante a glifosato (como se describe en la patente de Estados Unidos 6.566.587) bajo el control de un promotor expresable en plantas (como se describe en el documento US 5.491.288 o el documento US 5.792.930).

En la técnica se han divulgado plantas de algodón que comprenden un gen de tolerancia a glifosato. Sin embargo, ninguna de las divulgaciones de la técnica anterior muestra o sugiere la presente invención.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a una planta transgénica de algodón, o semilla, células o tejidos de la misma, como se define a continuación, que comprende, integrado de forma estable en su genoma, un casete de expresión que comprende un gen de tolerancia a herbicidas que comprende la secuencia codificante del gen *epsps* (como se describe en el ejemplo 1.1 de este documento), que es tolerante a herbicidas y, en ausencia de presión de malas hierbas, tiene un rendimiento agronómico que es sustancialmente equivalente a la línea isogénica no transgénica. Bajo presión de malas hierbas y el tratamiento apropiado con glifosato, la planta tendrá un fenotipo agronómico superior en comparación con la planta no transgénica.

De acuerdo con la invención, la planta de algodón o semilla, células o tejidos de la misma comprende el evento selecto EE-GH3. Específicamente, la presente invención se refiere a una planta transgénica de algodón tolerante a glifosato o células, partes, semilla o descendencia de la misma, que comprenden cada uno un evento selecto en su genoma, comprendiendo dicho evento selecto un ADN foráneo que comprende un gen quimérico que comprende la secuencia codificante de un gen *epsps* modificado de *Zea mays* que codifica una enzima EPSPS tolerante a glifosato, bajo el control de un promotor expresable en plantas de un gen de histona, y donde dicho evento selecto comprende

- la SEQ ID NO: 1, estando los nucleótidos 1-732 de la SEQ ID NO: 1 inmediatamente en dirección 5' y contiguos a dicho ADN foráneo y siendo los nucleótidos 733-1214 de la SEQ ID NO: 1 el ADN foráneo y

- la SEQ ID NO: 2, estando los nucleótidos 431-654 de la SEQ ID NO: 2 inmediatamente en dirección 3' y contiguos a dicho ADN foráneo, y siendo los nucleótidos 1 a 430 de la SEQ ID NO: 2 el ADN foráneo

donde dicho evento selecto está comprendido en la semilla de referencia depositada en la ATCC con el número de depósito PTA-6878,

el ADN genómico de dicha planta de algodón o células, partes, semilla o descendencia de la misma, cuando se analiza en un protocolo de identificación por PCR con dos cebadores que comprenden la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 11, respectivamente, produce un fragmento de ADN de 334 pb.

La semilla de referencia que comprende el evento selecto de la invención se ha depositado en la ATCC con el número de acceso PTA-6878. Una realización de la invención es la semilla que comprende el evento selecto EE-GH3 depositada como el número de acceso a la ATCC PTA-6878, que se convertirá en una planta de algodón resistente a glifosato. La semilla del número de depósito de la ATCC PTA-6878, que es un lote de semillas que consiste en al menos aproximadamente un 95% de granos transgénicos homocigóticos para el transgén, que comprende el evento selecto de la invención, que se convertirá en plantas tolerantes a glifosato. La semilla puede sembrarse y las plantas en crecimiento pueden tratarse con glifosato como se describe en este documento para obtener un 100% de plantas tolerantes a glifosato, que comprenden el evento selecto de la invención. La invención se refiere además a células, tejidos, descendencia y descendientes de una planta que comprende el evento selecto de la invención que ha crecido a partir de la semilla depositada en la ATCC que tiene el número de acceso PTA-6878, y que comprende el evento selecto de la invención. La invención se refiere además a plantas que se pueden obtener por propagación y/o cruce con una planta de algodón que comprende el evento selecto de la invención cultivada a partir de la semilla depositada en la ATCC que tiene el número de acceso PTA-6878 y que comprende el evento selecto de la invención.

En este documento se divulga un método para identificar una planta transgénica, o células o tejidos de la misma, que comprenden el evento selecto EE-GH3, estando basado dicho método en la identificación de la presencia de secuencias de ADN caracterizantes o aminoácidos codificados por dichas secuencias de ADN en la planta transgénica, células o tejidos. Dichas secuencias de ADN caracterizantes pueden ser secuencias de 15 pb preferiblemente 20 pb, mucho más preferiblemente 30 pb o más que comprenden el sitio de inserción del evento, es decir, tanto una parte de ADN foráneo como una parte del genoma del algodón (la región flanqueante 5' o 3') contiguo al mismo, que permite la identificación específica del evento selecto.

La invención también se refiere a un método para identificar la presencia de un evento selecto en una planta transgénica de algodón resistente a glifosato, o células, partes, semilla o descendencia de la misma de acuerdo con la invención, comprendiendo dicho método amplificar un fragmento de ADN entre 100 y 500 pb de un ácido nucleico presente en una muestra biológica de la planta, células, partes, semilla o descendencia de la misma, usando una reacción en cadena de la polimerasa con al menos dos cebadores, reconociendo uno de dichos cebadores la región flanqueante 5' del evento selecto especificado en la reivindicación 1, teniendo dicha región flanqueante 5' la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 1 al nucleótido 732 o la región flanqueante 3' de dicho evento selecto, teniendo dicha región flanqueante 3' la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 431 al nucleótido 654, reconociendo el otro cebador de dichos cebadores una secuencia dentro del ADN foráneo que tiene la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 733 al nucleótido 1214 o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1 al nucleótido 430.

Dicho método de la invención usa una reacción en cadena de la polimerasa con al menos dos cebadores, uno de los cuales reconoce la región flanqueante 5' o 3' de EE-GH3, el otro de los cuales reconoce una secuencia dentro del ADN foráneo, para obtener un fragmento de ADN entre 100 y 500 pb. Los cebadores reconocen una secuencia dentro de la región flanqueante 5' de EE-GH3 (SEQ ID NO: 1, de la posición 1 a la posición 732) o dentro de la región flanqueante 3' de EE-GH3 (complemento de la SEQ ID NO: 2 de la posición 431 a la posición 654) y una secuencia dentro del ADN foráneo (complemento de la SEQ ID NO: 1 de la posición 733 a 1214 o la SEQ ID NO: 2 de la posición 1 a la posición 430), respectivamente. El cebador que reconoce la región flanqueante 5' puede comprender la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 y el cebador que reconoce una secuencia dentro del ADN foráneo puede comprender la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 11 descrita en este documento.

La presente invención, por tanto, se refiere más específicamente a un método para identificar el evento selecto EE-GH3 en una planta transgénica de algodón resistente a glifosato, o células, partes, semilla o descendencia de la misma, comprendiendo dicho método amplificar una secuencia de ácido nucleico presente en una muestra biológica

de la planta, células, partes, semillas y descendencia de la misma, usando una reacción en cadena de la polimerasa con dos cebadores que tienen la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 11, respectivamente, para obtener un fragmento de ADN de aproximadamente 334 pb.

5 También se divulgan en este documento las secuencia flanqueantes específicas de EE-GH3 descrito en este documento, que pueden usarse para desarrollar métodos de identificación específicos para EE-GH3 en muestras biológicas. Dichas secuencias flanqueantes incluyen las regiones flanqueantes 5' y/o 3' de EE-GH3 que pueden usarse para el desarrollo de cebadores y sondas específicos como se describe adicionalmente en este documento. Los métodos de identificación para la presencia de EE-GH3 en muestras biológicas pueden basarse en el uso de
10 dichos cebadores y sondas específicos. Los cebadores pueden consistir en una secuencia de nucleótidos de 17 a aproximadamente 200 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 1 al nucleótido 732 o el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 431 al nucleótido 654 combinada con cebadores que consisten en una secuencia de nucleótidos de 17 a
15 aproximadamente 200 nucleótidos consecutivos seleccionados del complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 733 al nucleótido 1214 o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1 al nucleótido 430. Los cebadores también pueden comprender estas secuencias de nucleótidos localizadas en su extremo 3' final, y comprenden además secuencias no relacionadas o secuencias derivadas de las secuencias de nucleótidos mencionadas, pero que comprenden emparejamientos incorrectos.

20 La invención se refiere además a un kit para identificar la presencia del evento selecto EE-GH3 en una planta transgénica de algodón resistente a glifosato, o células, partes, semilla o descendencia de la misma, comprendiendo dicho kit un cebador que reconoce la región flanqueante 5' del evento selecto especificado en la reivindicación 1, teniendo dicha región flanqueante 5' la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 1 al nucleótido 732 o un cebador que reconoce la región flanqueante 3' de dicho evento selecto, teniendo dicha región flanqueante
25 3' la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 431 al nucleótido 654, y un cebador que reconoce una secuencia dentro del ADN foráneo, teniendo dicho ADN foráneo la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 733 al nucleótido 1214 o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1 al nucleótido 430.

30 El cebador que reconoce la región flanqueante 5' puede comprender la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 y el cebador que reconoce el transgén puede comprender la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 11 o cualquier otro cebador como se describe en este documento.

35 La invención, por tanto, se refiere además a un kit para identificar la presencia del evento selecto EE-GH3 en una planta transgénica de algodón resistente a glifosato, o células, partes, semilla o descendencia de la misma, comprendiendo dicho kit los cebadores de PCR que tienen la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 11 para su uso en el protocolo de identificación por PCR de EE-GH3 descrito en este documento.

40 También se divulga en este documento un kit para identificar el evento selecto EE-GH3 en muestras biológicas, comprendiendo dicho kit una sonda específica que tiene una secuencia que corresponde (o es complementaria a) una secuencia que tiene entre un 80% y un 100% de identidad de secuencia con una región específica de EE-GH3. Preferiblemente, la secuencia de la sonda corresponde a una región específica que comprende parte de la región flanqueante 5' o 3' de EE-GH3. Mucho más preferiblemente, la sonda específica tiene (o es complementaria a) una secuencia que tiene entre un 80% y un 100% de identidad de secuencia con la secuencia entre el nucleótido 712 a
45 753 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 del nucleótido 410 a 451.

También se divulgan en este documento secuencias de ADN que comprenden el sitio de inserción del evento y una longitud suficiente de polinucleótidos tanto del ADN genómico del algodón como del ADN foráneo (transgén), para que sea útil como cebador o sonda para la detección de EE-GH3. Dichas secuencias pueden comprender al menos
50 9 nucleótidos del ADN genómico del algodón y una cantidad similar de nucleótidos del ADN foráneo (transgén) de EE-GH3 con ello en cada lado del sitio de inserción, respectivamente. Mucho más preferiblemente, dichas secuencias de ADN comprenden al menos 9 nucleótidos del ADN genómico del algodón y una cantidad similar de nucleótidos del ADN foráneo, contiguos al sitio de inserción de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2.

55 Los métodos y kits abarcados por la presente invención pueden usarse con diferentes fines tales como, aunque sin limitación, los siguientes: para identificar la presencia o ausencia de EE-GH3 en plantas, material vegetal o en productos tales como, aunque sin limitación, productos alimenticios o de pienso (frescos o procesados) que comprenden o derivan de material vegetal; de forma adicional o alternativa, los métodos y kits de la presente invención pueden usarse para identificar material vegetal transgénico con fines de segregación entre el material transgénico y no transgénico; de forma adicional o alternativa, los métodos y kits de la presente invención pueden usarse para determinar la calidad (es decir, porcentaje de material puro) del material vegetal que comprende
60 EE-GH3.

Breve descripción de los dibujos

65 Los siguientes ejemplos, que no están destinados a limitar la invención a las realizaciones específicas descritas,

pueden entenderse junto con las figuras adjuntas, incorporadas en este documento por referencia en que:

Figura 1: representa esquemáticamente la relación entre las secuencias de nucleótidos y cebadores citados.

Barra negra: ADN foráneo; barra clara: ADN de origen vegetal; las cifras bajo las barras representan las posiciones de los nucleótidos; (c) se refiere al complemento de la secuencia de nucleótidos indicada.

Figura 2: representa los resultados obtenidos por el protocolo de identificación por PCR desarrollado para EE-GH3.

Secuencia de carga del gel: carril 1: marcador de peso molecular (escala de 100 pb); carriles 2 a 4: muestras de ADN de plantas de algodón que comprenden el evento transgénico EE-GH3; carriles 5 a 8: muestras de ADN de plantas transgénicas de algodón que no comprenden el evento selecto EE-GH3, pero que comprenden un gen similar de tolerancia a glifosato; carriles 9 a 11: muestras de ADN de plantas transgénicas de algodón que no comprenden el evento selecto EE-GH3, y que no comprenden un gen de tolerancia a glifosato; carril 12: muestra de ADN de control de una planta de algodón de tipo silvestre; carril 13: ADN de control que no es molde; carril 14: marcador de peso molecular.

Figura 3: representa los resultados obtenidos por el protocolo de PCR de valoración de la cigosidad desarrollado para EE-GH3.

Secuencia de carga del gel: carril 1: marcador de peso molecular (escala de 100 pb); carriles 2, 4, 6, 7 y 8: muestras de ADN de plantas de algodón que comprenden el evento transgénico EE-GH3 en forma homocigótica; carriles 3 y 5: muestras de ADN de plantas de algodón que comprenden el evento transgénico EE-GH3 en forma heterocigótica; carriles 9 y 10: muestra de ADN de control de una planta de algodón de tipo silvestre; carril 11: ADN de control que no es molde; carril 12: marcador de peso molecular.

Descripción detallada

La incorporación de una molécula de ADN recombinante en el genoma de la planta típicamente provoca la transformación de una célula o tejido. El sitio particular de incorporación habitualmente se debe a integración "aleatoria".

El ADN introducido en el genoma de la planta como resultado de la transformación de una célula o tejido vegetal con un ADN recombinante o "ADN transformante", y que se origina a partir de dicho ADN transformante se menciona a partir de ahora en este documento como "ADN foráneo" que comprende uno o más "transgenes". "ADN de la planta" en el contexto de la presente invención se referirá a ADN que se ha originado de la planta que se transforma. El ADN de la planta habitualmente se encontrará en el mismo locus genético en la planta de tipo silvestre correspondiente. El ADN foráneo puede caracterizarse por la localización y la configuración en el sitio de incorporación de la molécula de ADN recombinante en el genoma de la planta. El sitio en el genoma de la planta donde se ha insertado un ADN recombinante también se menciona como "sitio de inserción" o "sitio diana". La inserción del ADN recombinante en el genoma de la planta puede asociarse con una eliminación de ADN de la planta, mencionado como "eliminación de sitio diana". Una "región flanqueante" o "secuencia flanqueante" como se usa en este documento se refiere a una secuencia de al menos 20 pb, preferiblemente al menos 50 pb y hasta 5000 pb de ADN diferente del ADN introducido, preferiblemente ADN del genoma de la planta que está localizado inmediatamente en dirección 5' y contiguo a o inmediatamente en dirección 3' y contiguo al ADN foráneo. Los procedimientos de transformación que dan lugar a la integración aleatoria del ADN foráneo producirán transformantes con diferentes regiones flanqueantes, que son características y únicas para cada transformante. Cuando el ADN recombinante se introduce en una planta a través de cruce tradicional, su sitio de inserción en el genoma de la planta, o sus regiones flanqueantes, generalmente no se cambiarán. Una "región de inserción", como se usa en este documento, se refiere a la región correspondiente a la región de al menos 40 pb, preferiblemente al menos 100 pb y hasta 10 000 pb, abarcada por la secuencia que comprende la región flanqueante en dirección 5' y/o en dirección 3' de un ADN foráneo en el genoma de la planta. Teniendo en consideración las mínimas diferencias debidas a mutaciones dentro de una especie, una región de inserción retendrá, tras cruzarse con una planta de la misma especie, al menos un 85%, preferiblemente un 90%, más preferiblemente un 95% y mucho más preferiblemente un 100% de identidad de secuencia con la secuencia que comprende las regiones flanqueantes en dirección 5' y en dirección 3' del ADN foráneo en la planta originalmente obtenida de la transformación.

Un evento se define como un locus genético (artificial) que, como resultado de ingeniería genética, porta un transgén que comprende al menos una copia de un gen de interés. Los estados alélicos típicos de un evento son la presencia o ausencia del ADN foráneo. Un evento se caracteriza fenotípicamente por la expresión del transgén. A nivel genético, un evento es parte de la composición genética de una planta. A nivel molecular, un evento puede caracterizarse por el mapa de restricción (por ejemplo, determinado por transferencia de Southern), por las secuencias flanqueantes en dirección 5' y/o en dirección 3' del transgén, la localización de los marcadores moleculares y/o la configuración molecular del transgén. Habitualmente, la transformación de una planta con un ADN transformante que comprende al menos un gen de interés da lugar a una población de transformantes que comprenden una multitud de eventos diferentes, cada uno de los cuales es único.

Un evento selecto, como se usa en este documento, es un evento que se selecciona de un grupo de eventos, obtenidos por transformación con el mismo ADN transformante o por retrocruzamiento con plantas obtenidas por dicha transformación, basándose en la expresión y la estabilidad del transgén o transgenes y su compatibilidad con

las características agronómicas óptimas de la planta que comprende los mismos. Por tanto, los criterios para la selección de un evento selecto son uno o más, preferiblemente dos o más de forma ventajosa todos los siguientes:

- a) que la presencia del ADN foráneo no compromete otras características deseadas de la planta, tales como las relacionadas con el rendimiento agronómico o el valor comercial;
- b) que el evento se caracteriza por una configuración molecular bien definida que se hereda de forma estable y para la que pueden desarrollarse herramientas apropiadas para el control de la identidad;
- c) que el gen o genes de interés muestran una expresión fenotípica espacial y temporal correcta, apropiada y estable, tanto en condiciones heterocigóticas (o hemicigóticas) y homocigóticas del evento, a un nivel comercialmente aceptable en una gama de condiciones ambientales en que las plantas que portan el evento probablemente quedan expuestas en uso agronómico normal.

Se prefiere que el ADN foráneo se asocie con una posición en el genoma de la planta que permita la fácil introgresión en fondos genéticos comerciales deseados.

El estado de un evento como evento selecto se confirma por introgresión del evento selecto en diferentes fondos genéticos relevantes y observando el cumplimiento de uno, dos o todos los criterios, por ejemplo, a), b) y c) anteriores.

Un "evento selecto", por tanto, se refiere a un locus genético que comprende un ADN foráneo, que responde a los criterios descritos anteriormente. Una planta, material vegetal o descendencia tal como semillas puede comprender uno o más eventos selectos en su genoma.

Las herramientas desarrolladas para identificar un evento selecto o la planta, material vegetal que comprende un evento selecto o productos que comprenden material vegetal que comprende el evento selecto se basan en las características genómicas específicas del evento selecto, tales como, un mapa de restricción específico de la región genómica que comprende el ADN foráneo, marcadores moleculares o la secuencia de la región o regiones flanqueantes del ADN foráneo.

Una vez se ha secuenciado una o ambas regiones flanqueantes del ADN foráneo, pueden desarrollarse cebadores y sondas que reconocen específicamente esta o estas secuencias en el ácido nucleico (ADN o ARN) de una muestra mediante una técnica de biología molecular. Por ejemplo, puede desarrollarse un método de PCR para identificar el evento selecto en muestras biológicas (tales como muestras de plantas, material vegetal o productos que comprenden material vegetal). Dicha PCR se basa en al menos dos "cebadores" específicos, reconociendo uno, una secuencia dentro de la región flanqueante 5' o 3' del evento selecto y reconociendo el otro una secuencia dentro del ADN foráneo. Los cebadores preferiblemente tienen una secuencia entre 15 y 35 nucleótidos que en condiciones optimizadas de PCR "reconocen específicamente" una secuencia dentro de la región flanqueante 5' o 3' del evento selecto y el ADN foráneo del evento selecto respectivamente, de modo que se amplifica un fragmento específico ("fragmento de integración" o amplicón de discriminación) a partir de una muestra de ácido nucleico que comprende el evento selecto. Esto significa que se amplifica únicamente el fragmento de integración diana, y no otra secuencia en el genoma de la planta o el ADN foráneo, en condiciones optimizadas de PCR.

Los cebadores de PCR adecuados para la invención pueden ser los siguientes:

- oligonucleótidos que varían de longitud de 17 nt a aproximadamente 200 nt, que comprenden una secuencia de nucleótidos de al menos 17 nucleótidos consecutivos, preferiblemente 20 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia flanqueante 5' (SEQ ID NO: 1 del nucleótido 1 al nucleótido 732) en su extremo 3' (cebadores que reconocen las secuencias flanqueantes 5'); o
- oligonucleótidos que varían de longitud de 17 nt a aproximadamente 200 nt, que comprenden una secuencia de nucleótidos de al menos 17 nucleótidos consecutivos, preferiblemente 20 nucleótidos consecutivos, seleccionados de la secuencia flanqueante 3' (complemento de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 431 al nucleótido 654) en su extremo 3' (cebadores que reconocen las secuencias flanqueantes 3'); o
- oligonucleótidos que varían de longitud de 17 nt a aproximadamente 200 nt, que comprenden una secuencia de nucleótidos de al menos 17 nucleótidos consecutivos, preferiblemente 20 nucleótidos seleccionados de las secuencias de ADN insertadas (complemento de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 733 al nucleótido 1214) en su extremo 3' (cebadores que reconocen el ADN foráneo) o
- oligonucleótidos que varían de longitud de 17 nt a aproximadamente 200 nt, que comprenden una secuencia de nucleótidos de al menos 17 nucleótidos consecutivos, preferiblemente 20 nucleótidos seleccionados de las secuencias de ADN insertadas (SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1 al nucleótido 430)

Por supuesto, los cebadores pueden ser más largos de los 17 nucleótidos consecutivos mencionados, y pueden ser de, por ejemplo, 20, 21, 30, 35, 50, 75, 100, 150, 200 nt de longitud o incluso más largos. Los cebadores pueden consistir completamente en la secuencia de nucleótidos seleccionada de las secuencias de nucleótidos mencionada de secuencias flanqueantes y secuencias de ADN foráneo. Sin embargo, la secuencia de nucleótidos de los cebadores en su extremo 5' (es decir, fuera de los 17 nucleótidos consecutivos localizados en 3') es menos crucial. Por tanto, la secuencia 5' de los cebadores puede consistir en una secuencia de nucleótidos seleccionada de las secuencias flanqueantes o ADN foráneo, según lo apropiado, pero puede contener varios emparejamientos

incorrectos (por ejemplo, 1, 2, 5, 10 emparejamientos incorrectos). La secuencia 5' de los cebadores puede incluso consistir completamente en una secuencia de nucleótidos no relacionada con las secuencias flanqueantes o el ADN foráneo, tal como, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que representa sitios de reconocimiento por enzimas de restricción. Dichas secuencias no relacionadas o secuencias de ADN flanqueantes con emparejamientos incorrectos preferiblemente no deben de ser más largas de 100, más preferiblemente más largas de 50 o incluso de 25 nucleótidos.

Además, los cebadores adecuados pueden comprender o consistir en una secuencia de nucleótidos en su extremo 3' que abarca la región de unión entre las secuencias derivadas del ADN de la planta y las secuencias de ADN foráneo (localizada en los nucleótidos 732-733 en las SEQ ID NO: 1 y los nucleótidos 430-431 en la SEQ ID NO: 2) con la condición de que los 17 nucleótidos consecutivos localizados en 3' mencionados no deriven exclusivamente del ADN foráneo o las secuencias derivadas de la planta en la SEQ ID NO: 1 o 2.

También quedará muy claro para los expertos en la materia que los pares de cebadores de PCR seleccionados apropiadamente tampoco deben comprender secuencias complementarias entre sí.

Para los fines de la invención, el "complemento de una secuencia de nucleótidos representada en la SEQ ID NO: X" es la secuencia de nucleótidos que puede obtenerse de la secuencia de nucleótidos representada reemplazando los nucleótidos a través de su nucleótido complementario de acuerdo con las normas de Chargaff (A \leftrightarrow T; G \leftrightarrow C) y leyendo la secuencia en la dirección 5' a 3', es decir, en dirección opuesta de la secuencia de nucleótidos representada.

Los ejemplos de cebadores adecuados son las secuencia oligonucleotídicas de la SEQ ID NO: 3 (cebadores que reconocen la secuencia flanqueante 5'), la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6 (cebadores que reconocen el ADN foráneo para su uso con los cebadores que reconocen la secuencia flanqueante 5'), la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 9 (cebadores que reconocen el ADN foráneo para su uso con los cebadores que reconocen la secuencia flanqueante 3') o la SEQ ID NO: 10 (cebadores que reconocen la secuencia flanqueante 3').

Otros ejemplos de cebadores oligonucleotídicos adecuados comprenden en su extremo 3' las siguientes secuencias o consisten en dichas secuencias:

a. cebadores que reconocen la secuencia flanqueante 5':

- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 258 al nucleótido 277
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 310 al nucleótido 329
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 311 al nucleótido 330
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 507 al nucleótido 526
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 616 al nucleótido 635
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 256 al nucleótido 275
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 259 al nucleótido 277
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 260 al nucleótido 279
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 309 al nucleótido 329
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 310 al nucleótido 330
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 311 al nucleótido 329
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 312 al nucleótido 330
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 436 al nucleótido 455
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 34 al nucleótido 53
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 130 al nucleótido 148
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 139 al nucleótido 158
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 256 al nucleótido 277
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 259 al nucleótido 279
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 260 al nucleótido 277
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 261 al nucleótido 279
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 266 al nucleótido 285
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 308 al nucleótido 329
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 309 al nucleótido 330
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 312 al nucleótido 329
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 313 al nucleótido 330
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 435 al nucleótido 455
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 501 al nucleótido 518
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 509 al nucleótido 526
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 513 al nucleótido 532
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 528 al nucleótido 547
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 529 al nucleótido 547
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 602 al nucleótido 621
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 21 al nucleótido 40
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 35 al nucleótido 54

- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 72 al nucleótido 93
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 73 al nucleótido 91
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 73 al nucleótido 90
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 74 al nucleótido 94
- 5 - la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 94 al nucleótido 115
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 189 al nucleótido 208
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 339 al nucleótido 359
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 341 al nucleótido 359
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 358 al nucleótido 377
- 10 - la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 366 al nucleótido 385
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 424 al nucleótido 445
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 26 al nucleótido 47
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 30 al nucleótido 47
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 36 al nucleótido 56
- 15 - la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 38 al nucleótido 56
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 39 al nucleótido 59
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 41 al nucleótido 60
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 70 al nucleótido 91
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 73 al nucleótido 94
- 20 - la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 74 al nucleótido 91
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 338 al nucleótido 359
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 342 al nucleótido 359
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 357 al nucleótido 377
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 359 al nucleótido 377
- 25 - la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 367 al nucleótido 385
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 367 al nucleótido 386
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 35 al nucleótido 56
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 38 al nucleótido 59
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 356 al nucleótido 377
- 30 - la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 360 al nucleótido 377
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 364 al nucleótido 385
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 366 al nucleótido 386
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 368 al nucleótido 385
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 368 al nucleótido 386
- 35 - la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 407 al nucleótido 428
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 40 al nucleótido 61
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 365 al nucleótido 384
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 369 al nucleótido 386
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 422 al nucleótido 443
- 40 - la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 367 al nucleótido 387
- la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 366 al nucleótido 387

Como se usa en este documento, "la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: Z de la posición X a la posición Y" indica la secuencia de nucleótidos que incluye ambos nucleótidos finales.

45 Preferiblemente, el fragmento de integración tiene una longitud entre 50 y 500 nucleótidos, mucho más preferiblemente entre 100 y 350 nucleótidos. Los cebadores específicos pueden tener una secuencia que es entre un 80 y un 100% idéntica a una secuencia dentro de la región flanqueante 5' o 3' del evento selecto y el ADN foráneo del evento selecto, respectivamente, con la condición de que los emparejamientos incorrectos aún permitan la identificación específica del evento selecto con estos cebadores en condiciones de PCR optimizadas. El intervalo de emparejamientos incorrectos permisible, sin embargo, puede determinarse fácilmente de forma experimental y es conocido para los expertos en la materia.

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

Cebador 1	De la posición	Cebador 2	Hasta la posición	Longitud del amplicón
GHI043	528	SB327	829	302
GHI043	528	MAE080	1028	501
GHI043	528	MAE081	1214	687
GHI043	528	GHI044	860	334
MAE078	1	MAE121	654	654
MAE070	96	MAE121	654	559
MAE071	358	MAE121	654	297

La detección de fragmentos de integración puede producirse de diversas maneras, por ejemplo, mediante estimación del tamaño después de análisis en gel. Los fragmentos de integración también pueden secuenciarse directamente. También se conocen en la técnica otros métodos específicos de secuencia para la detección de fragmentos de ADN amplificados.

5 Como la secuencia de los cebadores y su ubicación relativa en el genoma son únicas para el evento selecto, la amplificación del fragmento de integración se producirá únicamente en muestras biológicas que comprenden (el ácido nucleico de) el evento selecto. Preferiblemente, cuando se realiza para PCR para identificar la presencia de EE-GH3 en muestras desconocidas, se incluye un control de un conjunto de cebadores con que puede amplificarse un fragmento dentro de un "gen constitutivo" de la especie de planta del evento. Los genes constitutivos son genes que se expresan en la mayoría de tipos celulares y que están relacionados con actividades metabólicas básicas comunes a todas las células. Preferiblemente, el fragmento amplificado del gen constitutivo es un fragmento que es más grande que el fragmento de integración amplificado. Dependiendo de las muestras a analizar, pueden incluirse otros controles.

15 Se describen protocolos convencionales de PCR en la técnica, tal como en "PCR Applications Manual" (Roche Molecular Biochemicals, 2.^a Edición, 1999). Las condiciones óptimas para la PCR, incluyendo la secuencia de los cebadores específicos, se especifican en un "protocolo de identificación por PCR" para cada evento selecto. Se entiende, sin embargo, que puede que varios parámetros en el protocolo de identificación por PCR tengan que ajustarse a condiciones de laboratorio específicas, y pueden modificarse ligeramente para obtener resultados similares. Por ejemplo, el uso de un método diferente para la preparación de ADN puede requerir el ajuste de, por ejemplo, la cantidad de cebadores, polimerasa y condiciones de hibridación usadas. Asimismo, la selección de otros cebadores puede dictaminar otras condiciones óptimas para el protocolo de identificación por PCR. Estos ajustes, sin embargo, serán evidentes para los expertos en la materia y, además, se detallan en los manuales actuales de aplicación de PCR tales como el citado anteriormente.

20 Como alternativa, pueden usarse cebadores específicos para amplificar un fragmento de integración que pueda usarse como "sonda específica" para identificar EE-GH3 en muestras biológicas. El contacto del ácido nucleico de una muestra biológica con la sonda, en condiciones que permitan la hibridación de la sonda con su fragmento correspondiente en el ácido nucleico, provoca la formación de un híbrido de ácido nucleico/sonda. La formación de este híbrido puede detectarse (por ejemplo, marcando el ácido nucleico o sonda), mediante lo cual la formación de este híbrido indica la presencia de EE-GH3. Dichos métodos de identificación basados en hibridación con una sonda específica (ya sea en un soporte en fase sólida o en solución) se han descrito en la técnica. La sonda específica es preferiblemente una secuencia que, en condiciones optimizadas, hibrida específicamente con una región dentro de la región flanqueante 5' o 3' del evento selecto y que preferiblemente también comprende parte del ADN foráneo contiguo a la misma (a partir de ahora en este documento mencionada como "región específica"). Preferiblemente, la sonda específica comprende una secuencia entre 50 y 500 pb, preferiblemente de 100 a 350 pb que es al menos un 80%, preferiblemente entre un 80% y un 85%, más preferiblemente entre un 85% y un 90%, especialmente preferiblemente entre un 90% y un 95%, mucho más preferiblemente entre un 95% y un 100% idéntica (o complementaria) a la secuencia de nucleótidos de una región específica. Preferiblemente, la sonda específica comprenderá una secuencia de aproximadamente 15 a aproximadamente 100 nucleótidos contiguos idénticos (o complementarios) a una región específica del evento selecto.

45 Los oligonucleótidos adecuados como cebadores de PCR para la detección del evento selecto EE-GH3 también pueden usarse para desarrollar un protocolo basado en PCR para determinar el estado de cigosidad del evento selecto. Para este fin, se diseñan dos cebadores que reconocen el locus de tipo silvestre de tal manera que estén dirigidos uno hacia el otro y tengan el sitio de inserción localizado entre los cebadores. Estos cebadores pueden ser cebadores que reconocen específicamente las secuencias flanqueantes 5' y 3' contenidas dentro de la SEQ ID NO: 1 o 2, respectivamente. Este conjunto de cebadores, junto con un tercer cebador complementario a secuencias de ADN transformantes y dirigidos hacia uno del ADN flanqueante, permiten la amplificación por PCR de diagnóstico del locus específico de EE-GH3, así como del locus wt. Si la planta es homocigótica para el locus transgénico o el correspondiente locus wt, la PCR de diagnóstico dará lugar a un único producto de PCR típico, preferiblemente típico en longitud, para el locus transgénico o wt. Si la planta es hemicigótica para el locus transgénico, aparecerán dos productos de PCR específicos de locus, que reflejan la amplificación del locus transgénico y también del locus wt.

55 Además, también pueden desarrollarse métodos de detección específicos para el evento selecto EE-GH3 que difieren de los métodos de amplificación basados en PCR usando la información de secuencia específica del evento selecto proporcionada en este documento. Dichos métodos de detección alternativos incluyen métodos de detección de amplificación de señal lineal basados en escisión invasiva de estructuras de ácido nucleico particulares, también conocida como tecnología Invader™ (como se describe, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos 5.985.557 "Invasive Cleavage of Nucleic Acids", 6.001.567 "Detection of Nucleic Acid sequences by Invader Directed Cleavage, incorporada en este documento por referencia). Para este fin, la secuencia diana puede hibridarse con un primer oligonucleótido de ácido nucleico marcado que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 desde el nucleótido 733 hasta el nucleótido 750 o su complemento o dicha sonda de ácido nucleico marcada que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 413 al nucleótido 430 o su complemento y se hibrida

adicionalmente con un segundo oligonucleótido de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 715 al nucleótido 732 o su complemento o dicha sonda de ácido nucleico marcada que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 de nucleótido 431 al nucleótido 448 o su complemento, donde el primer y segundo oligonucleótido solapan en al menos un nucleótido. La estructura dúplex o triple que se produce por esta hibridación permite la escisión de la sonda selectiva con una enzima (Cleavase®) que deja la secuencia diana intacta. La sonda marcada escindida posteriormente se detecta, potencialmente mediante una etapa intermedia que provoca la amplificación adicional de la señal.

Un "kit" como se usa en este documento se refiere a un conjunto de reactivos con el fin de realizar el método de la invención, más particularmente, la identificación del evento selecto EE-GH3 en muestras biológicas o la determinación del estado de cigosidad de material vegetal que contiene EE-GH3. Más particularmente, una realización preferida del kit de la invención comprende cebadores específicos, como se describe anteriormente para la identificación del evento selecto, o tres cebadores específicos para la determinación del estado de cigosidad. Opcionalmente, el kit puede comprender además cualquier otro reactivo descrito en este documento en el protocolo de identificación por PCR. Como alternativa, el kit puede comprender una sonda específica, como se describe anteriormente, que hibrida específicamente con el ácido nucleico de muestras biológicas para identificar la presencia de EE-GH3 en las mismas. Opcionalmente el kit puede comprender además cualquier otro reactivo (tal como, aunque sin limitación, tampón de hibridación, marcador) para la identificación de EE-GH3 en muestra biológicas, usando la sonda específica.

El kit de la invención puede usarse, y sus componentes pueden ajustarse específicamente, con fines de control de calidad (por ejemplo, pureza de lotes de semillas), detección de la presencia o ausencia del evento selecto el material vegetal o material que comprende o derivado de material vegetal, tal como, aunque sin limitación, productos alimenticios o de pienso.

Como se usa en este documento, "identidad de secuencia" con respecto a secuencias de nucleótidos (ADN o ARN), se refiere al número de posiciones con nucleótidos idénticos dividido por el número de nucleótidos en la más corta de las dos secuencias. La alineación de las dos secuencias de nucleótidos se realiza por el algoritmo de Wilbur y Lipmann (Wilbur y Lipmann, 1983, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 80:726) usando un tamaño de ventana de 20 nucleótidos, una longitud de palabra de 4 nucleótidos y una penalización por hueco de 4. El análisis asistido por ordenador y la interpretación de los datos de secuencia, incluyendo la alineación de secuencia como se describe anteriormente, puede realizarse convenientemente, por ejemplo, usando el paquete de software de análisis de secuencia del Genetics Computer Group (GCG, Centro de Biotecnología de la Universidad de Wisconsin). Las secuencias se indican como "esencialmente similares" cuando dichas secuencias tienen una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 75%, particularmente al menos aproximadamente un 80%, más particularmente al menos aproximadamente un 85%, de forma bastante particular de aproximadamente un 90%, especialmente de aproximadamente 95%, más especialmente de aproximadamente un 100%. Está claro que cuando se dice que las secuencias de ARN son esencialmente similares o tienen un cierto grado de identidad de secuencia con secuencias de ADN, la timidina (T) en la secuencia de ADN se considera igual a uracilo (U) en la secuencia de ARN.

El término "cebador" como se usa en este documento abarca cualquier ácido nucleico que sea capaz de cebar la síntesis de un ácido nucleico naciente en un proceso dependiente de molde, tal como PCR. Típicamente, los cebadores son oligonucleótidos de 10 a 30 nucleótidos, pero pueden emplearse secuencias más largas. Pueden proporcionarse cebadores en forma bicatenaria, aunque se prefiere la forma monocatenaria. Pueden usarse sondas como cebadores, pero están diseñadas para unirse al ADN o ARN diana y no necesitan usarse en un proceso de amplificación.

El término "reconocimiento", como se usa en este documento, cuando se refiere a cebadores específicos, se refiere al hecho de que los cebadores específicos hibridan específicamente con una secuencia de ácido nucleico en el evento selecto en las condiciones expuestas en el método (tales como las condiciones del protocolo de identificación por PCR), mediante lo cual se determina la especificidad por la presencia de controles positivos y negativos.

El término "hibridación", como se usa en este documento, cuando se refiere a sondas específicas, se refiere al hecho de que la sonda se une a una región específica en la secuencia de ácido nucleico del evento selecto en condiciones de rigurosidad convencionales. Las condiciones de rigurosidad convencionales, como se usa en este documento se refieren a las condiciones para la hibridación descrita en este documento o a las condiciones convencionales de hibridación como se describe por Sambrook *et al.*, 1989 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY) que, por ejemplo, pueden comprender las siguientes etapas: 1) inmovilización de fragmentos de ADN genómico de la planta en un filtro, 2) prehibridación del filtro durante 1 a 2 horas a 42°C en formamida al 50%, SSPE 5 X, reactivo de Denhardt 2 X y SDS al 0,1%, o durante 1 a 2 horas a 68°C en SSC 6 X, reactivo de Denhardt 2 X y SDS al 0,1%, 3) adición de la sonda de hibridación que se ha marcado, 4) incubación durante 16 a 24 horas, 5) lavado del filtro durante 20 min a temperatura ambiente en SSC 1 X, SDS al 0,1%, 6) lavado del filtro tres veces durante 20 min cada una a 68°C en SSC 0,2 X, SDS al 0,1%, y 7) exposición del filtro durante 24 a 48 horas a películas de rayos-X a -70°C con un cribado de intensificación.

Como se usa en este documento, una muestra biológica es una muestra de una planta, material vegetal o productos que comprenden material vegetal. El término "planta" pretende abarcar tejidos vegetales de algodón (*Gossypium hirsutum*), en cualquier fase de madurez, así como cualquier célula, tejido u órgano recogido o derivado de cualquier planta, incluyendo sin limitación, cualquier semilla, hoja, tallo, flor, raíz, células individuales, gametos, cultivos celulares, cultivos tisulares o protoplastos. "Material vegetal", como se usa en este documento, se refiere a material que se obtiene o deriva de una planta. Los productos que comprenden materia vegetal se refieren a alimentos, piensos u otros productos que se producen usando material vegetal o pueden contaminarse por material vegetal. Se entiende que, en el contexto de la presente invención, dichas muestras biológicas se ensayan para la presencia de ácidos nucleicos específicos para EE-GH3, lo que implica la presencia de ácidos nucleicos en las muestras. Por tanto, los métodos mencionados en este documento para identificar el evento selecto EE-GH3 en muestras biológicas, se refieren a la identificación en muestras biológicas de ácidos nucleicos que comprenden el evento selecto.

Como se usa en este documento, "que comprende" debe interpretarse como especificando la presencia de las características, enteros, etapas, reactivos o componentes indicados que se mencionan, pero no imposibilita la presencia o adición de una o más características, enteros, etapas o componentes, o grupos de los mismos. Por tanto, por ejemplo, un ácido nucleico o proteína que comprende una secuencia de nucleótidos o aminoácidos, puede comprender más nucleótidos o aminoácidos que los realmente citados, es decir, están incluidos en un ácido nucleico o proteína más grande. Un gen quimérico que comprende una secuencia de ADN que está funcional o estructuralmente definida, puede comprender secuencias de ADN adicionales, etc.

Como resultado del desarrollo de un evento selecto EE-GH3 en algodón, la invención también se refiere a las plantas que comprenden este evento, la descendencia obtenida de estas plantas y a las células vegetales o material vegetal derivado de este evento. Las plantas que comprenden el evento selecto EE-GH3 se obtuvieron como se describe en el ejemplo 1.

Las plantas de algodón o material vegetal que comprende EE-GH3 pueden identificarse de acuerdo con el protocolo de identificación por PCR descrito para EE-GH3 en el ejemplo 2. En resumen, el ADN genómico de algodón presente en la muestra biológica se amplifica por PCR usando un cebador que reconoce específicamente una secuencia dentro de la secuencia flanqueante 5' o 3' de EE-GH3 tal como el cebador con la secuencia de la SEQ ID NO: 3, y un cebador que reconoce una secuencia en el ADN foráneo, tal como el cebador con la secuencia de la SEQ ID NO: 11. Los cebadores de ADN que amplifican parte de una secuencia de algodón endógena se usan como control positivo para la amplificación por PCR. Si tras la amplificación por PCR el material produce un fragmento del tamaño esperado, el material contiene material vegetal de una planta de algodón que alberga el evento selecto EE-GH3.

Las plantas que albergan EE-GH3 se caracterizan por su tolerancia a glifosato, que en el contexto de la presente invención incluye que las plantas son tolerantes al herbicida glifosato. Las plantas que albergan EE-GH3 también pueden caracterizarse por tener características agronómicas que son comparables a variedades disponibles en el mercado de algodón en Estados Unidos, en ausencia de presión por malas hierbas y uso de glifosato para el control de malas hierbas. Se ha observado que la presencia de un ADN foráneo en la región de inserción del genoma de la planta de algodón descrito en este documento confiere características fenotípicas y moleculares particularmente interesantes a las plantas que comprenden este evento.

El ADN genómico que comprende el evento selecto EE-GH3, como se define en este documento, puede usarse como material de referencia en kits de identificación.

Los siguientes ejemplos describen la identificación del evento selecto EE-GH3 y el desarrollo de herramientas para la identificación específica del evento selecto EE-GH3 en muestras biológicas.

Salvo que se indique de otro modo, todas las técnicas de ADN recombinantes se realizan de acuerdo con protocolos convencionales como se describe en Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY y en los Volúmenes 1 y 2 de Ausubel *et al.* (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols, EE. UU. Los materiales y métodos convencionales para el trabajo molecular en plantas se describen en Plant Molecular Biology Labfax (1993) por R.D.D. Croy publicado por BIOS Scientific Publications Ltd (RU) y Blackwell Scientific Publications, RU.

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

SEQ ID NO: 1:	secuencia de nucleótidos que comprende una región flanqueante 5' de EE-GH3
SEQ ID NO: 2:	secuencia de nucleótidos que comprende una región flanqueante 3' de EE-GH3
SEQ ID NO: 3:	cebador GHI043
SEQ ID NO: 4:	cebador SB327
SEQ ID NO: 5:	cebador MAE080
SEQ ID NO: 6:	cebador MAE081
SEQ ID NO: 7:	cebador MAE078

SEQ ID NO: 8:	cebador MAE070
SEQ ID NO: 9:	cebador MAE071
SEQ ID NO: 10:	cebador MAE121
SEQ ID NO: 11:	cebador GHI044
SEQ ID NO: 12:	cebador 1 para la amplificación del fragmento de control
SEQ ID NO: 13:	cebador 2 para la amplificación del fragmento de control

Ejemplos

1. Identificación del evento selecto EE-GH3

Se desarrolló algodón resistente a herbicidas por transformación de algodón con un vector que comprende la secuencia codificante de un gen *epsps* modificado que codifica una enzima *epsps* tolerante a glifosato, bajo el control de un promotor de un gen histona como se describe en el documento US 5.491.288 o el documento US 5.792.930.

El evento selecto EE-GH3 se seleccionó basándose en un procedimiento de selección amplia basado en la buena expresión y estabilidad del gen de resistencia a herbicida y se evaluó su compatibilidad con características agronómicas óptimas tales como altura de la planta, la altura hasta el nudo, la retención de la baya, postura, vigor, longitud de fibras, resistencia de las fibras y producción de pelusa.

El evento seleccionado se introdujo en diferentes fondos genéticos comerciales, y se compararon los resultados de los ensayos de campo en diferentes localizaciones. Las plantas se pulverizaron con el herbicida usando diferentes tratamientos.

No se observaron nunca daños visibles como resultado de la aplicación de herbicida después de la aplicación independientemente de la tasa o fase del desarrollo en el momento de la aplicación. No hubo efectos perjudiciales sobre la morfología o el hábito de crecimiento de las plantas por la aplicación de herbicida.

Además, el evento obtuvo una morfología foliar, floral y de las bagas normal, una excelente fertilidad y no mostró enfermedades o susceptibilidad anómala a insectos en múltiples fondos genéticos. Durante la introgresión en múltiples fondos genéticos, no se observaron problemas aberrantes o anomalías.

2. Identificación de las regiones flanqueantes del evento selecto EE-GH3

Se determinó la secuencia de las regiones que flanquean el ADN foráneo en el evento selecto EE-GH3 usando el método de PCR entrelazado asimétrica térmica (TAIL-) descrito por Liu *et al.* (1995, Plant J. 8(3):457-463). Este método utiliza tres cebadores internos en reacciones sucesivas junto con un cebador degenerado arbitrario más corto de modo que pudieran controlarse de forma térmica las eficacias de amplificación relativa de los productos específicos y no específicos. Los cebadores específicos se seleccionaron para su hibridación al límite del ADN foráneo y basándose en sus condiciones de hibridación. Se analizó una pequeña cantidad (5 µl) de productos de PCR no purificados, secundarios y terciarios en un gel de agarosa al 1%. El producto de PCR terciario se purificó y secuenció.

2.1. Región flanqueante derecha (5')

Se secuenció el fragmento identificado como que comprende la región flanqueante 5' obtenida por el método de TAIL-PCR (SEQ ID NO: 1). La secuencia entre el nucleótido 1 y 732 corresponde al ADN de la planta, mientras que la secuencia entre el nucleótido 733 y 1214 corresponde al ADN foráneo.

2.2. Región flanqueante izquierda (3')

Se secuenció el fragmento identificado como que comprende la región flanqueante 3' obtenida por el método de TAIL-PCR (SEQ ID NO: 2). La secuencia entre el nucleótido 1 a 430 corresponde al ADN foráneo, mientras que la secuencia entre el nucleótido 431 y 654 corresponde al ADN de la planta.

3. Desarrollo de un protocolo de identificación por reacción en cadena de la polimerasa para EE-GH3

3.1. Cebadores

Se desarrollaron cebadores específicos que reconocen secuencias dentro del evento selecto. Más particularmente, se desarrolló un cebador que reconoce una secuencia dentro de la región flanqueante 5' de EE-GH3. Entonces se seleccionó un segundo cebador dentro de la secuencia del ADN foráneo de modo que los cebadores abarcarán una secuencia de aproximadamente 334 nucleótidos. Se encontró que los siguientes cebadores daban resultados particularmente claros y reproducibles en una reacción de PCR sobre ADN EE-GH3:

GHI043: 5'-TTC.AgC.CgC.CAT.TgA.TgA.Ag-3' (SEQ ID NO: 3)
(diana: ADN de la planta)

GHI044: 5'-gTg.TAT.CCA.TgC.CTC.gAC.TC-3' (SEQ ID NO: 11)
(diana: ADN de inserto)

5 Los cebadores dirigidos a la secuencia endógena se incluyen preferiblemente en el cóctel de PCR. Estos cebadores sirven como control interno en muestras desconocidas y en el control positivo de ADN. Un resultado positivo con el par de cebadores endógenos demuestra que hay ADN abundante de calidad adecuada en la preparación de ADN genómico para generar un producto de PCR. Se seleccionaron los cebadores endógenos que reconocen un gen constitutivo en algodón:

GHI001: 5'-AAC.CTA.ggC.TgC.TgA.Agg.AgC-3' (SEQ ID NO: 12)

GHI002: 5'-gTT.ACC.gTA.CAg.gTC.TTT.CC-3' (SEQ ID NO: 13)

3.2. Fragmentos amplificados

10

Los fragmentos amplificados esperados en la reacción de PCR son:

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

Para el par de cebadores GHI043-GHI044: 334 pb (evento selecto EE-GH3)

3.3. ADN molde

15

Se preparó ADN molde a partir de una perforación foliar de acuerdo con Edwards *et al.* (Nucleic Acid Research, 19, p1349, 1991). Cuando se usa ADN preparado con otros métodos, debe hacerse un ensayo ejecutado utilizando diferentes cantidades de molde. Habitualmente 50 ng de ADN molde genómico produce los mejores resultados.

3.4. Controles positivos y negativos asignados

20

Para evitar los falsos positivos o negativos, se determinó que deben incluirse los siguientes controles positivos y negativos en una ejecución de PCR:

25 - Control de mezcla maestra (control negativo de ADN). Esta es una PCR en la que no se añade ADN a la reacción. Cuando se observa el resultado esperado, sin productos de PCR, esto indica que el cóctel de PCR no estaba contaminado con ADN diana.

30 - Un control positivo de ADN (muestra de ADN genómico que se sabe que contiene las secuencias transgénicas). La amplificación satisfactoria de este control positivo demuestra que la PCR se ejecutaba en condiciones que permiten la amplificación de las secuencias diana.

35 - Un control de ADN de tipo silvestre. Esta es una PCR en que el ADN molde proporcionado es ADN genómico preparado a partir de una planta no transgénica. Cuando se observa el resultado esperado, ausencia de amplificación de un producto de PCR transgénico, pero amplificación de producto de PCR endógeno, esto indica que hay una amplificación de fondo transgénico detectable en una muestra de ADN genómico.

3.5. Condiciones de PCR

40 Se obtuvieron resultados óptimos en las siguientes condiciones:

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

45 2,5 µl de ADN molde
2,5 µl de tampón de amplificación 10 x (suministrado por el fabricante con la polimerasa Taq)
0,5 µl de dNTP 10 mM
0,5 µl de GHI001 (10 pmoles/µl)
0,5 µl de GHI002 (10 pmoles/µl)
0,25 µl de GHI044 (10 pmoles/µl)
50 0,25 µl de GHI043 (10 pmoles/µl)
0,1 µl de ADN polimerasa Taq (5 unidades/µl)
agua hasta 25 µl

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

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

3.6. Análisis en gel de agarosa

5 Para visualizar de forma óptima los resultados de la PCR, se determinó que deben aplicarse entre 10 y 20 µl de las muestras de PCR en un gel de agarosa al 1,5% (tampón Tris-borato) con un marcador de peso molecular apropiado (por ejemplo, escala de 100 pb PHARMACIA).

3.7. Validación de los resultados

10 Se determinó que los datos de muestras de ADN de plantas transgénicas dentro de una única ejecución de PCR y un único cóctel de PCR no deben ser aceptables salvo que 1) el control positivo de ADN muestre los productos de PCR esperados (fragmentos transgénicos y endógenos), 2) el control negativo de ADN sea negativo para la amplificación por PCR (sin fragmentos) y 3) el control de ADN de tipo silvestre muestre el resultado esperado (amplificación del fragmento endógeno)

15 Cuando se sigue el protocolo de identificación por PCR para EE-GH3 como se describe anteriormente, los carriles que muestran cantidades visibles de los productos de PCR transgénicos y endógenos de los tamaños esperados, indican que la planta correspondiente de la que se preparó el ADN molde genómico ha heredado el evento selecto EE-GH3. Los carriles que no muestran cantidades visibles de los productos de PCR transgénicos y que muestran cantidades visibles del producto de PCR endógeno, indica que la planta correspondiente de la que se preparó el ADN molde genómico no comprende el evento selecto. Los carriles que no muestran cantidad visibles de los productos de PCR endógenos y transgénicos indican que la calidad y/o cantidad del ADN genómico no permitía generar un producto de PCR. Estas plantas no pueden valorarse. La preparación de ADN genómico debe repetirse y tiene que realizarse una nueva ejecución de PCR, con los controles apropiados.

25 3.8. Uso de protocolo de PCR de discriminación para identificar EE-GH3

30 Antes de intentar cribar muestras desconocidas, tiene que realizarse una ejecución de ensayo con todos los controles apropiados. El protocolo desarrollado podría requerir la optimización de los componentes que pueden diferir entre laboratorios (preparación de ADN molde, ADN polimerasa Taq, calidad de los cebadores, dNTP, termociclador, etc.).

35 La amplificación de la secuencia endógena desempeña una función clave en el protocolo. Se tienen que obtener las condiciones de PCR y termociclado que amplifican cantidades equimolares tanto de la secuencia endógena como de la secuencia transgénica en un molde de ADN genómico transgénico conocido. Siempre que el fragmento endógeno diana no se amplifique o siempre que las secuencias diana no se amplifiquen con las mismas intensidades de tinción con bromuro de etidio, que se juzga por electroforesis en gel de agarosa, puede requerirse optimización de las condiciones de PCR.

40 Se ensayó material foliar de varias plantas de algodón, algunas de las cuales comprendían EE-GH3, de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente. Se recogieron muestras del evento selecto EE-GH3 y de algodón de tipo silvestre como controles positivos y negativos, respectivamente.

45 La figura 2 ilustra el resultado obtenido con el protocolo de identificación por PCR del evento selecto para EE-GH3 sobre varias muestras de plantas de algodón. Se encontró que las muestras en los carriles 2 a 4 contenían el evento selecto ya que se detecta la banda de 334 pb, mientras que las muestras en los carriles 5 a 12 no comprenden EE-GH3. Los carriles 5 a 11 comprenden otros eventos selectos de algodón (incluyendo plantas que comprenden diferentes genes quiméricos de tolerancia a glifosato), el carril 12 representa un control de algodón no transgénico; el carril 13 representa la muestra de control negativo (agua) y los carriles 1 y 14 representan el marcador de peso molecular (escala de 100 pb).

50

4. Uso de un fragmento de integración específico como sonda para la detección de material que comprende EE-GH3

Se obtiene un fragmento de integración específico de EE-GH3 por amplificación por PCR usando los cebadores específicos GHI043 (SEQ ID NO: 3) y GHI044 (SEQ ID NO: 11) o por síntesis química y se marca. Este fragmento de integración se usa como sonda específica para la detección de EE-GH3 en muestras biológicas. Se extrae el ácido nucleico de las muestras de acuerdo con procedimientos convencionales. Este ácido nucleico entonces se pone en contacto con la sonda específica en condiciones de hibridación que se optimizan para permitir la formación de un híbrido. La formación del híbrido entonces se detecta para indicar la presencia del ácido nucleico EE-GH3 en la muestra. Opcionalmente, el ácido nucleico en las muestras se amplifica usando los cebadores específicos antes del contacto con la sonda específica. Como alternativa, el ácido nucleico se marca antes del contacto con la sonda específica en lugar del fragmento de integración. Opcionalmente, la sonda específica se une a un soporte sólido (tal como, aunque sin limitación, un filtro, una tira, o microesferas), antes del contacto con las muestras.

5. Protocolo para la determinación basada en PCR del estado de cigosidad de material vegetal de algodón EE-GH3

5.1. Cebadores

Se diseñaron dos cebadores que reconocen las secuencias de nucleótidos del locus de tipo silvestre antes de la inserción del evento selecto, de tal manera que estuvieran dirigidos uno hacia el otro y tuvieran el sitio de inserción entremedias. Este conjunto de cebadores, junto con un tercer cebador complementario a las secuencias de ADN foráneo y dirigido hacia el ADN flanqueante, permite la amplificación simultánea por PCR del locus EE-GH3, así como del locus wt.

Se descubrió que los siguientes cebadores dan resultados particularmente claros y reproducibles en una reacción de PCR de valoración de cigosidad sobre ADN EE-GH3:

GHI043:	5'-TTC.AgC.CgC.CAT.TgA.TgA.Ag-3' (diana: ADN vegetal de la secuencia flanqueante 3')	(SEQ ID NO: 3)
GHI044:	5'-gTg.TAT.CCA.TgC.CTC.gAC.TC-3' (diana: ADN de inserto)	(SEQ ID NO: 11)
MAE121:	5'-CCA.TTC.CgA.TCA.TCg.AgT.Tg-3' (diana: ADN vegetal de la secuencia flanqueante 5')	(SEQ ID NO: 10)

5.2. Fragmentos amplificados

Los fragmentos amplificados esperados en la reacción de PCR son:

Para el par de cebadores GHI043-MAE121:	454 pb (correspondiente a la amplificación del locus wt)
Para el par de cebadores GHI043-GHI044:	334 pb (evento selecto EE-GH3)

5.3. ADN molde

Se preparó ADN molde a partir de una perforación foliar de acuerdo con Edwards *et al.* (Nucleic Acid Research, 19, p1349, 1991). Cuando se usa ADN preparado con otros métodos, debe hacerse un desarrollo de ensayo que utilice diferentes cantidades de molde. Habitualmente 50 ng de ADN molde genómico produce los mejores resultados.

5.4. Controles positivos y negativos asignados

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

- Mezcla maestra de control (control negativo de ADN). Esta es una PCR en que no se añade ADN a la reacción. Cuando se observa el resultado esperado, sin productos de PCR, esto indica que el cóctel de PCR no estaba contaminado con el ADN diana.
- Un control positivo de ADN (muestra de ADN genómico que se sabe que contiene las secuencias transgénicas). La amplificación satisfactoria de este control positivo demuestra que la PCR se ejecutó en condiciones que permiten la amplificación de las secuencias diana.
- Un control de ADN de tipo silvestre. Esta es una PCR en que el ADN molde proporcionado es ADN genómico preparado de una planta no transgénica. Cuando se observa el resultado esperado, ausencia de amplificación de un producto de PCR transgénico, pero amplificación del producto de PCR endógeno, esto indica que no hay amplificación del fondo transgénico detectable en una muestra de ADN genómico.

5.5. Condiciones de PCR

Los resultados óptimos se obtuvieron en las siguientes condiciones:

5

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

- 10 x µl de ADN molde (150 ng)
- 2,5 µl de tampón de amplificación 10 x (suministrado por el fabricante con la polimerasa Taq)
- 0,5 µl de dNTP 10 mM
- 1,5 µl de GHI043 (10 pmoles/µl)
- 1,0 µl de GHI044 (10 pmoles/µl)
- 0,5 µl de MAE121 (10 pmoles/µl)
- 0,1 µl de ADN polimerasa Taq (5 unidades/µl)
- 15 agua hasta 25 µl

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

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

20 5.6. Análisis en gel de agarosa

Para visualizar de forma óptima los resultados de la PCR se determinó que deben aplicarse entre 10 y 20 µl de las muestras de PCR en un gel de agarosa al 1,5% (tampón Tris-borato) con un marcador de peso molecular apropiado (por ejemplo, escala de 100 pb PHARMACIA).

25

5.7. Validación de los resultados

Los datos de las muestras de ADN vegetal transgénico dentro de una única ejecución de PCR y una única mezcla maestra de PCR no serán aceptables salvo que:

- 30 - el control positivo muestre los productos de PCR esperados (amplificación de diana transgénica)
- el control de ADN positivo de tipo silvestre muestre el resultado esperado (amplificación de la diana de tipo silvestre).
- el control negativo sea negativo para la amplificación por PCR (sin fragmentos).

35 Los carriles que muestran cantidades visibles del producto de PCR transgénico del tamaño esperado y que no muestran cantidades visibles del producto de PCR de tipo silvestre, indican que la planta correspondiente de la que se preparó el molde de ADN genómico es homocigótica para el casete del gen transgénico.

40 Los carriles que muestran cantidades visibles de los productos de PCR transgénicos y de tipo silvestre de los tamaños esperados, indican que la planta correspondiente de la que se preparó el ADN molde genómico es hemicigótica para el casete del gen transgénico. Los carriles que no muestran cantidades visibles del producto de PCR transgénico y que muestran cantidades visibles del producto de PCR de tipo silvestre, indican que la planta correspondiente de la que se preparó el ADN molde genómico no ha heredado la secuencia transgénica ensayada y, por tanto, es homocigótica para el locus de tipo silvestre.

45 Los carriles que no muestran cantidades visibles de productos de PCR transgénicos y de tipo silvestre, indican que la calidad y/o cantidad del ADN genómico no permitían la generación de un producto de PCR. Estas plantas no pueden valorarse. La preparación del ADN genómico debe repetirse y tiene que realizarse una nueva ejecución de PCR, con los controles apropiados.

50 5.8. Uso del protocolo de valoración de cigosidad para la identificación del estado de cigosidad en plantas que contienen EE-GH3.

La figura 3 ilustra el resultado obtenido con la PCR de valoración de la cigosidad para EE-GH3 en varias muestras de plantas de algodón. Se encontró que las muestras de los carriles 2 a 8 contienen el fragmento de PCR (334 pb) característico del evento selecto EE-GH3, mientras que las muestras de los carriles 3, 5, 9 y 10 a 12 contenían el fragmento característico para la presencia del locus wt. Los carriles 2, 4, 6, 7 y 8, por lo tanto, contienen EE-GH3 en forma homocigótica, los carriles 3 y 5 contienen EE-GH3 en forma hemicigótica y el carril 9 contiene el locus wt en forma homocigótica (acicigótica para EE-GH3). El carril 10 representa un control de algodón no transgénico; el carril 11 representa la muestra de control negativo (agua) y los carriles 1 y 12 representan el marcador de peso molecular (escala de 100 pb).

6. Introgresión de EE-GH3 en variedades de cultivo preferidas

El evento selecto EE-GH3 se introduce por retrocruzamiento repetido en variedades de cultivo comerciales de algodón tales como, aunque sin imitación, FM5013, FM5015, FM5017, FM989, FM832, FM966 and FM958, FM989, FM958, FM832, FM991, FM819, FM800, FM960, FM966, FM981, FM5035, FM5044, FM5045, FM5013, FM5015, FM5017 o FM5024.

Se observa que la introgresión del evento selecto en estas variedades de cultivo no influye significativamente en ninguna de las características fenotípicas o agronómicas deseables de estas variedades de cultivo (sin arrastre de ligamiento) mientras que la expresión del transgén, determinada por tolerancia a glufosinato, cumple los niveles comercialmente aceptables. Esto confirma el estado del evento EE-GH3 como un evento selecto.

Como se usa en las siguientes reivindicaciones, salvo que se indique claramente otra cosa, el término "planta" pretende abarcar tejidos vegetales, en cualquier fase de madurez, así como cualquier células, tejido u órgano recogido de u obtenido de cualquiera de dichas plantas, incluyendo, sin limitación, cualquier semilla, hoja, tallo, flor, raíz, células individuales, gameto, cultivo celular, cultivo tisular o protoplasto.

La semilla de referencia que comprende el evento selecto EE-GH3 se depositó como EE-GH3 en la ATCC (10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209) el 19 de julio de 2005, con el n.º de acceso a la ATCC PTA-6878.

Como se usa en las siguientes reivindicaciones, salvo que se indique claramente otra cosa, el término "planta" pretende abarcar tejidos vegetales, en cualquier fase de madurez, así como cualquier células, tejido u órgano recogido de u obtenido de cualquiera de dichas plantas, incluyendo, sin limitación, cualquier semilla, hoja, tallo, flor, raíz, células individuales, gameto, cultivo celular, cultivo tisular o protoplasto.

Lista de secuencias

<110> Bayer BioScience N.V.
Trolinder, Linda
Habex, Veerle

<120> Plantas de algodón tolerantes a herbicidas y métodos para identificar las mismas

<130> BCS 05-2011

<150> EP05076826.6
<151> 08-08-2005

<150> US60/707 067
<151> 10-08-2005

<160> 13

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 1214
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótido que comprende la secuencia flanqueante 5' de EE-GH3

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(732)
<223> ADN de la planta

ES 2 654 294 T3

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (733)..(1214)
 5 <223> ADN de inserto

<400> 1
 ccacgtcaaa gaattcacgt acccaattca ggtccctatg aaccggagat aacccaaatt 60
 accaaattag acctaataca aacgggtgta ccagagttgg acgtcgtacc gacgactgga 120
 tcggggatta gtgggtccca ggcgtattca tgcacgagct ggcgcaatga ggccgcgaga 180
 tttaaagccc gagaagggtg caaaggggag gaggccttct taattatggt ggggagagaa 240
 gtgacgaaat gaggtaggga gtggagggtg gaactctgag gattgaaaga gagagaagag 300
 gaaggaaatg ggagtttggg ggaggaaagg agaggggaaa gagaggaaaa gaagggtttg 360
 aaagagaaga gagaagagga taaaggaggg aaggagagga gtgttttggg ggaagaaatg 420
 agggttttga gatagggatt tgggtcttgg agatggagaa gtggatttaa gtctattagg 480
 agaacaatgc gttgggtttt gctgtagttt gggaaatggg ctatggcttc agccgccatt 540
 gatgaagaat gaagaaactg caaagctttt atttagttga aaataaatag acacaaatca 600
 agccacagtt tgattgcaca gacaatggag aaaggtagag aaaagggtaa gaaaatatat 660
 aaaaataaaa gaattgaagt tagaagaaga agagatcaaa ggaacaaata cacttggaac 720
 gacttcgctt taggctccat ggcgatcgtc acgtatctag aattcctgca ggtcagctcg 780
 cgacgtacgt tcgaacaatt ggttttaaaa gcttgcacgc ctgcaggtcg aggagaaata 840
 tgagtcgagg catggataca ctaagttccc ctgaagttag catgatcttt gatgctgaga 900
 tgattcccag agcaagatag tttgtgctgc aagtgcacac attgtaatga aaccaccact 960
 caacgaattt acttgtggct ttgacatgct gtgtgctctg tttgtatttg tgagtgcgcy 1020
 ttggtaatta tttttgttaa tgtgatttta aaacctctta tgtaaatagt tactttatct 1080
 attgaagctg gttcttctgg tctatagttt ctcaaaggga aattaaaatg ttgacatccc 1140
 atttacaatt gataacttgg tatacacaaa ctttgtaaat ttgggtgatat ttatggctga 1200
 10 aagaaggcaa tacc 1214

<210> 2
 <211> 654
 <212> ADN
 15 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia flanqueante 3' de EE-GH3

20 <220>
 <221> misc feature
 <222> (1)..(430)
 <223> ADN de inserto

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (431)..(654)
 <223> ADN de la planta

30 <400> 2

ES 2 654 294 T3

```

cacgatggat gaggataacg aaagggcggg tcctatgtcc gggaaagtcc ccgtagaaga      60
caatgagcaa agctactgaa acgcggacac gacgtcgcat tggtagcgat atgagttaa      120
ccgactcaat tcctttatta agacataaac cgattttggg taaagtgtaa cagtgagctg      180
atataaaacc gaaacaaacc ggtacaagtt tgattgagca acttgatgac aaacttcaga      240
attttggtta ttgaatgaaa atcatagtct aatcgtaaaa aatgtacaga agaaaagcta      300
gagcagaaca aagattctat attctggttc caatttatca tcgctttaac gtcctcaga      360
tttgatcggg ctgcaggaat taaacgccg ggcacgtggg atcctctaga gtcgacggcc      420
gagtactggc gcgaagtggg aagtggcggc aaaacacaaa aaagtataag tgaaagtaca      480
atttagttac tcaacttaa aaagatataa aatgattaat aagctattta aaacttttca      540
tttaagttat taaaacatgt tagagttttt atttaaatta atggactggt aaatttaatt      600
ttttaagaaa gttcatctaa caagctccaa gcaacaactc gatgatcgga atgg          654

```

- 5 <210> 3
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial
- 10 <220>
<223> Cebador oligonucleotídico GHI043

<400> 3
ttcagccgcc attgatgaag 20
- 15 <210> 4
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial
- 20 <220>
<223> Cebador oligonucleotídico SB327

<400> 4
- 25 gacctgcagg catgcaagct 20

<210> 5
<211> 20
<212> ADN
- 30 <213> Artificial

<220>
<223> Cebador oligonucleotídico MAE080
- 35 <400> 5
attaccaacc ggcactcaca 20

<210> 6
<211> 20
- 40 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador oligonucleotídico MAE081
- 45 <400> 6
ggtattgcct tctttcgacc 20

<210> 7
<211> 20
<212> ADN
- 50

<213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico MAE078
 5
 <400> 7
 cacgatggat gaggataacg 20
 <210> 8
 10 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> Cebador oligonucleotídico MAE070
 <400> 8
 cgcatggta cggatagag 20
 20 <210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico MAE071
 <400> 9
 30 agatttgatc gggctgcagg 20
 <210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico MAE121
 <400> 10
 40 ccattccgat catcgagtg 20
 <210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico GHI044
 50 <400> 11
 ggtatccat gcctcgactc 20
 <210> 12
 <211> 21
 55 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico GHI001
 60 <400> 12
 aacctaggct gctgaaggag c 21
 <210> 13
 65 <211> 21
 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico GH002

5

<400> 13

caactcctcc agtcactcctcc g 21

REIVINDICACIONES

1. Una planta de algodón transgénica tolerante a glifosato, o células, partes, semillas o descendencia de la misma, que comprenden cada uno un evento selecto en su genoma,
- 5 comprendiendo dicho evento selecto un ADN foráneo que comprende un gen quimérico que comprende la secuencia codificante de un gen *epsps* modificado de *Zea mays* que codifica una enzima EPSPS tolerante a glifosato, bajo el control de un promotor expresable en plantas de un gen de histona, y en la que dicho evento selecto comprende
- 10 - la SEQ ID NO: 1, estando los nucleótidos 1-732 de la SEQ ID NO: 1 inmediatamente en dirección 5' de y contiguos a dicho ADN foráneo y siendo los nucleótidos 733-1214 de la SEQ ID NO: 1 el ADN foráneo y
- la SEQ ID NO: 2, estando los nucleótidos 431-654 de la SEQ ID NO: 2 inmediatamente en dirección 3' de y contiguos a dicho ADN foráneo, y siendo los nucleótidos 1 a 430 de la SEQ ID NO: 2 el ADN foráneo en la que dicho evento selecto está comprendido en la semilla de referencia depositada en la ATCC con el n.º de depósito PTA-6878,
- 15 el ADN genómico de dicha planta de algodón, o células, partes, semilla o descendencia de la misma cuando se analiza en un protocolo de identificación por PCR con dos cebadores que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 11 respectivamente, produce un fragmento de ADN de 334 pb.
2. Un método para identificar la presencia de un evento selecto en una planta de algodón transgénica resistente a glifosato, o células, partes, semilla o descendencia de la misma especificadas en la reivindicación 1, comprendiendo dicho método
- 20 amplificar un fragmento de ADN entre 100 y 500 pb de un ácido nucleico presente en una muestra biológica de la planta, células, partes, semilla o descendencia de la misma, usando una reacción en cadena de la polimerasa con al menos dos cebadores,
- 25 reconociendo uno de dichos cebadores la región flanqueante 5' del evento selecto especificado en la reivindicación 1,
- teniendo dicha región flanqueante 5' la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 1 al nucleótido 732 o la región flanqueante 3' de dicho evento selecto,
- 30 teniendo dicha región flanqueante 3' la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 431 al nucleótido 654,
- reconociendo el otro cebador de dichos cebadores una secuencia dentro del ADN foráneo que tiene la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 733 al nucleótido 1214 o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1 al nucleótido 430.
- 35 3. El método de la reivindicación 2, en el que dicho cebador que reconoce la región flanqueante 5' consiste en una secuencia de nucleótidos de 17 a 200 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 1 al nucleótido 732 o dicho cebador que reconoce la región flanqueante 3' de dicho evento selecto consiste en una secuencia de nucleótidos de 17 a 200 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 431 al nucleótido 654,
- 40 y dicho cebador que reconoce una secuencia dentro del ADN foráneo consiste en 17 a 200 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 733 al nucleótido 1214 o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1 al nucleótido 430
- o en el que dicho cebador que reconoce la región flanqueante 5' comprende en su extremo 3' final una secuencia de nucleótidos de al menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 1 al nucleótido 732
- 45 o dicho cebador que reconoce a región flanqueante 3' de dicho evento selecto comprende en su extremo 3' final una secuencia de nucleótidos de al menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 431 al nucleótido 654,
- 50 y dicho cebador que reconoce una secuencia dentro del ADN foráneo comprende en su extremo 3' al menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 733 al nucleótido 1214 o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1 al nucleótido 430.
4. El método de la reivindicación 3, en el que dichos cebadores comprenden la secuencia de la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 11, respectivamente.
- 55 5. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 2, 3 o 4 para el cribado de semillas para la presencia de dicho evento selecto.
- 60 6. Un kit para identificar la presencia de un evento selecto en una planta de algodón transgénica resistente a glifosato, o células, partes, semilla o descendencia de la misma especificadas en la reivindicación 1, comprendiendo dicho kit un cebador que reconoce la región flanqueante 5' del evento selecto especificado en la reivindicación 1,
- teniendo dicha región flanqueante 5' la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 1 al nucleótido 732
- 65 o un cebador que reconoce la región flanqueante 3' de dicho evento selecto, teniendo dicho región flanqueante 3' la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 431 al nucleótido 654,

y un cebador que reconoce una secuencia dentro del ADN foráneo, teniendo dicho ADN foráneo la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 733 al nucleótido 1214 o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1 al nucleótido 430.

- 5 7. El kit de la reivindicación 6, en el que dicho cebador que reconoce la región flanqueante 5' consiste en una secuencia de nucleótidos de 17 a 200 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 1 al nucleótido 732
- 10 o dicho cebador que reconoce la región flanqueante 3' de dicho evento selecto consiste en una secuencia de nucleótidos de 17 a 200 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 431 al nucleótido 654,
- 15 y dicho cebador que reconoce una secuencia dentro del ADN foráneo consiste en 17 a 200 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 733 al nucleótido 1214
- o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1 al nucleótido 430
- o en el que dicho cebador que reconoce la región flanqueante 5' comprende en su extremo 3' final una secuencia de nucleótidos de al menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 1 al nucleótido 732
- 20 o dicho cebador que reconoce la región flanqueante 3' de dicho evento selecto comprende en su extremo 3' final una secuencia de nucleótidos de al menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 431 al nucleótido 654,
- y dicho cebador que reconoce una secuencia dentro el ADN foráneo comprende en su extremo 3' al menos 17 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de nucleótidos del complemento de la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 733 al nucleótido 1214
- 25 o la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 del nucleótido 1 al nucleótido 430.
8. El kit de la reivindicación 7, que comprende un cebador que consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 3 y un cebador que consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 11.

Fig. 1

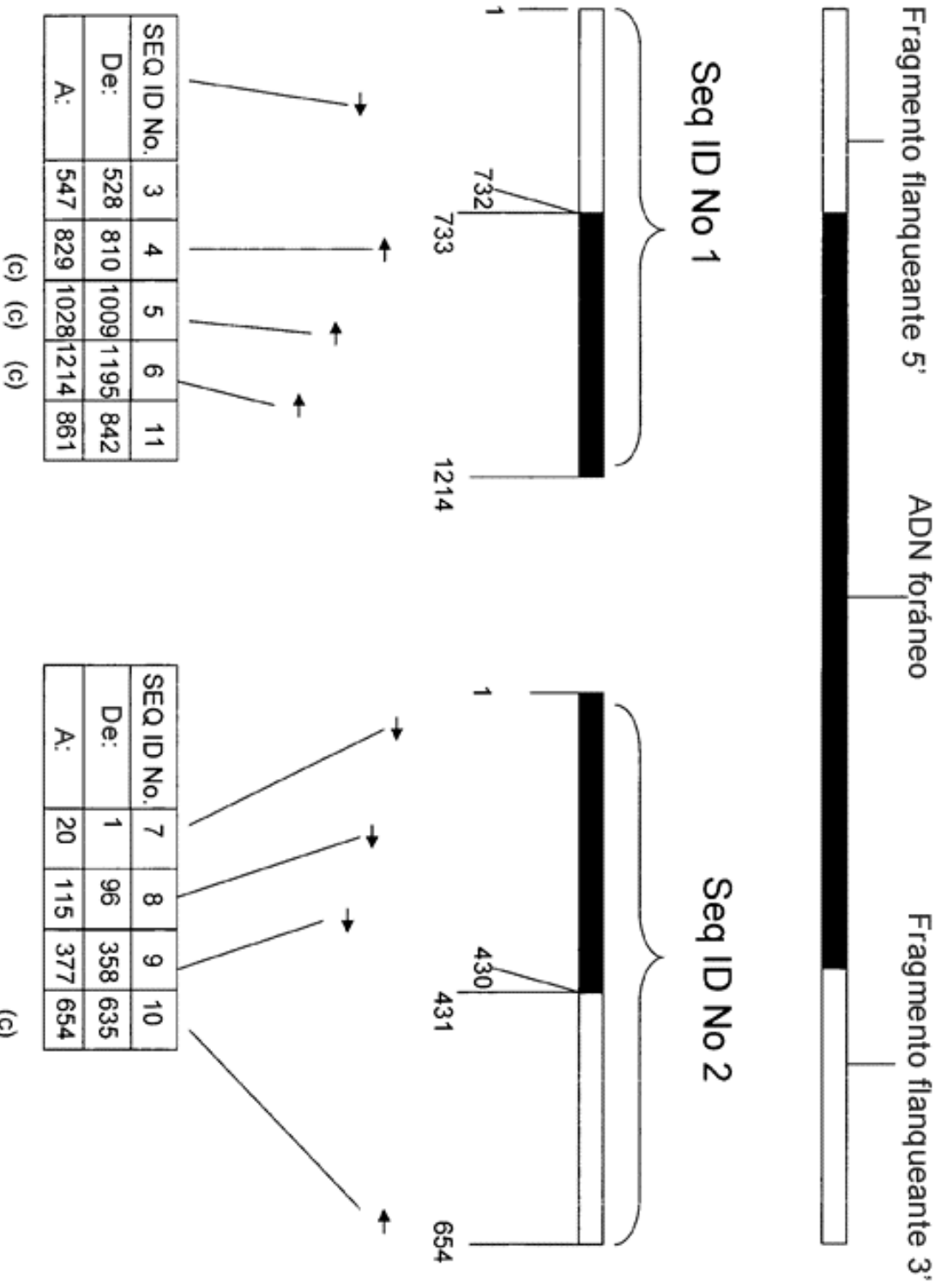


Fig. 2

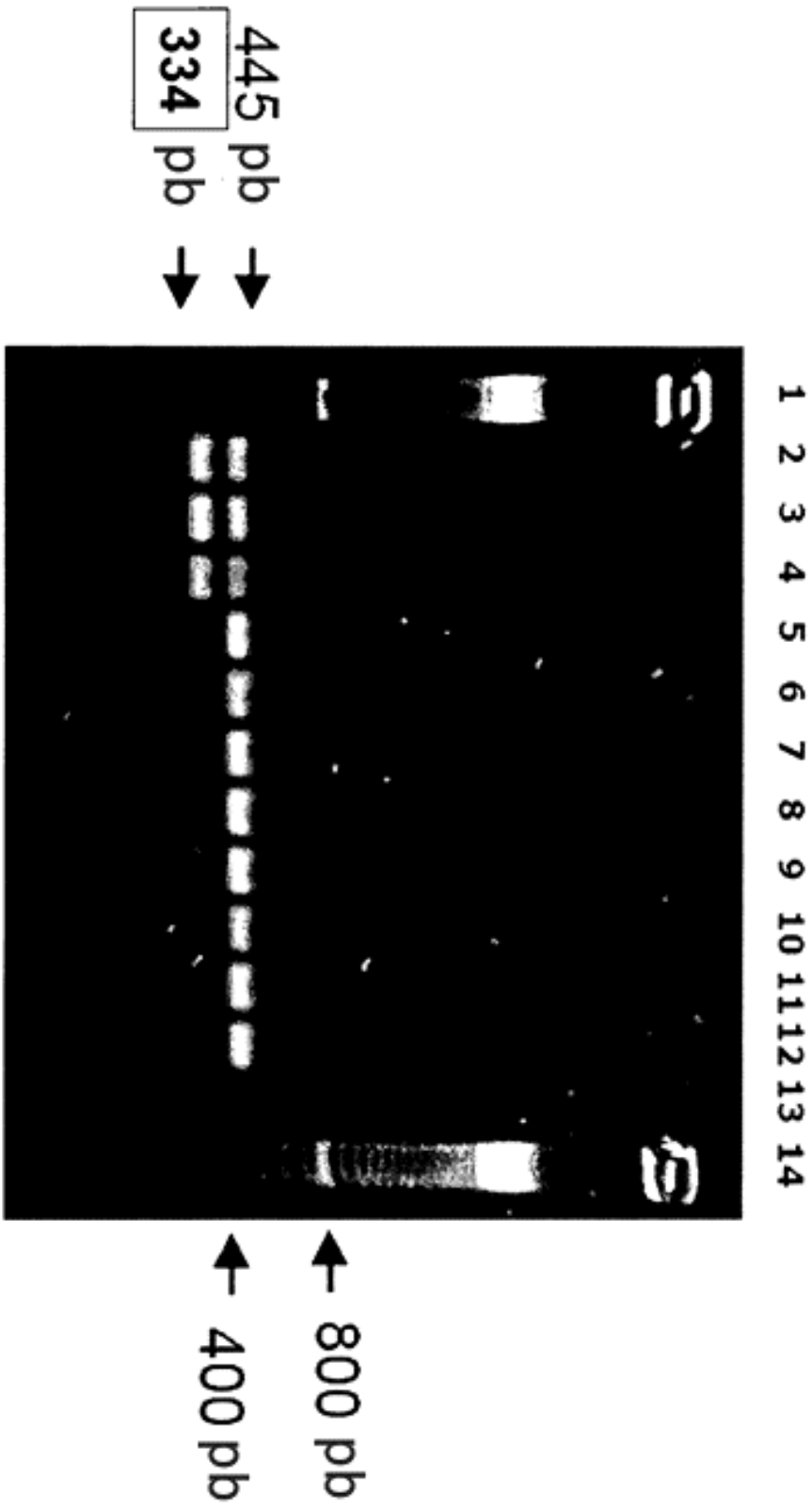


Fig. 3

